

R.23.697

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Queda registrada la tesis de la Dirección  
de Tesis... 169... número... 53... del libro  
de inscripción...

Fecha: 12 JUL 2005

Director del Hospital de Tesis

*Pedro Raffetto*

T.D.  
O/AD

**ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN ENTRE ENFERMEDAD DE BEHÇET  
Y POLIMORFISMO DE LOS TRANSPORTADORES TAP1 Y TAP 2  
(CODIFICADOS POR LA REGIÓN DE CLASE II DEL COMPLEJO  
MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD).**

**(TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR)**

***Celia Ocaña Medina.***

**Directores:**

**Dr. Julio Sánchez Román.**

**Dr. Antonio Núñez Roldán.**

**Dr. Joaquín Carneado de la Fuente.**



**Servicio Andaluz de Salud**

**HOSPITAL UNIVERSITARIO "VIRGEN DEL ROCIO"**

Avenida Manuel Siurot, s/n.  
41013 - SEVILLA



**JUNTA DE ANDALUCIA**

Consejería de Salud

**JULIO SANCHEZ ROMAN, Profesor Asociado del Departamento de MEDICINA de la Universidad de Sevilla, Jefe de Sección del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Virgen del Rocío**

**COMUNICA:**

**Que la Licenciada D<sup>a</sup> CELIA OCAÑA MEDINA ha realizado el trabajo de investigación que lleva por título "ANALISIS DE LA ASOCIACION ENTRE ENFERMEDAD DE BEHÇET Y POLIMORFISMO DE LOS TRANSPORTADORES TAP1 Y TAP2 (CODIFICADOS POR LA REGIÓN DE CLASE II DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD)" bajo mi dirección y que, dicho trabajo, reúne las condiciones necesarias para ser leído y defendido como tesis para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.**

**Para que conste y a los efectos oportunos, expido la presente Comunicación en Sevilla a 25 de mayo de 1.995.**

  
**Fdo.: Dr. J. Sánchez Román**  
**DIRECTOR DE LA TESIS**

  
**Fdo.: Celia Ocaña Medina**

**DOCTORANDO**



**Servicio Andaluz de Salud**

**HOSPITAL UNIVERSITARIO "VIRGEN DEL ROCIO"**

Avenida Manuel Siurot, s/n.  
41013 - SEVILLA



**JUNTA DE ANDALUCIA**

Consejería de Salud

**ANTONIO NUÑEZ ROLDAN, Profesor Asociado del Departamento de MEDICINA de la Universidad de Sevilla, Jefe del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen del Rocío**

**COMUNICA:**

**Que la Licenciada D<sup>a</sup> CELIA OCAÑA MEDINA ha realizado el trabajo de investigación que lleva por título "ANALISIS DE LA ASOCIACION ENTRE ENFERMEDAD DE BEHÇET Y POLIMORFISMO DE LOS TRANSPORTADORES TAP1 Y TAP2 (CODIFICADOS POR LA REGIÓN DE CLASE II DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD)" bajo mi dirección y que, dicho trabajo, reúne las condiciones necesarias para ser leído y defendido como tesis para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.**

**Para que conste y a los efectos oportunos, expido la presente Comunicación en Sevilla a 25 de mayo de 1.995.**

*Antonio Roldán*

**Fdo.: Dr. A. Núñez Roldán  
DIRECTOR DE LA TESIS**

*Celia Ocaña*

**Fdo.: Celia Ocaña Medina**

**DOCTORANDO**



**Servicio Andaluz de Salud**

**HOSPITAL UNIVERSITARIO "VIRGEN DEL ROCIO"**

Avenida Manuel Siurot, s/n.  
41013 - SEVILLA



**JUNTA DE ANDALUCIA**

Consejería de Salud

**JOAQUIN CARNEADO DE LA FUENTE , Profesor Titular del Departamento de MEDICINA de la Universidad de Sevilla, Jefe del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario Virgen del Rocío**

**COMUNICA:**

**Que la Licenciada D<sup>a</sup> CELIA OCAÑA MEDINA ha realizado el trabajo de investigación que lleva por título "ANALISIS DE LA ASOCIACION ENTRE ENFERMEDAD DE BEHÇET Y POLIMORFISMO DE LOS TRANSPORTADORES TAP1 Y TAP2 (CODIFICADOS POR LA REGIÓN DE CLASE II DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD)" bajo mi dirección y que, dicho trabajo, reúne las condiciones necesarias para ser leído y defendido como tesis para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía.**

**Para que conste y a los efectos oportunos, expido la presente Comunicación en Sevilla a 25 de mayo de 1.995.**



**Fdo.: Dr. J. Carneado de la Fuente**  
**DIRECTOR DE LA TESIS**



**Fdo.: Celia Ocaña Medina**

**DOCTORANDO**

***A mis padres,  
por todo el cariño que he recibido.***

***A Angel y a mis hijas,  
por su apoyo moral y por el tiempo que no les he dedicado.***

## **AGRADECIMIENTO.**



*Al Profesor D. Julio Sánchez Román por su apoyo sin límites y total dedicación, sin la cual no se podría haber terminado esta tesis.*

*A la Dra. M<sup>a</sup>. Jesús Castillo Palma por su gran ayuda a nivel asistencial pero sobre todo por su gran compañerismo e inestimable amistad.*

*Al Profesor titular D. Joaquín Carneado y al Dr. Antonio Núñez por su colaboración en la codirección de esta tesis.*

*A la Dra. D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup>. Francisca González Escribano por su ayuda en la realización de la metodología de esta tesis.*

*Al Profesor Titular del Departamento de Psicología Evolutiva, de la Educación Básica y Metodología de la Universidad de Sevilla, D. Joaquín Mora Roche, por la aportación tan novedosa e interesante a la interpretación de los resultados de esta tesis.*

*A la Dra. D<sup>a</sup>. Francisca López Checa y al Dr. Rodríguez Cañas, así como a los componentes de sus respectivos servicios, por su constante colaboración con nuestra unidad en el seguimiento de estos enfermos.*

*A D. Jesús M<sup>a</sup> Leal Pérez por su valiosa colaboración en la búsqueda y aportación de bibliografía y a D. Facundo Pérez Arrans por su colaboración en la impresión de esta tesis.*

*A todas y cada una de las personas (médicos, ATSs, auxiliares y administrativos) tanto de la consulta externa como de la planta de hospitalización que hacen posible el buen funcionamiento de la Unidad de Colagenosis.*

# **INDICE.**

	Páginas
<b>1. INTRODUCCION</b>	1
<b>1.1.- ENFERMEDAD DE BEHÇET</b>	2
<b>A) GENERALIDADES</b>	2
<b>B) VARIABILIDAD DE LA EXPRESION CLINICA</b>	4
<b>C) MECANISMOS ETIOPATOGENICOS</b>	8
<b>D) ALTERACIONES INMUNITARIAS</b>	10
<b>a) Inmunidad celular</b>	10
1. Linfocitos T	10
2. Células NK	11
<b>b) Inmunidad humoral</b>	11
1. Linfocitos B	11
2. Producción de anticuerpos	12
<b>c) Polimorfonucleares</b>	13
<b>d) Estudios de linfocinas</b>	13
<b>1.2.- EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD HUMANO</b>	15
<b>A) ESTRUCTURA Y ORGANIZACION GENOMICA</b>	15
a) Moléculas de clase I	17
b) Moléculas de clase II	19
c) Moléculas TAP (Transporter associated with antigen processing)	22
<b>B) POLIMORFISMO DE LAS MOLECULAS HLA, TAP Y LMP</b>	27
a) Moléculas de clase I	27
b) Moléculas de clase II	28
1. Polimorfismo DR	28
2. Polimorfismo DQ	28
3. Polimorfismo DP	29
c) Moléculas TAP	29
1. Polimorfismo TAP1	30
2. Polimorfismo TAP2	31
d) Moléculas LMP	32
e) Métodos utilizados para el estudio del polimorfismo	34
1. Técnicas serológicas	34
2. Técnicas de tipificación celular	35
3. Técnicas de tipificación bioquímica	35

4. Técnicas de tipificación de HLA a nivel molecular	35
C) FUNCION DEL CMH	36
D) CMH Y PREDISPOSICION A LA ENFERMEDAD	39
1.3.- ASOCIACION ENTRE HLA Y ENFERMEDAD DE BEHÇET	45
2.- OBJETIVOS	49
3.- MATERIAL Y METODO	53
3.1.- POBLACION OBJETO DE ESTUDIO	54
3.2.- TECNICAS ESPECIFICAS DE LABORATORIO	55
A) TIPAJE HLA DE CLASE I Y II	55
a) HLA de clase I	55
b) HLA de clase II	55
1. Amplificación mediante PCR	55
2. Tipaje mediante oligonucleótidos propiamente dichos	56
B) TIPAJE PARA GENES TAP	56
a) Extracción de ADN	56
b) Amplificación utilizando PCR-ARMS	57
c) Alelos TAP1 y TAP2	58
C) ESTUDIO ESTADISTICO	59
4.- RESULTADOS	62
4.1.- DATOS EPIDEMIOLOGICOS	63
4.2.- DATOS CLINICOS	65
A) VALORACION GENERAL	65
B) AFECCION CUTANEO-MUCOSA	69
C) AFECCION ARTICULAR	72
D) AFECCION NEUROLOGICA	73
E) AFECCION DIGESTIVA	75
F) AFECCION VENOSA	77
G) MANIFESTACIONES OCULARES	77
H) OTROS SINTOMAS	82
4.3.- DATOS ANALITICOS	82
4.4.- MOLECULAS HLA	84
4.5.- MOLECULAS TAP	89
A) COMPARACIONES CON LA SERIE CONTROL	90

B) COMPARACIONES ENTRE VARIANTES CLINICAS	90
C) DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO ENTRE MOLECULAS TAP Y HLA	96
4.6.- ESTUDIO MULTIVARIANTE	100
A) ANALISIS DE DIMENSIONES	103
a) Dimensión 1	103
b) Dimensión 2	103
c) Dimensión 3	103
B) CLASIFICACION DE LOS SUJETOS DE LA MUESTRA	104
5.- DISCUSION	111
6.- CONCLUSIONES	127
A) MODELOS LINEALES	128
B) MODELOS MULTIVARIANTES	129
7.- RESUMEN	130
8.- BIBLIOGRAFIA	136

## **FIGURAS.**

## **INTRODUCCION**

Páginas

Figura 1.1.- Ruta de la seda	3
Figura 1.2.- Mapa genético del Complejo Mayor de Histocompatibilidad humano	16
Figura 1.3.- Estructura de una molécula HLA de clase I (HLA-A2)	18
Figura 1.4.- Estructura de una molécula HLA de clase II	20
Figura 1.5.- Esquema sobre la interrelación entre moléculas LMP y TAP	25
Figura 1.6.- Presentación-reconocimiento del antígeno	37

## **RESULTADOS**

Figura 4.1.- Distribución territorial, en Andalucía de la enfermedad de Behçet	64
Figura 4.2.- Aftas orales en paciente con enfermedad de Behçet	70
Figura 4.3.- Biopsia cutánea. Vasculitis leucocitoclástica	71
Figura 4.4.- Resonancia nuclear magnética en un paciente con afección del sistema nervioso central	74
Figura 4.5.- Ulceras en anillo de sello en intestino delgado	76
Figura 4.6.- Uveítis anterior con Hipopion	78
Figura 4.7.- Curva actuarial de afección ocular	81
Figura 4.8.- Tiempo medio de afección ocular	81
Figura 4.9.- Curva actuarial de afección ocular respecto a TAP1B	94
Figura 4.10.- Curva actuarial de afección ocular respecto a TAP2A	94

Figura 4.11.- Curva actuarial de afección ocular respecto a TAP2B	95
Figura 4.12.- Curva actuarial de afección ocular respecto a TAP2C	95
Figura 4.13.- Representación espacial de los pacientes respecto a las tres dimensiones	105
Figura 4.14.- Dendograma	106



## **TABLAS.**

## **INTRODUCCION**

Paginas

Tabla 1.1.- Polimorfismo TAP1	30
Tabla 1.2.- Polimorfismo TAP2	32

## **MATERIAL Y METODO**

Tabla 3.1.- Cebadores utilizados para amplificación de los genes TAP1 y TAP2	61
--	----

## **RESULTADOS**

Tabla 4.1.- Datos epidemiológicos	63
Tabla 4.2.- Criterios diagnósticos	65
Tabla 4.3.- Manifestaciones clínicas	66-67
Tabla 4.4.- Datos clínicos	68
Tabla 4.5.- Datos clínicos iniciales	68
Tabla 4.6.- Afección cutánea en 36 pacientes	69
Tabla 4.7.- Afección articular en 34 pacientes	72
Tabla 4.8.- Afección neurológica en 11 pacientes	73
Tabla 4.9.- Afección digestiva en 8 pacientes	75
Tabla 4.10.- Afección venosa en 9 pacientes	77
Tabla 4.11.- Afección ocular en 37 pacientes	79

Tabla 4.12.- Lesiones oculares en 37 pacientes	80
Tabla 4.13.- Datos analíticos en 57 pacientes	83
Tabla 4.14.- Moléculas HLA de clase I y II en pacientes	85-86
Tabla 4.15.- Moléculas TAP1 y TAP2 en pacientes	87-88
Tabla 4.16.- Frecuencias alélicas de polimorfismo TAP1	89
Tabla 4.17.- Frecuencias alélicas de polimorfismo TAP2	89
Tabla 4.18.- Frecuencias alélicas de polimorfismo TAP1 en subgrupos	91
Tabla 4.19.- Frecuencias alélicas de polimorfismo TAP2 en subgrupos	92
Tabla 4.20.- Frecuencias alélicas de polimorfismo TAP en pacientes. Relación con HLA-B51	96
Tabla 4.21.- Polimorfismo TAP en pacientes con uveítis. Relación con HLA-B51	97
Tabla 4.22.- Polimorfismo TAP. Relación con DQ5	98
Tabla 4.23.- Polimorfismo TAP. Relación con DQB1*0501	99
Tabla 4.24.- Polimorfismo TAP. Relación con DQB1*0501 en pacientes con uveítis	99
Tabla 4.25.- Proporción de varianza explicada por cada dimensión	102
Tabla 4.26.- Proyección de cada categoría relevante sobre los ejes	102
Tabla 4.27.- Puntuación de cada sujeto en cada una de las dimensiones	104

Tabla 4.28.- Clasificación de los sujetos con respecto a los conjuntos (" <i>clusters</i> ")	107
Tabla 4.29.- Análisis de varianza	108
Tabla 4.30.- Características de cada tipo	110

## **DISCUSION**

Tabla 5.1.- Frecuencia de TAP1 y TAP2 en controles	116
--	-----

## **I.- INTRODUCCION.**

## 1.1.- ENFERMEDAD DE BEHÇET

### A) GENERALIDADES.

La enfermedad de Behçet, descrita originalmente en 1937 por Hulusi Behçet<sup>1</sup>, a partir de la triada sintomática de *aftas orales, úlceras genitales y uveítis anterior*, es un proceso de naturaleza autoinmune caracterizado por una sintomatología mucho más proteiforme de lo que se sospechó inicialmente tras sus primeras definiciones.

La enfermedad de Behçet tiene una incidencia notablemente más alta en una franja que se extiende entre los 30° y los 40° de latitud norte, discurre por Europa paralelamente al Mediterráneo, atraviesa por el Norte de la India y llega hasta el Japón. Nuestro país está situado en el extremo más occidental de esta zona, correspondiente a la tradicional Ruta de la Seda<sup>2</sup>, que fue utilizada durante siglos por las caravanas en sus desplazamientos Este-Oeste (Fig. 1.1). Los estudios epidemiológicos de Graña<sup>3</sup>, en Galicia, en los que se demuestra una prevalencia para la enfermedad de Behçet de 5.6 por 100.000 habitantes, así como nuestros propios estudios en Andalucía<sup>4</sup>, con una frecuencia estimada de 9 por 100.000, confirman una vez más esta curiosa distribución territorial. Por otra parte, la elevada prevalencia de la enfermedad nos obliga a considerarla, no como una rareza, sino como un proceso de gran interés, por sus graves consecuencias, desde el punto de vista sanitario. La edad de inicio, la distribución por sexos y la gravedad de sus manifestaciones clínicas difieren ampliamente entre las series estudiadas según procedan de países con alta o baja prevalencia de la enfermedad. En los primeros (Japón y países de la cuenca mediterránea), la enfermedad predomina en varones jóvenes y es una de las



Fig. 1.1.- La Ruta de la Seda.

principales causas de ceguera. Por el contrario, en países de baja prevalencia afecta a más mujeres y la clínica se inicia en edades más tardías<sup>5</sup>.

Hay una evidente agregación familiar en la mayoría de las series estudiadas (por lo general de alrededor de un 2 %)<sup>6</sup>; en la nuestra se apreció dicha asociación en proporción un poco más alta (4,2 %)<sup>4</sup>.

## **B) VARIABILIDAD DE LA EXPRESION CLINICA.**

La base del diagnóstico de la enfermedad de Behçet era la demostración, no necesariamente simultánea, de los tres elementos de la triada clásica (aftas orales, úlceras genitales y uveítis) en un paciente. Muy pronto se advirtió que, como es común a tantas enfermedades sistémicas, la complejidad del proceso es tan grande que, parafraseando a Shoenfeld y a Alarcón-Segovia en su referencia al lupus eritematoso, podría hablarse hoy en día del *Mosaico de la enfermedad de Behçet*<sup>7</sup>. Así, se comunicó la presencia de vasculitis cutánea (Touraine, 1941), afección neurológica (Berlin, 1944), tromboflebitis (Adamantiades, 1946), participación articular (Adamantiades, 1949), ulceraciones intestinales (Baba, 1976) y arteritis de grandes vasos con o sin la formación de aneurismas (Fakuda, 1977). Blobner<sup>8</sup> describió el fenómeno de patergia (aparición de una pústula o pápula horas después de practicar una punción en la piel) en 1937. Aunque se le ha dado a este fenómeno un gran valor para el diagnóstico de la enfermedad su importancia es muy discutible<sup>9</sup>, como veremos más adelante.

El substrato histológico de la mayor parte de las lesiones, fue descrito por Hamza<sup>10</sup> como un "...*infiltrado polimorfo, de predominio linfocitario o neutrófilo, de disposición perivascular, que se acompaña de turgencia o proliferación endotelial que obstruye completa o*



*incompletamente la luz vascular, y que a veces se acompaña de necrosis fibrinoide que afecta las arteriolas".* Es decir, se trata de una vasculitis de pequeño vaso de predominio linfocitario, absolutamente inespecífica, en la que la necrosis fibrinoide y la leucocitoclasia no siempre son llamativas. En otras ocasiones no se aprecia una verdadera vasculitis y se comprueba tan sólo un infiltrado de polimorfonucleares muy parecido al que se observa en el síndrome de Swett<sup>11</sup>.

La gran variabilidad en la expresión clínica junto al hecho de que la triada completa no estaba siempre presente (o bien sus elementos separados en el tiempo incluso por años), dio lugar a que en un número importante de casos fuese muy difícil establecer el diagnóstico. Al carecer la enfermedad de datos biológicos o histológicos específicos se recurrió al empleo de distintos sistemas de criterios diagnósticos.

Mason y Barnes<sup>12</sup>, en 1969, propusieron el primer esquema recurriendo a un sistema de criterios mayores y menores. Se consideraron criterios mayores las lesiones cutáneas y los elementos de la triada clásica, y menores aquellas otras manifestaciones que se habían ido describiendo en asociación frecuente con la enfermedad clásica (digestivas, neurológicas, cardiovasculares, incluidas las tromboflebitis, o articulares). Entre estas últimas también se incluyó, como criterio, la existencia de historia familiar de la enfermedad ya que, progresivamente, se había descrito un número creciente de casos en sujetos emparentados (Sezer, 1956 y 1960 y Fowler et al. 1968, citados en referencia 12). Mason y Barnes postularon que el diagnóstico podía establecerse con la presencia de tres criterios mayores, o de dos mayores mas dos menores.

En 1976 O'Duffy y Goldstein<sup>13</sup> comprobaron que la afección neurológica en la enfermedad de Behçet podía observarse con una frecuencia importante. Consideraron que la

mayoría de las manifestaciones clínicas conocidas tenían el mismo peso a la hora de establecer el diagnóstico, siempre que fuesen acompañadas de aftosis oral recidivante. Así, el diagnóstico quedaría establecido con la coexistencia de tres manifestaciones de las que ellos consideraban más frecuentes (aftas orales, aftas genitales, uveítis, vasculitis cutánea, sinovitis y meningoencefalitis) siempre que una de ellas fuera la aftosis recidivante. Estos autores introdujeron por primera vez el concepto de formas incompletas, que serían aquellas con sólo dos manifestaciones (una de ellas, obligadamente, la aftosis oral recidivante). A su vez, definieron también circunstancias excluyentes: enfermedad inflamatoria intestinal, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Reiter e infecciones herpéticas. Estas exclusiones no pueden hoy en día tomarse al pie de la letra. Algunos casos de enfermedad de Behçet presentan (como hemos podido comprobar en nuestra propia serie) lesiones intestinales que pueden dar lugar al diagnóstico erróneo de colitis ulcerosa. Además, existe una relación, poco clara aún, entre enfermedad de Behçet e infección previa por virus herpes tipo I, tal como se expone más adelante.

El sistema de criterios diagnósticos más complejo es el que elaboró el *Behçet's Disease Research Committee of Japan*<sup>14</sup> en 1979. Introdujo el fenómeno de patergia como prueba específica aislada, por primera vez, dentro de las manifestaciones cutáneas y, siguiendo a Mason y Barnes, estableció los mismos criterios mayores y menores añadiendo a estos últimos la epididimitis. Así mismo se diferenciaba con este sistema entre diagnóstico *completo*, cuando están presentes los 4 criterios mayores, *incompleto*, si hay 3 mayores (o sólo 2, si uno de ellos es la afección ocular), *probable* sólo con 2 mayores, y *posible* con uno mayor.

Touraine, en 1941<sup>15</sup>, planteó un enfoque más práctico de la enfermedad de Behçet considerando que la aftosis oral y genital es la manifestación mucosa de una enfermedad sistémica.

Consideró tres variedades dependiendo de la extensión de las manifestaciones: *aftosis mucosa aislada* (oral y genital), *aftosis mucocutánea*, si se añadían manifestaciones cutáneas a las anteriores, y *aftosis generalizada* si coexistían manifestaciones oculares, neurológicas, articulares o viscerales. Lehner<sup>16</sup>, en esta misma línea, agrupó a los pacientes según el tipo de manifestaciones, planteándose la posibilidad de que la base inmunopatológica y, por ende, el pronóstico fuesen distintos. Estableció 4 categorías para la enfermedad: *tipo mucocutáneo*, *tipo artrítico*, *tipo neurológico* y *tipo ocular*.

En una conferencia internacional sobre enfermedad de Behçet celebrada en 1985, se intentó establecer un sistema unitario sin que se lograra llegar a un acuerdo. Finalmente, en 1990, el *International Study Group for Behçet's Disease*<sup>17</sup> estableció un nuevo sistema de criterios caracterizado por una sensibilidad del 91,95% y una especificidad del 96,98%. Se limitaba a considerar los elementos de la triada clásica más las manifestaciones cutáneas. No se contemplaron las manifestaciones menores (digestivas, articulares, neurológicas ni tromboflebitis) porque, según los autores, carecían de poder discriminativo. Además incluyeron el fenómeno patérgico como elemento diagnóstico aislado dándole el mismo valor que a la uveítis, las úlceras genitales o las manifestaciones cutáneas. Algunos autores ponen en duda la validez de esta última prueba, al menos en algunas zonas geográficas donde la frecuencia de su respuesta positiva es baja<sup>9, 18</sup>. Por otro lado, la técnica no está estandarizada y no se hace mención a ninguna metodología concreta en su elaboración, en el mencionado sistema de criterios. Sólo se dice explícitamente que la respuesta se considera positiva si aparece una pústula. De los 914 pacientes objeto de estudio por el mencionado Comité, la mayoría procede de Irán (366), Turquía (285), Japón (141) y Túnez (50); unos pocos del Reino Unido (21), Estados Unidos (14) y Francia (9) y no entraron en este

estudio pacientes españoles ni portugueses por lo que, al menos por el momento, no se puede argumentar que dichos criterios sean de aplicación infalible en nuestro país.

Nuestro grupo continúa utilizando fundamentalmente los criterios de O'Duffy<sup>13</sup> dado que es el sistema más extensamente utilizado en España: distintos grupos de trabajo españoles y portugueses, que aluden a la frecuencia de reacción patérgica y que participaron (junto con nosotros mismos) en el II Symposium Internacional Sobre Enfermedad de Behçet/I Reunión del Grupo Ibérico de Estudio Sobre Enfermedad de Behçet, como Muniain<sup>19</sup> en Andalucía, Bosch<sup>20</sup> en Cataluña, y González<sup>21</sup> en Canarias utilizan estos mismos criterios (el último emplea, simultáneamente, los criterios japoneses). Crespo<sup>22</sup> en Portugal adopta asimismo los criterios japoneses. Aunque el grupo de Graña<sup>23</sup> en Galicia, en un trabajo de 1992, utiliza los nuevos Criterios Internacionales, emplea también, en el mencionado Symposium, los de Mason y Barnes explicando, además, que todos sus pacientes excepto uno cumplen los Criterios Internacionales<sup>24</sup>. Es decir, pensamos que existe aún gran flexibilidad para la utilización de uno u otro sistema de criterios y que, pese a la aparición de otros esquemas, la utilización de los de O'Duffy resulta, hoy por hoy, totalmente válida<sup>25,26</sup>.

### **C) MECANISMOS ETIOPATOGENICOS.**

La causa de la enfermedad de Behçet continúa siendo desconocida a pesar de que han transcurrido más de 50 años desde su descripción. El hecho de que los varones y las mujeres difieran entre sí en la expresión de las manifestaciones clínicas hace suponer alguna influencia por parte de factores hormonales<sup>10</sup>. La acumulación territorial, antes citada, ha dado lugar a numerosas investigaciones acerca de la etiopatogenia de la enfermedad de Behçet que apuntan en dos direcciones fundamentales.

En primer lugar se ha especulado acerca de la importancia que pueden tener los factores ambientales. Hulusi Behçet, en su trabajo inicial<sup>1</sup>, ya expresó la opinión de que podría existir un hipotético factor vírico desencadenante y, con posterioridad, distintos trabajos han sugerido una posible relación causal entre el virus herpes tipo I (VHS-1) y el desarrollo de la enfermedad de Behçet<sup>27-30</sup>. Los pacientes tienen, con mayor frecuencia que los individuos sanos, inmunocomplejos específicos para dicho virus<sup>27</sup>; se han detectado, con técnicas de hibridación, homólogos de material genético del virus en los leucocitos de los pacientes<sup>28-29</sup>; se ha comprobado una respuesta celular alterada de los linfocitos CD4+ y CD8+ frente a antígenos del VHS-1<sup>30</sup>. Nuestras propias investigaciones, en pacientes andaluces, también concuerdan en cuanto al papel facilitador de la enfermedad que pueden representar las infecciones por VHS-1<sup>31</sup> mientras que, por el contrario, no hemos observado ninguna relación causal entre su desarrollo e infecciones por otros herpesvirus (virus herpes tipo II o citomegalovirus).

Hamza encontró una mayor frecuencia de HBsAg en una población de 50 pacientes con enfermedad de Behçet que en controles<sup>32</sup>, circunstancia que no hemos comprobado en nuestros pacientes. En una comunicación reciente<sup>33</sup> se ha sugerido una asociación positiva entre infección por virus de la hepatitis C y enfermedad de Behçet. Nuestra experiencia, en este sentido (ningún caso con serología positiva para virus de hepatitis C en 46 pacientes analizados con enfermedad de Behçet), nos hace rechazar tal suposición<sup>34</sup>.

Algunas publicaciones<sup>35</sup> hacen referencia a la posible relación entre antígenos estreptocócicos y enfermedad de Behçet al objetivar una mayor producción de IL-6 por los linfocitos T de los pacientes, con respecto a los controles, cuando se enfrentan a antígenos estreptocócicos<sup>36</sup>.

La acumulación geográfica de los pacientes es un fuerte indicio acerca de la importancia que puedan tener los factores genéticos y, concretamente desde los trabajos iniciales de Ohno<sup>32</sup>, del papel crucial que juegan las moléculas implicadas en el proceso de presentación de antígenos: las moléculas HLA, codificadas por genes del Sistema Mayor de Histocompatibilidad (HLA) en la propensión a sufrir la enfermedad.

#### **D) ALTERACIONES INMUNITARIAS.**

El mecanismo o los mecanismos lesionales determinantes de la enfermedad de Behçet también son desconocidos. Los datos experimentales ponen de manifiesto una serie de alteraciones inmunológicas muy variadas, a veces contradictorias, y que resumimos a continuación:

##### **a) Inmunidad celular**

**1.- Linfocitos T:** Desde el punto de vista cuantitativo, en estos pacientes hay una disminución de células T-helper circulantes que condiciona el descenso del cociente de CD4+/CD8+<sup>10</sup>. Mediante cultivo mixto de linfocitos, Sakane<sup>37</sup>, en 1982, ya sugería la existencia de un descenso de helper de supresores como causa fundamental de la disminución de CD4+. Palmarés<sup>38</sup>, en 1991, demostró en distintos tipos de uveítis, especialmente en la de la asociada a enfermedad de Behçet, que el descenso de células T4 depende de helper de supresores (CD45RA+, 2H4+)CD4+ y no de helper de inductores (CD29+4-B4+). Este autor encontró, además, un incremento de CD8+.

Cualitativamente se ha demostrado en estos pacientes una respuesta débil a mitógenos mientras que, paradójicamente, existe una respuesta fuerte a antígenos de mu-

cosa bucal fetal durante la fase de aftosis que, sin embargo, es débil en fase de inactividad<sup>39</sup>. La producción de interferón gamma por los linfocitos T presenta variaciones importantes que dependen de la fase en que se estudien: Ohno<sup>40</sup> comprobó incremento de interferón gamma (y de su enzima inducido, 2'-5'-oligoadenilato sintetasa) en la fase de actividad de la enfermedad. Las variaciones en la concentración de interferón gamma, según se trate de fases de actividad o de convalecencia pueden tener importantes repercusiones tanto sobre la actividad de células NK<sup>41</sup> como sobre la expresión de las moléculas HLA y de las moléculas de adhesión en las células implicadas en el proceso inflamatorio<sup>42</sup>.

**2.- Células NK:** Hamzaoui et al<sup>43</sup> demostraron igualmente una disminución del número de células NK durante las fases de actividad con posterior aumento en la convalecencia. También durante la fase de actividad, contribuyendo a la citada disminución del cociente CD4+/CD8+, hay un incremento de la fracción Leu7-OKT8 que se supone corresponde a células NK inmaduras. En dicho trabajo<sup>43</sup> se menciona la disminución de la actividad de las células NK en pacientes con enfermedad aguda por herpesvirus (concretamente para VEB), variaciones observadas también paralelamente en la enfermedad de Behçet lo que, en cierto modo, habla a favor de una etiología viral en este proceso.

## **b) Inmunidad humoral**

**1. Linfocitos B:** En la enfermedad de Behçet hay una activación policlonal de los linfocitos B con incremento de la producción de inmunoglobulinas<sup>44</sup>. Levinsky et al<sup>45</sup> comprobaron también un incremento en la producción de crioglobulinas en el 64% de sus pacientes. En cuanto a los niveles de inmunocomplejos circulante los resultados son

contradictorios. En nuestra serie comprobamos hipergammaglobulinemia sólo en el 5,3 % e incremento en los niveles de crioglobulinas en el 14 % de los pacientes.

2.- Producción de anticuerpos: Se ha descrito, de forma inconstante, un incremento en la producción de anticuerpos antirretina pero se piensa que pueden comportarse simplemente como marcadores inespecíficos de la enfermedad sin verdadero valor patogénico<sup>46</sup>. Durante las fases agudas se detectan anticuerpos antimucosa oral pero son inespecíficos y aparecen en cualquier tipo de aftosis<sup>47</sup>. Se han encontrado ANA a títulos bajos en 6 % de los pacientes<sup>48</sup> en algunas series; en la nuestra son positivos en el 40 % de los pacientes pero, en la mayoría, también a títulos bajos. Los estudios de anticuerpos contra diversos glicolípidos arrojan resultados contradictorios. Los que van dirigidos contra los gangliósidos que contienen ácido siálico (presentes en las membranas de las neuronas) están elevados en los pacientes con neuro-Behçet cuando se comparan con los niveles que se encuentran en otros procesos autoinmunes que afectan al sistema nervioso central (lupus eritematoso y esclerosis múltiple)<sup>49</sup>. En ciertas series se ha comprobado en algunos pacientes un título elevado de anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA) con técnica de inmunofluorescencia indirecta pero la frecuencia suele ser baja y rara vez se obtiene significación estadística. También se han encontrado anticuerpos anticardiolipina elevados<sup>50,51</sup> en distinta proporción aunque con frecuencias bajas (pocas veces con cierta significación estadística). Algunos autores no encuentran relación entre estos anticuerpos y patología venosa pero sí con vasculitis retiniana<sup>51</sup>. La presencia de inhibidor circulante de coagulación (en cualquiera de sus expresiones) alcanzó, en nuestra experiencia, un valor de 24 % en una serie de 21 pacientes no seleccionados. En ninguno



de ellos se daban las circunstancias clínicas necesarias para el diagnóstico de síndrome antifosfolípido secundario.

### **c) Polimorfonucleares**

Se ha comprobado en ellos incremento de la capacidad de migración, del índice de fagocitosis y de la producción de superóxido<sup>52</sup>. Para Mastsumura et al<sup>53</sup>, todo ello dependería de un factor sérico que es inhibido por la colchicina. Pensamos que dicha actividad puede corresponder al factor de necrosis tumoral alfa ya que las características del elemento desconocido descritas por Mastsumura son perfectamente atribuibles al mismo. Efthimiou<sup>54</sup> encontró un aumento de la migración leucocitaria, mediante estudio de ventana cutánea (técnica de Rebuck), en pacientes con enfermedad activa, y Aoki<sup>55</sup> comprobó elevación de medulasina (serín proteasa de los granulocitos) en los casos de enfermedad de Behçet en actividad así como normalización de la misma en fases de remisión. Muniain<sup>56</sup> observó un incremento en la actividad de los polimorfonucleares que resultó paralela a la presencia de reacción patérgica.

### **d) Estudios de linfocinas**

Los resultados de los estudios al respecto son muy contradictorios. Hemos comentado que las concentraciones de interferón se han encontrado aumentadas, normales o disminuidas en distintos momentos según la fase evolutiva de la enfermedad<sup>40</sup>. La producción de interleucina 2 (IL-2) por los linfocitos de los pacientes es normal aunque parece existir un descenso de los receptores de IL-2, tanto por disminución de linfocitos que los exhiben como por la reducción de densidad de los mismos en su superficie<sup>57</sup>. La IL-1 y la IL-2 aumentan en humor acuoso y en el vítreo en los pacientes con uveítis<sup>58</sup>.

Aunque se supone que la base de la enfermedad es un fallo en los mecanismos reguladores de la inflamación, resulta difícil integrar todos estos aspectos parciales, aportados por la investigación inmunológica, para intentar esclarecer cual es su verdadera responsabilidad en el desarrollo lesional del proceso. Lo más probable es que la aparente divergencia traduzca la existencia de estadios evolutivos diferentes en relación con alteraciones inmunitarias cambiantes. Por otra parte los distintos mecanismos no afectarían de forma homogénea a todos los órganos afectados. Así, para Hamza<sup>10</sup>, mientras el substrato inmunopatológico en el eritema nodoso, la artritis, la uveítis anterior y la afección del SNC parece ser la respuesta humoral mediada por los complejos inmunes (hipersensibilidad tipo III), en la aftosis, en las lesiones cutáneas papulopustulosas y en el fenómeno patérgico estarían más bien implicados la actividad citotóxica directa y el aumento de quimiotaxis de los granulocitos. Incluso en un terreno limitado, como es el ojo, la agresión que da lugar a la uveítis posterior es distinta de la que se relaciona con uveítis anterior. En la primera dominan los mecanismos de inmunidad celular (infiltrado de linfocitos T)<sup>58</sup> mientras que en la segunda lo hacen los de inmunidad humoral (probablemente por fallo de las células helper de supresores)<sup>38</sup>. El empleo de determinadas drogas utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Behçet también pone de manifiesto la multiplicidad de mecanismos implicados en distintas manifestaciones del proceso. La ciclosporina A, que actúa inhibiendo la respuesta inmunitaria celular (por bloqueo de la síntesis de IL-2 por parte de los linfocitos T CD4+) es efectiva para el control de la uveítis posterior (en la que se supone un mecanismo agresor dependiente de células T); sin embargo no modifica (incluso aumenta) los niveles de anticuerpos circulantes y no altera la evolución de las lesiones extracutáneas (dependientes de mecanismos autoinmunes de tipo humoral)<sup>59,60</sup>.

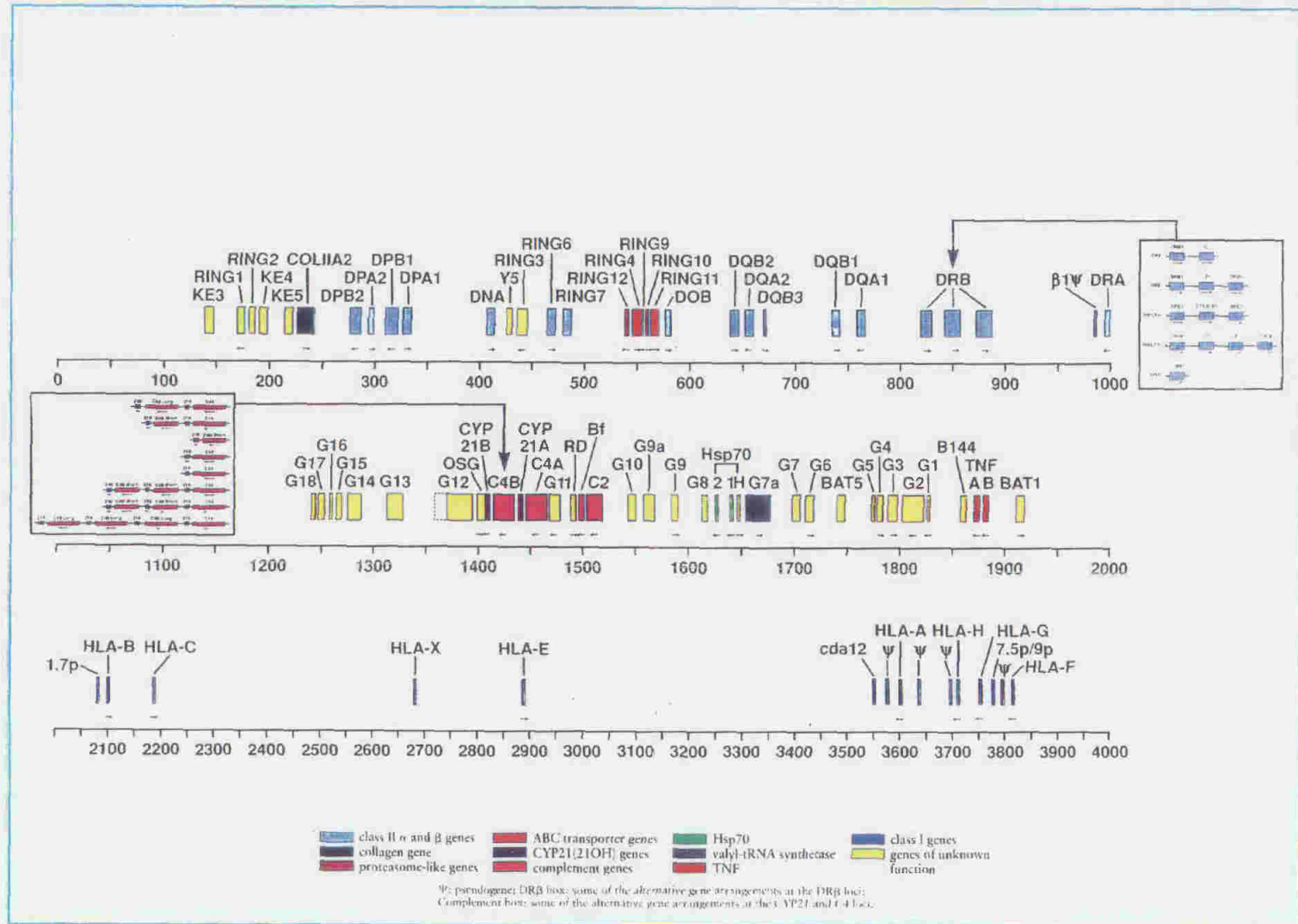
## 1.2.- EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD HUMANO

En los últimos 30 años se ha progresado mucho en el conocimiento del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH); tanto en lo que se refiere a su estructura como en lo relativo a su importante función en el control de la respuesta inmune<sup>61-63</sup>. Desde la descripción, ya clásica, de la asociación entre la presencia de HLA-B27 y el desarrollo de espondiloartritis seronegativas<sup>64</sup>, a principios de la década de los 70, se ha profundizado específicamente acerca del papel que puede jugar el CMH en el desencadenamiento de distintas enfermedades, especialmente en el campo de la patología sistémica.

### A) ESTRUCTURA Y ORGANIZACION GENOMICA

El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), que en el hombre se denomina sistema HLA, está constituido por diversos genes estrechamente unidos y localizados en el brazo corto del cromosoma 6<sup>65</sup> (Fig. 1.2). Estos genes codifican moléculas proteicas, muchas de ellas con una función clave en la respuesta inmune, y están caracterizados por un marcado polimorfismo alotípico (variabilidad entre individuos de la misma especie). Los genes de A, B y C codifican las moléculas de clase I; los genes DR, DQ y DP codifican las moléculas de clase II; y los genes de los C2, BF, C4A, C4B, 21-OHA y 21-OHB codifican las moléculas de clase III<sup>66</sup>. Además, los genes que codifican el factor de necrosis tumoral y la linfoxina ( $TNF\alpha$  y  $TNFB$ , respectivamente)<sup>67</sup> y dos genes que codifican la proteína de shock por calor (HSP) están también localizados en esta región. Los genes TAP, a los que nos referiremos muy especialmente en este trabajo, se sitúan entre los genes DP y DQ.

Fig. 1.2.- Mapa Genético del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Humano<sup>65</sup>.



De cada gen existen varios *alelos* (formas alternativas de un gen). Algunos epitopos (determinantes antigénicos) son compartidos por varias moléculas o antígenos (proteína codificada por el gen correspondiente) y se les denomina *epitopos públicos o supertípicos*, pero cada molécula tiene sus epitopos propios que las distinguen de las demás.

Los genes HLA están estrechamente ligados en el cromosoma y por lo general se heredan juntos como una unidad (*haplotipo*). Determinados alelos de cada gen muestran una clara tendencia para asociarse con determinados alelos de otros genes, fenómeno que se conoce como *desequilibrio de ligamiento*. Por tanto, determinados haplotipos se encuentran con una frecuencia mayor de la esperada en la población y muestran una clara variación en las distintas etnias.

#### **a) Moléculas de clase I**

En la figura 1.3 se representa esquemáticamente la estructura general de una molécula de clase I. Se encuentran en todas las células nucleadas del organismo. Son moléculas heterodiméricas formadas por una cadena pesada  $\alpha$  unida de forma no covalente a una cadena ligera, la  $\beta_2$  microglobulina. La cadena  $\alpha$ , variable, está codificada por el sistema HLA pero la  $\beta_2$  microglobulina (que por el contrario, posee una estructura constante) está codificada por un gen ajeno al CMH y localizado en el cromosoma 15<sup>68</sup>. La cadena  $\alpha$  tiene tres porciones, una intracelular, otra transmembrana y otra extracelular<sup>69</sup>. La estructura primaria de la porción extracelular se divide en tres dominios,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  (este último, unido a la porción transmembrana). El dominio  $\alpha 3$  es similar en su estructura terciaria a la  $\beta_2$  microglobulina y entre las dos se establece una interacción no covalente. Los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  contienen 2 residuos de cisteína involucrados en la formación de un puente disulfuro intracatenario; en esta localización es donde radica la mayoría de las diferencias entre distintas moléculas y donde se establece la interacción con los antígenos

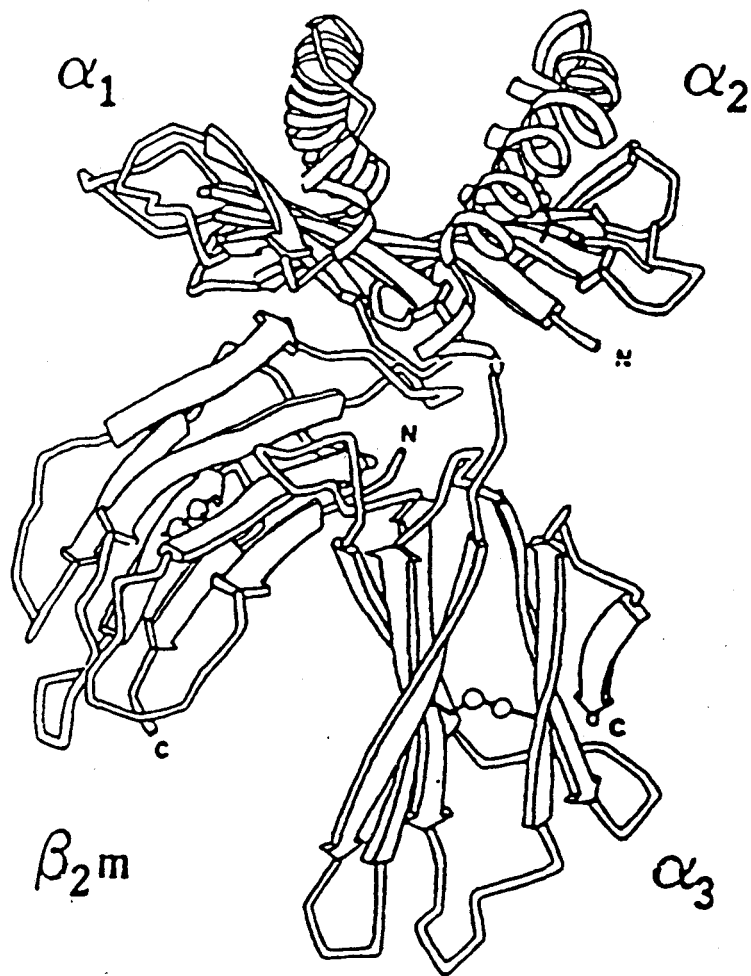


Fig. 1.3.- Estructura de una molécula HLA de clase I (HLA-A2).

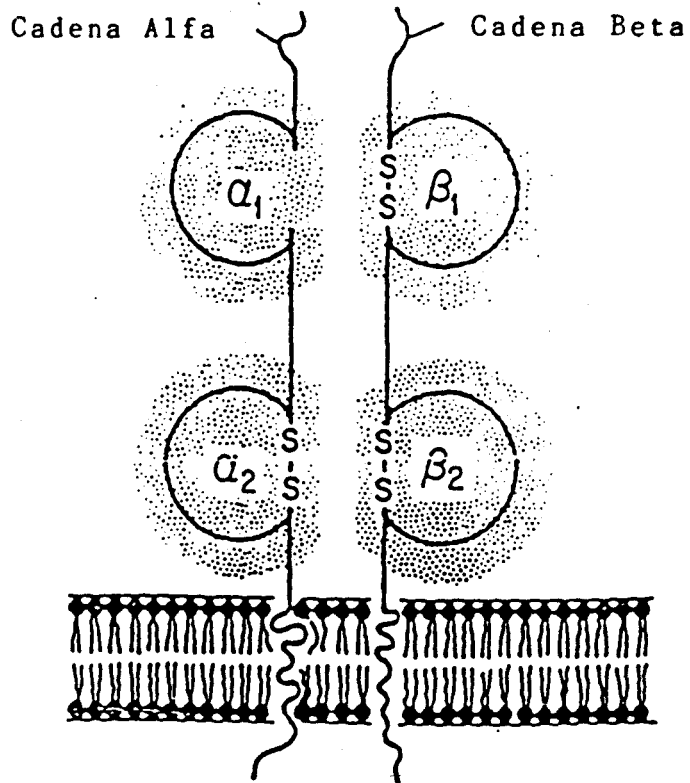
extraños<sup>70</sup>. En función de esta organización en dominios se consideran a las moléculas de clase I miembros de la familia de las inmunoglobulinas (Igs), que comprende un conjunto de proteínas con una estructura común, cuya unidad básica es un dominio globular<sup>71</sup>.

Actualmente se conoce la secuencia de algunos genes que codifican para moléculas de clase I<sup>66,67</sup>. Hay 8 exones separados por 7 intrones. El primer exón codifica para 21-24 aminoácidos que no están en la proteína expresada en la membrana, los exones 2, 3 y 4 codifican, respectivamente, los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ . El exón 5 codifica el péptido que conecta la región extracelular con la parte que atraviesa la membrana y el propio péptido transmembrana y los exones 7, 8 y 9 codifican la región intracitoplásmica; el último exón contiene el segmento 3' del gen que no se traduce<sup>72</sup>.

Una de las características más sobresalientes del CMH, como ya hemos mencionado, es su extremado polimorfismo<sup>73</sup>. La mayoría de las diferencias conocidas entre las secuencias de aminoácidos se hallan localizadas en 6 segmentos: 3 en el dominio  $\alpha 1$ , otras dos en el dominio  $\alpha 2$  y una en la zona que separa  $\alpha 2$  de  $\alpha 3$ . Por el contrario la estructura del dominio  $\alpha 3$  tiende a permanecer constante.

#### **b) Moléculas de clase II**

Son glicoproteínas heterodiméricas constituidas por una subunidad  $\alpha$  y otra  $\beta$ , unidas de forma no covalente (Fig. 1.4). Ambas tienen tres porciones, una intracelular, otra transmembrana y otra extracelular, y están codificadas por genes de la región HLA. La porción extracelular se divide en dos dominios,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , y  $\beta 1$  y  $\beta 2$  respectivamente.



**Fig. 1.4.- Estructura de una molécula HLA de clase II.**



Los dominios  $\alpha 2$  y  $\beta 2$ , proximales a la membrana, tienen una estructura semejante a la porción constante de las superfamilias de las inmunoglobulinas por lo que se las considera miembros de la misma<sup>74</sup>. Se expresan sólo en las células procesadoras de antígenos (monocitos-macrófagos fundamentalmente), linfocitos B y linfocitos T estimulados. La expresión de los productos del CMH en la membrana celular se potencia por la acción de las moléculas de interferón. El interferón gamma induce, fundamentalmente la expresión de moléculas de clase II mientras que el interferón alfa/beta induce de forma preferente las de clase I a la vez que inhibe la expresión de moléculas de clase II inducida por el interferón gamma. En determinadas circunstancias, el interferón gamma tiene la capacidad de inducir la expresión de moléculas HLA en algunos tejidos donde habitualmente no se expresan (células epidérmicas, endoteliales, tiroideas, musculares o renales) circunstancia que parece tener mucha importancia en el desarrollo de respuestas autoinmunes. La mayor parte de las diferencias en las secuencias de aminoácidos entre las moléculas de clase II se concentra en los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ .

La región del sistema HLA que codifica las moléculas de clase II se llama HLA-D<sup>75</sup>. Estos genes codifican cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  y están agrupados en subregiones que se disponen a distancia creciente del centrómero en el siguiente orden: DP, DN, DO, DQ y DR. Codifican las moléculas de clase II DP, DQ y DR respectivamente. DN (contiene un sólo gen para cadena  $\alpha$ ) y DO (contiene solo un gen para cadena  $\beta$ ) no codifican ningún producto proteico y se comportan como pseudogenes<sup>76-80</sup>.

Los genes que codifican la cadena  $\beta$  están repartidos en 6 exones y los de la cadena  $\alpha$  en 5. Los dominios extracelulares de ambas cadenas son codificados por el segundo y tercer exón<sup>75</sup>.

### c) Moléculas TAP.

Estudios muy recientes han puesto de manifiesto que la exposición de los péptidos antigénicos (unidos a moléculas HLA), por parte de las células presentadoras, está precedida por una fase de procesamiento intracelular de los mismos cuyo resultado final es la escisión de su estructura primitiva en fragmentos más pequeños. Dichos fragmentos son los determinantes antigénicos o epitopos. Este procesamiento es distinto según los antígenos tengan un origen intracelular y vayan a ser presentados por moléculas de clase I y reconocidos posteriormente por linfocitos T citotóxicos (CD8+), o tengan un origen extracelular, vayan a ser presentados por moléculas de clase II y reconocidos posteriormente por linfocitos cooperadores (CD4+). En el último caso los péptidos exógenos son captados por endocitosis. El procesamiento de los mismos tiene lugar dentro del compartimento endosomal y lisosomal mediante proteasas denominadas catepsinas que provocan su fragmentación. Las catepsinas también facilitan la unión de los fragmentos con moléculas HLA de clase II en el interior de dicho compartimento. Estas moléculas HLA proceden del aparato de Golgi al que son transportadas desde su lugar de síntesis (el retículo endoplasmático)<sup>81-83</sup>.

Las moléculas de clase I, por el contrario, son utilizadas para la presentación de antígenos relacionados con péptidos endógenos. El procesamiento de los mismos comprende, en primer lugar, su fragmentación por un sistema enzimático especial, denominado LMP (*low molecular mass proteins*) descubierto por Mónaco y McDevitt<sup>84</sup> en 1982. El sistema LMP se relaciona muy estrechamente con el proteosoma 20S<sup>83,85-87</sup>. El proteosoma es un complejo multicatalítico de proteinasa, que se expresa ubicuamente, de gran importancia para la fragmentación no lisosómica de las proteínas previamente marcadas por el sistema ubiquitina<sup>83</sup>. Su estructura citoplasmática es semejante a un anillo y está muy conservada a lo largo de la evolución de las células

eucarióticas. Las dos estructuras, LMP y proteosoma, poseen actividad proteolítica, aunque no está claro si son diferentes en cuanto a especificidad. Algunos trabajos iniciales daban por sentado que el complejo LMP era un tipo especial de proteosoma<sup>85-87</sup>. Sin embargo parece que no son estructuras idénticas, aunque se supone que son afines ya que pueden ser distinguidas con anticuerpos anti-LMP<sup>86-87</sup>. Probablemente comparten un gran número de subunidades comunes lo cual explica que anticuerpos antiproteosoma inmunoprecipiten a ambos complejos<sup>88</sup>. La función del LMP sería más bien reguladora de la actividad del proteosoma<sup>89</sup>. Una atractiva hipótesis sugiere que las dos estructuras sólo difieren en la presencia o ausencia de las dos subunidades ligadas al CMH.

Se ha comprobado que los péptidos producidos por el complejo LMP constan, en su mayoría, de 9 aminoácidos<sup>90</sup>. Probablemente el complejo LMP esté diseñado especialmente para este fin ya que los fragmentos de dicho tamaño tienen una afinidad máxima para las moléculas de clase I<sup>88</sup>. Desde que se conoce la estructura cristalizada de las moléculas de clase I (concretamente HLA-A2), se sabe que existe una ranura en la porción más distal de la molécula, con respecto a la membrana, que puede acomodar un péptido que contenga desde 8 aminoácidos (en conformación lineal) a 25 aminoácidos (en conformación helicoidal). Es en esta ranura donde se disponen los residuos polimórficos de acuerdo con la distinta habilidad de cada una de las formas alélicas de las moléculas de clase I para unirse a una cierta variedad de péptidos. Es posible, aunque no absolutamente seguro, que exista una variabilidad individual de estos péptidos condicionada genéticamente por diferencias alélicas en los genes LMP y según la cual sería diferente la forma en que se realizara la escisión catalítica de cada proteína<sup>88</sup>.

Una vez escindidos los péptidos, sus fragmentos deben penetrar en el interior de las vesículas del retículo endoplasmático para unirse a las moléculas HLA de clase I<sup>90-92</sup>. Para ello han de ser captados por unos transportadores especiales, las moléculas TAP (*Transporter associated with antigen processing*), condición indispensable para atravesar la membrana del retículo endoplásmico (Fig. 1.5).

Las moléculas TAP son proteínas heterodiméricas, también de carácter polimórfico<sup>93, 94</sup>, ancladas en las membranas del retículo endoplasmático<sup>82</sup>. Se integran en la superfamilia de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) cuya función conocida hasta ahora era el transporte de péptidos a través de las paredes bacterianas. Actualmente se sabe que incluyen proteínas de multirresistencia a drogas y toda una serie de transportadores, tanto de bacterias como de células eucarióticas, capaces de unirse a proteínas, iones inorgánicos o hidratos de carbono<sup>96</sup>. Estas proteínas son heterodiméricas y constan de dos dominios hidrofóbicos y dos dominios *ATP-binding*.

La liberación de los péptidos desde el complejo LMP al transportador TAP, que reside en la membrana del retículo endoplásmico, puede realizarse por interacción física directa de las dos estructuras, por unión a péptidos transportadores (chaperonas) o por difusión simple. La formación del complejo trimolecular (cadena pesada, beta-2 microglobulina y péptido) viene facilitada por la acción de otra chaperona ligada a la membrana del retículo endoplásmico, denominada calnexina<sup>96</sup>. La calnexina tiene como funciones principales impedir la destrucción proteolítica de las cadenas pesadas libres, acelerar su ensamblaje a la  $\beta$ 2 microglobulina e impedir la migración de la molécula de clase I antes de que se haya unido al péptido correspondiente en el interior del retículo endoplasmático<sup>96, 97</sup>. Impediría, de esta manera, que moléculas de clase I

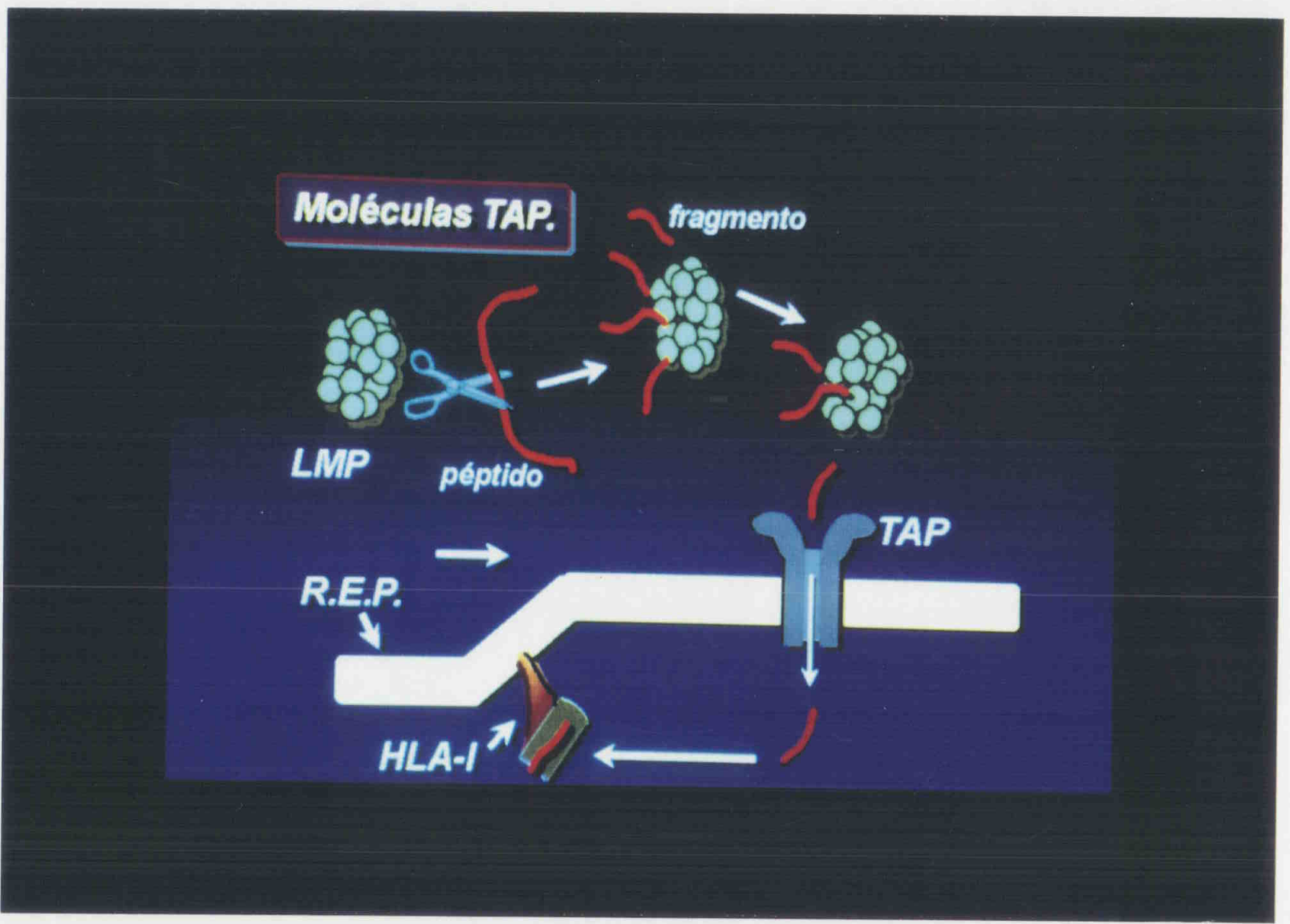


Fig. 1.5.- Esquema sobre la interrelación entre moléculas LMP y TAP.

*vacías* alcanzaran la superficie celular y se unieran a péptidos extracelulares que determinarían una citolisis inadecuada por parte de linfocitos CD8<sup>+</sup><sup>96</sup>. Se ha demostrado que la transferencia de péptidos entre las dos estructuras (LMP y TAP) depende de energía suministrada por ATP<sup>83</sup>. La observación de que la parte hidrofílica del carbono terminal de las moléculas TAP se une a ATP reforzaría la anterior afirmación<sup>98</sup>. Se ha comunicado que las moléculas HLA de clase II, pueden transportar también péptidos endógenos por un mecanismo independiente de los genes TAP y LMP, pero que precisa la actuación de otro gen localizado en situación próxima a ellos<sup>99</sup>.

Los péptidos son nuevamente liberados, esta vez por el transportador, hacia las moléculas de clase I del CMH previamente sintetizadas en la luz del retículo endoplásmico, por medio de alguno de los tres mecanismos citados anteriormente. Con posterioridad, las moléculas de clase I, al unirse al péptido, sufren un cambio conformacional que aumenta la estabilidad de su mutua unión. El conjunto molécula HLA-péptido penetra entonces en el aparato de Golgi y finalmente se produce la presentación del antígeno en la membrana celular<sup>100</sup>.

Esta forma distinta de procesar antígenos para linfocitos T cooperadores y citotóxicos tiene un sentido biológico: el linfocito T citotóxico tiene que reconocer aquellas células que contienen proteínas extrañas que se están reproduciendo en su interior para poder lissarlas posteriormente. Sin embargo no tendría sentido que se destruyeran células que han captado sustancias extrañas por endocitosis. En este último caso se estimulan a las células T cooperadoras para la consiguiente producción de anticuerpos frente al antígeno extracelular. Las dos variedades principales de moléculas HLA (I y II) constituyen, así, un sistema de selección y clasificación de los antígenos con un sentido teleológico.

## **B) POLIMORFISMO DE LAS MOLECULAS HLA, TAP Y LMP.**

### **a) Moléculas de clase I.**

En el caso de las moléculas de clase I, el estudio de las secuencias de aminoácidos conocidas hasta ahora, ha permitido establecer que su variabilidad está limitada a los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  y distribuida según 6 regiones hipervariables. Es suficiente la sustitución en ellas de un sólo aminoácido, para determinar diferencias radicales en la significación de estas moléculas<sup>73</sup>.

Para las moléculas de clase I el mayor polimorfismo reside en HLA-B, seguido de HLA-A. Las moléculas HLA-C tienen menos alelos y difieren en un número menor de aminoácidos. El dominio  $\alpha 1$  de estas últimas está muy conservado, lo que contrasta con la gran diversidad de esta región en las moléculas de clase I A y B. Este fenómeno, junto con el bajo nivel de expresión de HLA-C, resta importancia a su significado funcional.

Otra importante característica de las moléculas de clase I es el alto grado de reactividad cruzada que poseen y que viene determinada por el hecho de que distintas moléculas pueden compartir epitopos idénticos o muy similares<sup>80</sup>. La existencia de epitopos compartidos (*epitopos públicos*) permite asociar a los distintos antígenos que los comparten en grupos especiales. Se han definidos 7 grupos: tres para moléculas HLA-A y cuatro para HLA-B. En algunos casos, se ha podido establecer la topografía de algunos de estos epitopos dentro de la molécula. Se ha descrito un sistema dialélico Bw4/Bw6 que divide a los antígenos HLA-B en dos grupos según contengan uno u otro epitopo.

## **b) Moléculas de clase II.**

El polimorfismo de las moléculas de clase II, aún mayor, constituye una de las características intrínsecas de estas moléculas y es expresión de la peculiar organización genómica de la región HLA-D.

1.- Polimorfismo DR: Los productos de la subregión DR son muy polimórficos y esta variabilidad se expresa exclusivamente en las cadenas  $\beta$ . Existe un solo gen que codifica para la cadena  $\alpha$  (DRA) y que es constante (al menos desde el punto de vista funcional)<sup>79</sup>, y un número variable de genes para la cadena  $\beta$  (DRB). Los genes DRB son altamente polimórficos en secuencias<sup>73</sup>, así como en el número y formas alélicas presentes en diferentes haplotipos. Existen 5 genes que codifican la subunidad  $\beta$  y en cada uno de ellos hay descritos varios alelos. Del gen B1 (que se expresa siempre) se conocen 18 especificidades serológicas definidas por la cadena  $\beta$ 1. Las diferencias en las secuencias de las diferentes cadenas  $\beta$  se concentran en el dominio  $\beta$ 1 distribuidas en tres regiones distintas situadas entre los aminoácidos 9-13, 25-28, y 67-74<sup>101</sup>.

2.- Polimorfismo DQ: las especificidades serológicas DQ se hallan en desequilibrio de ligamiento con los diferentes tipos de antígeno DR. Existen dos genes para codificar cadenas  $\alpha$  y otros dos para cadenas  $\beta$ : A1, A2, B1 y B2 (A2 y B2 se comportan como pseudogenes)<sup>102</sup>. Hay un fuerte desequilibrio de ligamiento entre los alelos de DQ y DR. Además del polimorfismo individual de las cadenas DQ $\alpha$  y DQ $\beta$  existe una diversidad adicional fruto de la asociación de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  pertenecientes a diferentes haplotipos<sup>103</sup>. De esta forma, en un individuo heterocigoto, pueden expresarse 4 productos



DQ distintos: los formados por cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del mismo haplotipo (asociación *cis* y las formadas por cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de distinto haplotipo (asociación *trans*).

3.- Polimorfismo DP: En la subregión DP también hay dos genes DPA y dos DPB aunque solo se expresan los productos de los genes DPA1 y DPB1<sup>104</sup>. Hasta ahora no se han podido definir serológicamente las especificidades DP y se han clasificado mediante reacciones de linfocitos sensibilizados. Las nuevas técnicas de biología molecular han puesto de manifiesto el alto grado de polimorfismo de los genes DPA1 y DPB1.

El mecanismo de generación del polimorfismo de los antígenos HLA se desconoce pero hay en este sistema condiciones específicas que lo favorecen: existencia de múltiples *loci* muy relacionados y gran número de alelos para cada *locus*. Característicamente las diferencias estructurales suelen ser múltiples, aunque agrupadas en zonas variables, y por lo general, la variabilidad de cada posición está restringida a escasos aminoácidos diferentes.

### c) Moléculas TAP.

Se han descrito dos genes TAP, denominados TAP1 y TAP2. Estos genes están situados en el brazo corto del cromosoma 6, entre las subregiones DP y DQ de la región HLA de clase II. Su localización es muy cercana a la de los genes que codifican el complejo LMP (en realidad fueron descubiertos precisamente en el curso de investigaciones acerca de estos últimos)<sup>93, 105, 106</sup>. Cada uno de los productos codificados por dichos genes se unen para formar la proteína TAP heterodimérica<sup>107</sup>.

El polimorfismo de los genes TAP es muy extenso. En la rata existen más de 25 alelos conocidos para el gen TAP2. El polimorfismo en humanos es algo más limitado. Aunque hasta ahora no se ha demostrado con seguridad ninguna significación funcional de estas variaciones en el hombre, parece estar demostrada en roedores. Es posible que la variabilidad de los genes TAP humanos condicionen diferencias en los péptidos presentados por moléculas de clase I<sup>93,107,110</sup>.

**1.- Polimorfismo TAP1:** El locus TAP1 (que es el nombre utilizado en la nomenclatura actual para todas las especies) corresponde a las denominaciones previas HAM1 (en ratón), MTP1 (en ratas), Y3, PSF1 y RING4<sup>90,95,107,111,112</sup> (Fig. 1.2). Se han descrito dos sitios polimórficos en la molécula codificada por TAP1 (Tabla 1.1), uno de ellos se encuentra en la posición 333 (localizado en el dominio hidrofóbico) que puede estar ocupada por el aminoácido isoleucina (Ile) o valina (Val) y otro en la posición 637 (localizado en el dominio "ATP-binding") que puede estar ocupada por el aminoácido glicina (Gly) o ácido aspártico (Asp)<sup>113</sup>.

<b>Tabla 1.1. Polimorfismo TAP1.</b>			
NOMENCLATURA		POSICION DE aa	
		333	637
1A	TAP1*0101	Ile	Asp
1B	TAP1*0102	Val	Gly
1C	TAP1*0103	Val	Asp
1D		Ile	Gly

De esta manera se generarían cuatro combinaciones teóricas para TAP1 que han sido denominadas de distintas formas según los autores<sup>114</sup>. Muy recientemente se han descrito nuevos polimorfismos en humanos para el gen TAP1 que condiciona variaciones de aminoácidos en las posiciones 370 (Ala-Val), 458 (Val-Leu) y 648 (Arg-Gln)<sup>115</sup>

**2.- Polimorfismo TAP2:** En la molécula producto de TAP2 (cuya nomenclatura actual se corresponde con HAM2, MTP2, PSF2, o RING11)<sup>90</sup> se han encontrado cuatro sitios polimórficos (Tabla 1.2) localizados en las posiciones 379, que puede estar ocupada por valina (Val) o isoleucina (Ile); 565, que puede estar ocupada por alanina (Ala) o treonina (Thr); 665, que puede estar ocupada por treonina (Thr) o alanina (Ala) y 687, que puede estar ocupada por glutamina (Gln) o encontrarse, a nivel génico, un codón de parada prematura ("stop"). Estas combinaciones darían lugar teóricamente a 16 alelos distintos de TAP2 cuya nomenclatura es un poco compleja (dependiendo de los sitios polimórficos que se contemplen), sin embargo las combinaciones encontradas han sido muchas menos. Concretamente las formas 2A, 2B y 2C son muy frecuentes, las 2D y 2E muy poco frecuentes y hay combinaciones teóricas que no se han detectado nunca. La posición 379 está situada en el dominio hidrofóbico y las 565, 665 y 687 en el dominio *ATP-binding*<sup>113</sup>. Como se mencionó para las moléculas TAP1, se han descubierto con posterioridad nuevos ejemplos de polimorfismo para moléculas TAP2 (aunque la mayoría de ellos no dan lugar a modificaciones del producto, ya que los aminoácidos sustituidos son idénticos): posición 163 (Val-Val), 387 (Val-Val), 697 (Val-Val), 386 (Gly-Gly), 436 (Asn-Asn) y 651 (Arg-Cys)<sup>114, 116</sup>.

<b>Tabla 1.2. Polimorfismo TAP2.</b>				
NOMENCLATURA	POSICION DE aa			
	379	565	665	687
2A	Val	Ala	Thr	Stop
2B	Val	Ala	Ala	Gln
2C	Ile	Ala	Thr	Stop
2D	Ile	Thr	Thr	Stop
2E	Val	Thr	Thr	Stop
*	Ile	Thr	Ala	Gln
2G	Val	Thr	Ala	Gln
2H	Ile	Ala	Ala	Gln

(\*) No se ha encontrado nunca esta posible combinación.

#### **d) Moléculas LMP.**

Al menos dos subunidades del complejo LMP están codificadas por dos genes polimórficos localizados también en la región HLA de clase II, como ya se comentó, muy próximos a los genes TAP<sup>105, 106</sup>. Estos dos genes conocidos actualmente como LMP2 y LMP7, se corresponden con las antiguas denominaciones RING12 y RING10<sup>86, 117</sup> (Fig 1.2) y poseen un alto grado de conservación estructural demostrada en distintas especies<sup>118</sup>.

La posibilidad de asociación funcional directa entre el complejo LMP y los transportadores TAP está apoyada por las posiciones relativas, muy cercanas entre sí, de los genes LMP y los genes TAP, en el CMH<sup>88, 90</sup>. También sugiere la existencia de una interacción coordinada el hecho de que la expresión de todos ellos, así como la de los genes que codifican las moléculas HLA de

clase II, es estimulada conjuntamente por interferón gamma<sup>90</sup>. Beck et al<sup>118</sup> demuestran además la presencia de varios posibles elementos comunes de respuesta al estímulo con interferón (ISREs) en la secuencia de estos genes.

Todas estas circunstancias ofrecen una visión unificadora, del racimo de genes que consideramos, según la cual constituyen un conjunto perfectamente coordinado para una eficiente presentación del antígeno<sup>85,118</sup>. Se ha podido comprobar que ratones mutantes, deficientes para TAP1, presentan una gran inestabilidad en el ensamblaje y en el transporte intracelular de moléculas de clase I. Consecuentemente, tienen una expresión muy reducida de dichas moléculas y carecen casi por completo de células CD8<sup>+119, 120</sup>. Estas alteraciones son muy parecidas a las que se observan en la línea celular linfomatososa T murina RMA-S, mutante para TAP2<sup>121</sup>. Dichos defectos se corrigen mediante la transfección de cDNA del gen deficiente, ya sea para TAP1<sup>122</sup> como para TAP2<sup>123</sup>; la transfección en células 721.174 con cDNA TAP1 no corrige el defecto dado que dichas células sufren una delección en la región de clase II que engloba tanto a TAP1 como a TAP2<sup>122, 124</sup>. De la Salle et al<sup>125</sup> comunicaron dos casos de deficiencia heredada de proteína TAP2, debida a mutación del gen correspondiente, en dos hermanos HLA homocigóticos que sufrían infecciones bacterianas recurrentes. En ambos, la expresión de moléculas de clase I era muy baja, las células CD8<sup>+</sup> estaban disminuidas y la función de las células K estaba deprimida. Estos autores especulan acerca de la relación que puede tener el defecto de expresión de moléculas de clase I con la mayor frecuencia de infecciones bacterianas pulmonares y suponen que la causa sería la agresión pulmonar previa por infecciones virales (para las que sí intervienen las moléculas de clase I)<sup>125</sup>.

Si ha quedado demostrado el carácter indispensable de las moléculas TAP para el buen funcionamiento de la respuesta inmune, no ocurre otro tanto en lo que se refiere a moléculas LMP. Algunos autores comprueban que células deficientes en estas subunidades pueden presentar de forma muy eficiente los péptidos endógenos a las células T<sup>90,126,127</sup>. No se descarta, no obstante, que la función del complejo LMP pueda ser más cualitativa que cuantitativa influyendo en la actividad del complejo proteosómico. Por otra parte, además de la fragmentación del péptido en el espacio citoplasmático, se ha comprobado una ulterior fragmentación de elementos que contienen un número de aminoácidos más elevado en el interior del retículo endoplásmico. Pese a que las moléculas transportadoras TAP constituyen un sistema energético<sup>128, 129</sup> se ignora si poseen una acción directa sobre la fragmentación final de los péptidos en el interior de la citada estructura.

#### **e) Métodos utilizados para el estudio del polimorfismo.**

1.- Técnicas serológicas: El polimorfismo de los productos génicos HLA fue estudiado inicialmente por métodos serológicos (leucoaglutinación<sup>130</sup> y, actualmente, por linfotoxicidad dependiente de anticuerpo<sup>131</sup>). Estos métodos consisten en el reconocimiento de epitopos presentes en las moléculas HLA por anticuerpos aloespecíficos (monoclonales o policlonales). Por lo general se usan aloantisueros obtenidos de mujeres multíparas que han desarrollado anticuerpos frente a los antígenos HLA codificados por el haplotipo paterno de sus hijos. Los métodos serológicos presentan limitaciones importantes que afectan fundamentalmente a la definición de algunos subtipos de DQ, algunos subtipos de DRB1 (especialmente DR4 y DR6) y algunos alelos de DP. Estas limitaciones son consecuencia de los fenómenos de reactividad cruzada y del desequilibrio de asociación.

2.- Técnicas de tipificación celular: El segundo paso fue la utilización de métodos basados en la tipificación celular. Consisten en pruebas *in vitro* que se fundamentan en el cultivo mixto de linfocitos (MLC) en las cuales los linfocitos de una persona (respondedor) son cultivados con leucocitos, de otra persona, irradiados o tratados con mitomicina C para evitar su proliferación (estimulador). Los linfocitos T del respondedor proliferarán si las células estimuladoras presentan antígenos HLA incompatibles, especialmente antígenos de clase II controlados por la región HLA-D. De esta forma se establecieron las diferentes especificidades HLA-Dw<sup>132</sup>. Existen técnicas más depuradas en esta misma línea (cultivo con linfocitos sensibilizados (TLS) que han permitido definir determinantes celulares asociados a HLA-DR y la identificación del sistema HLA-DP<sup>133</sup>.

3.- Técnicas de tipificación bioquímica: Existen diversas técnicas de tipificación bioquímica que, por lo general, requieren marcaje radioactivo de las proteínas celulares y posterior inmunoprecipitación con un anticuerpo monoclonal específico<sup>134</sup>. Son especialmente útiles para detectar variantes bioquímicas que se han definido serológicamente.

4. Técnicas de tipificación de HLA a nivel molecular: Finalmente, la aplicación de la metodología de la genética molecular al estudio del polimorfismo HLA ha conducido a la aparición, en los últimos años, de varias técnicas para la tipificación HLA a nivel molecular. La técnica inicial de tipificación HLA-ADN fue la determinación de la variación en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)<sup>135</sup> pero, posteriormente, se han desarrollado nuevos métodos de tipificación HLA-ADN, todos ellos basados en la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de segmentos

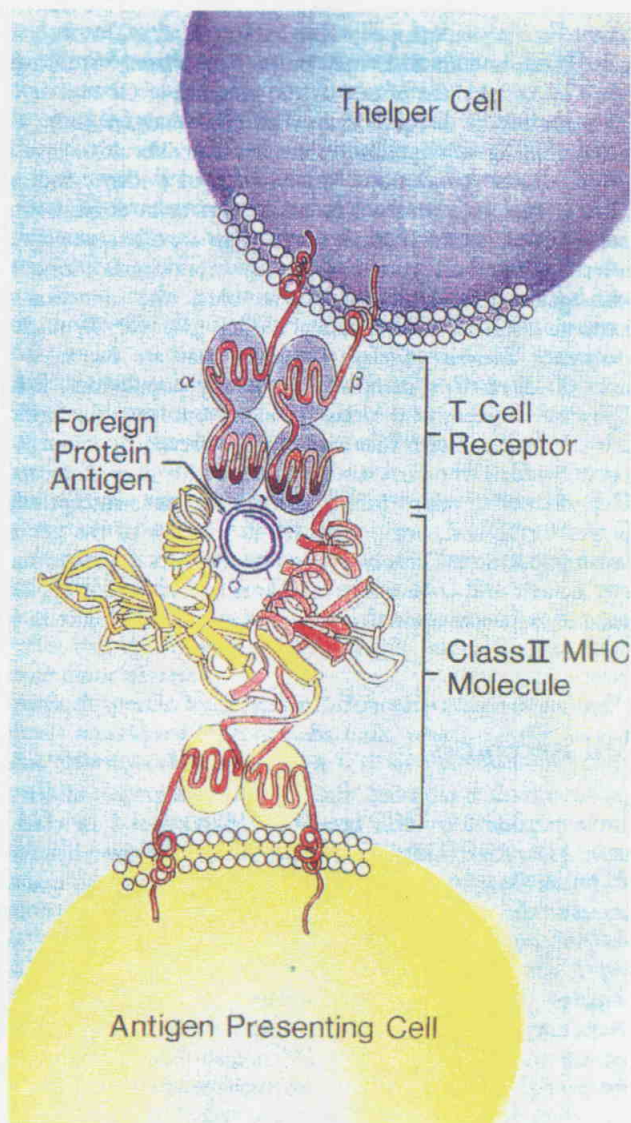
de ADN que codifican las porciones más polimórficas de las moléculas HLA: tipificación con oligonucleótidos específicos de secuencia (PCR-SSO)<sup>136</sup>, PCR-RFLP<sup>137</sup>, amplificación con cebadores específicos de secuencia (PCR-SSP)<sup>138</sup>. Nos referiremos especialmente, más adelante, a la técnica denominada PCR-ARMS (sistema de reacción de polimerasa en cadena con amplificación refractaria a la mutación) ya que es la que se ha utilizado en el estudio de las moléculas TAP en el presente trabajo<sup>113</sup>.

### C) FUNCION DEL CMH

El CMH juega un papel clave en la presentación y reconocimiento de antígenos por parte de linfocitos T. Estos solo reconocen epitopos antigénicos en forma de péptidos unidos a moléculas HLA presentes en las membranas de las células presentadoras de antígenos (Fig 1. 5)<sup>139</sup>. Estas, procesan la molécula antigénica hasta obtener fragmentos peptídicos que son *presentados* por moléculas de clase I y II<sup>140</sup>. A raíz de la resolución de la estructura cristalina de una molécula de clase I (HLA-A2)<sup>70</sup> se ha podido conocer mejor la forma en que se presentan los aloantígenos. En los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  los aminoácidos se disponen con una configuración  $\alpha$  helicoidal que sirve de pared a la *hendidura* o *pliegue*, zona donde se realiza la unión con el antígeno. La mayoría de las regiones hipervariables están en la *hendidura*. La localización de las zonas hipervariables está en relación tanto con el reconocimiento del antígeno como con la interacción con los receptores de los linfocitos T citotóxicos.

No se conoce la estructura tridimensional de las moléculas HLA de clase II pero se ha sugerido un modelo hipotético por homología con las moléculas de clase I<sup>141</sup>. Se supone que hay dos  $\alpha$ hélices paralelas, una perteneciente a la cadena  $\alpha$  y otra a la  $\beta$ , con puentes entre ellas, con





**Figura 1.5. Presentación-reconocimiento del antígeno.**  
(Interacción trimolecular: molécula HLA-fragmento peptídico-receptor de célula T)<sup>139</sup>

disposición beta-plegada, para formar la *hendidura* en donde se establecería la unión con el antígeno. Existen tres zonas hipervariables en el dominio de la cadena  $\beta$ , uno en la *pared* y dos en la *hendidura*.

Esta presentación es distinta para antígenos intracelulares y para los antígenos solubles. En el caso de un antígeno intracelular se requiere que este, una vez procesado por la célula hasta obtener la porción antigénica del mismo, sea expuesto en su superficie unido a las moléculas de clase I CMH. Los linfocitos T citotóxicos (CD8+) sólo reconocerán al antígeno si son presentados en unión con moléculas HLA de clase I<sup>40</sup>.

Los antígenos solubles son procesados por la célula presentadora y exhibidos en unión con las moléculas de clase II de su superficie. Los linfocitos T cooperadores (CD4+) sólo reconocerán aquellos antígenos presentados por moléculas de clase II<sup>41</sup>. La reacción inmune es, entonces, menos directa que en el caso anterior.

Las moléculas de clase I y II establecen una restricción en la capacidad de respuesta de los linfocitos limitándola a los antígenos que van presentados junto con las moléculas HLA (previamente se han reconocido como propias). El antígeno procesado presenta una afinidad determinada por las estructuras expuestas en la *hendidura* de las moléculas, tanto de clase I como II, anteriormente descritas.

Cambios cualitativos o cuantitativos en la expresión de estos antígenos del CMH pueden influir en la presentación del mismo y por tanto regular la cantidad o calidad de la respuesta inmune. Este fenómeno, que depende del fenotipo HLA, es responsable de la diversidad de

respuesta inmune entre los individuos y condiciona, al menos en parte, su susceptibilidad y predisposición frente a determinadas enfermedades<sup>64</sup>.

Los genes LMP y genes TAP, que son polimórficos, son elementos que pueden influir decisivamente en la expresión cuantitativa y cualitativa de los péptidos antigénicos de origen endógeno que presentarán las moléculas HLA de clase I. Así, el polimorfismo en LMP puede conducir a la producción de diferentes series de péptidos en distintos individuos, mientras que el polimorfismo en el TAP puede resultar en diferentes subgrupos de péptidos para ser transportados dentro del retículo endoplásmico. El resultado final en ambos casos sería la presentación de diferentes epitopos del mismo antígeno, a las células T, en diferentes individuos.

Si esto es cierto, tendría obvias implicaciones en la respuesta inmune por diferencias individuales para un antígeno concreto, así como para la inducción de tolerancia, la predisposición a la autoinmunidad y la aparición de enfermedades asociadas al CMH<sup>88</sup>. Células HLA I idénticas presentarían un mismo antígeno de distintas formas<sup>88</sup>. Son aún muy incompletas las consideraciones que pueden hacerse sobre la importancia de mecanismos parecidos a los comentados pero en relación con las moléculas de clase II<sup>81, 142</sup>.

#### **D) CMH Y PREDISPOSICION A ENFERMEDAD .**

Se supone que, en la mayoría de las enfermedades sistémicas, existen factores ambientales y genéticos que cooperan para inducir y perpetuar una respuesta inflamatoria inadecuada. Por otro lado, en la mayoría de ellas, se describe agregación familiar y concordancia (aunque no absoluta) en gemelos. En los últimos años se han relacionado algunas de las moléculas del CMH con más de 100 enfermedades. La mayor frecuencia de determinado antígeno, aislado o en asociación,

en grupos de personas afectas de determinada enfermedad con respecto a la población normal hizo surgir el concepto de riesgo relativo (RR), expresado por la fórmula de Woolf<sup>143</sup>. Un RR mayor de 2 confiere una mayor probabilidad de padecer la enfermedad, y un RR menor de 1 indica una asociación negativa con respecto a la misma.

Cualquier hipótesis para explicar esta asociación tendría que explicar también el hecho de que la gran mayoría de las personas, siendo portadoras del mismo antígeno, no padecen la enfermedad (no existe hasta ahora ninguna asociación absoluta, al cien por cien, entre antígeno de histocompatibilidad y enfermedad). Dado que se trata de un sistema caracterizado por el polimorfismo y, sobre todo para las moléculas de clase I, por las reacciones cruzadas, hay muchas razones teóricas para que esta relación no sea absoluta:

- Varios antígenos, clásicamente implicados con el desarrollo de determinadas enfermedades, constan de distintos subtipos conocidos y puede que la asociación se establezca sólo con un determinado subtipo.
  
- Las enfermedades suelen ser heterogéneas en cuanto a intensidad y tipo de sintomatología. Es posible que sólo determinadas variedades de una enfermedad se asocien a un antígeno concreto (por ejemplo, formas con sacroileítis de la artritis psoriásica y B27).
  
- Si un determinado epitopo, compartido por más de una molécula, fuera el verdadero determinante de la enfermedad no existiría una relación absoluta con ninguno de los antígenos que lo compartieran.

- Puede que se requiera la asociación de dos antígenos, más específicamente, de una determinada asociación de subtipos concretos de dos antígenos determinados (especialmente moléculas DR ó DQ).
  
- La existencia de desequilibrio de ligamiento entre los distintos elementos del haplotipo plantea la posibilidad de que el antígeno implicado no sea el relacionado con la enfermedad sino un gen próximo a él en ese haplotipo. También se ha planteado que la asociación estuviese condicionada por variaciones en los receptores de linfocitos T. Dada la restricción impuesta por las moléculas del CMH, estas serían marcadores indirectos.
  
- Las moléculas HLA se comportan como presentadores de antígenos de factores ambientales (virus, bacterias): durante este proceso, los antígenos pueden sufrir cambios, o presentar similitudes estructurales con los antígenos propios, de tal manera que, o bien no sean reconocidos como extraños o, por el contrario, puedan inducir fenómenos de autoinmunidad que desencadenen el proceso patológico.

Pero las causas de la inconstancia de la asociación de determinadas moléculas HLA con enfermedades sistémicas concretas no tienen por qué limitarse a las que se han analizado hasta ahora: variabilidad de los antígenos reconocidos y pleomorfismo de las moléculas transportadoras (productos del sistema HLA). Como hemos visto, entre el antígeno *virgen* (sea cual sea este) y su presentación al sistema efector (linfocitos) hay un complejo mecanismo de elaboración en el interior de las células presentadoras.

Se dijo que las moléculas HLA poseen una zona especializada para la recepción de fragmentos de antígeno (nunca de la totalidad de la molécula). La posibilidad de unión a uno de esos fragmentos no es demasiado exigente: basta con que se acomoden bien un par de aminoácidos (normalmente los extremos del fragmento). Ya comentamos que la proteína antigénica *bruta* tiene que ser fragmentada por el sistema LMP que, al ser codificado por genes polimórficos da lugar a que los fragmentos resultantes sean distintos de un individuo a otro. En segundo lugar, los transportadores TAP, codificados también por genes variables, se comportan como elementos de selección de los fragmentos: su variable conformación conlleva una variación en los fragmentos *elegidos*.

Por lo tanto, volvemos a insistir, individuos sometidos a un mismo **ambiente de antígenos** y **con sistemas de exposición** (moléculas HLA) idénticos pueden presentar **fragmentos peptídicos** absolutamente diferentes a las células efectoras del sistema inmunitario. La respuesta de este último (incluida la enfermedad por autoinmunidad) tiene que ser razonablemente distinta pese a las citadas coincidencias.

En consecuencia, probablemente nunca será posible establecer relación de absoluta identidad entre una enfermedad y determinada molécula HLA (ni en el hipotético caso de que se llegase a poseer métodos de reconocimiento absolutamente exacto de las mismas) porque:

- Los péptidos *crudos* (¿virales?) pueden ser muy diferentes dependiendo del ambiente.
- Sus fragmentos serán diferentes de uno a otro individuo dependiendo del tipo de LMP que le corresponda en herencia.

- Las moléculas TAP seleccionan diferentes fragmentos de uno a otro individuo por la misma razón.

Son muy escasos, discordantes y, todos ellos, muy recientes los trabajos que analizan posibles asociaciones entre algunas enfermedades de naturaleza autoinmune y el polimorfismo de los genes TAP o LMP. Maksymowych et al<sup>144</sup>, en pacientes con espondilitis anquilosante o con uveítis en individuos HLA-B27 positivos, comprobaron un descenso de LMP2. Burney et al<sup>145</sup> por el contrario, encontraron tan sólo un incremento de los alelos TAP1C y TAP2E que suponen debido a desequilibrio de ligamiento entre dichos alelos y HLA-B27. También la asociación positiva hallada por Wordsworth et al<sup>146</sup> con TAP2D y negativa con TAP2B, en pacientes con artritis reumatoide en población inglesa, podría justificarse por desequilibrio de ligamiento (positivo y negativo, respectivamente) con DR4. Singal et al<sup>147</sup> comprobaron una fuerte asociación entre pacientes con artritis reumatoide y la presencia de TAP2A; así mismo encontraron una relación estadísticamente significativa entre dicho alelo y la presencia de DR4 en pacientes y no en controles. Marshal et al<sup>148</sup> observaron que la mayor frecuencia de TAP2D que encontraron en sus pacientes con artritis reumatoide podía explicarse, como en la serie de Wordsworth<sup>146</sup>, por desequilibrio de ligamiento con DR4 también comprobado en controles. Sin embargo encontraron ciertas asociaciones entre determinadas variantes de TAP2 y subtipos de DR4 exclusivamente en pacientes. En la artritis reumatoide juvenil se ha podido comprobar un importante incremento de TAP1B y TAP2C/D, en comparación con controles que, también en estos casos, se ha considerado de poco valor ya que se observó un fuerte desequilibrio de ligamiento entre dichos alelos y DR8 (tanto en pacientes como en controles)<sup>149</sup>. Stastny et al<sup>150</sup> también encuentran una elevación de TAP2C en pacientes con artritis reumatoide juvenil pero de forma independiente. En una serie de 89 pacientes con lupus eritematoso sistémico, estudiados por Davies et al<sup>151</sup>, no se

comprobó incremento de susceptibilidad relacionado con TAP2; además, los haplotipos predisponentes no se extendían a TAP2. Liblau et al<sup>152</sup> y Kellar-Wood et al<sup>153</sup> estudiaron las frecuencias de dichos alelos en pacientes con esclerosis múltiple sin encontrar asociaciones valorables, aunque observaron desequilibrio de ligamiento entre genes TAP2 y genes DR-DQ. En cuanto a la diabetes mellitus insulín dependiente, los estudios de asociación con genes TAP son discordantes. Caillat-Zuckman et al<sup>154</sup>, en población francesa, encuentran una asociación significativa entre homocigotos para alelo TAP2\*0101 y la presencia de anticuerpos anticélulas insulares además de un efecto protector para TAP2\*0201. Estas asociaciones no se justificarían por desequilibrio de ligamiento con los genes DR ni DQ. Estos autores proponen que los genes TAP podrían modular el espectro de los péptidos presentados en la superficie de la célula insular beta y, finalmente, también la respuesta dirigida contra estos péptidos. Por el contrario, Ronningen et al<sup>155</sup>, consideran que dichas asociaciones son secundarias y se deben a asociación con heterodímeros DQ que son los que realmente se relacionan con la enfermedad de un modo primario, y Yamazaki et al<sup>156</sup> atribuyen las asociaciones con TAP2 a desequilibrio de ligamiento con DR4. También Kawaguchi et al<sup>157</sup> descartan asociación entre genes TAP1 y 2 y genes LMP con la presencia de diabetes insulín dependiente. Jackson y Capra<sup>158</sup> comprobaron que el riesgo conferido por TAP1C para padecer diabetes tipo I era mayor que el relativo a ningún gen DP pero menor que el que confiere DQB1\*0303. Supone que TAP1C puede actuar asociado a DQ o que la influencia real depende sólo de DQ o de un gen desconocido situado entre DQ y TAP1. Algunas investigaciones se dirigen a comprobar la posible asociación de los genes TAP y la celiaquía, proceso estrechamente ligado a HLA-B8, DR3, DR7 y DQ2<sup>159</sup>. Tanto Powis et al<sup>160</sup> como Tighe et al<sup>161</sup>, opinan que el aparente incremento de algunos alelos TAP1 y TAP2, en pacientes con celiaquía, se debe a desequilibrio de ligamiento con DQ2, realmente más débil que los desequilibrios DR/DQ, y que la verdadera susceptibilidad a la enfermedad residiría en genes



de situación telomérica con respecto a TAP2. Gregory et al<sup>162</sup>, en pacientes con cirrosis biliar primaria, no encuentran asociación directa con genes TAP pero comprueban desequilibrio de ligamiento entre TAP1B y DR8, gen que confiere susceptibilidad a dicha enfermedad. Se ha descartado también la asociación de genes TAP en pacientes con deficiencia de IgA o inmunodeficiencia común variable<sup>163</sup>. Por último, Chevrier et al<sup>164</sup> comprobaron recientemente asociación entre la presencia de nefropatía membranosa y la presencia de TAP1B, asociación que era independiente de la presencia o ausencia de DR3.

### 1.3.- ASOCIACION ENTRE HLA Y ENFERMEDAD DE BEHÇET

Ohno en 1972<sup>18</sup> fue el primer autor que detectó una estrecha asociación entre enfermedad de Behçet y HLA-B5 (y posteriormente con su subtipo B51)<sup>19</sup>. Esta asociación se confirmó en la mayoría de países donde se ha estudiado (Turquía<sup>97</sup>, Italia<sup>98</sup>, Grecia<sup>99</sup>, Francia<sup>100</sup>, Japón<sup>104</sup>, Taiwan<sup>102</sup> y Méjico<sup>103</sup>) pero no en el Norte de Inglaterra<sup>104</sup>, Estados Unidos<sup>105</sup> ni Alemania<sup>106</sup>. Por lo general la asociación es mayor en los países donde, simultáneamente, es frecuente el alelo B51 en la población general y la prevalencia de la enfermedad es alta.

Diversos autores pusieron de manifiesto que la asociación con B51 es más estrecha en los pacientes con afección ocular<sup>110,111</sup>. Lehner<sup>110</sup> estableció una correlación entre las distintas moléculas HLA de clase I y el tipo de manifestaciones clínicas: B51 se relacionaría con manifestaciones oculares, B12 con las mucocutáneas y B27 con las articulares. Estos dos últimos datos

no han sido confirmados por otros autores. Actualmente está bien establecido que no hay ninguna relación entre B27 y enfermedad de Behçet<sup>8</sup>.

Ohno<sup>112</sup> comprobó nuevamente, en 1978, que la asociación se establece sólo con un subtipo de B5, el B51. A pesar de que el otro subtipo, B52, solo se diferencia del primero en 2 aminoácidos situados en la posición 63 y 67<sup>113</sup>. Por otra parte, los aminoácidos específicos, en esas dos posiciones de B51, se encuentran también en otros antígenos (B8, B14, B18, B35, B39, B65) sin que ninguno de ellos sea significativamente más frecuente en los pacientes con enfermedad de Behçet.

Ninguna otra molécula de clase I está tan claramente vinculada con la enfermedad como B51. Sin embargo, esta asociación no ha podido demostrarse en países como EEUU<sup>105</sup>, o Inglaterra<sup>97,104</sup> donde la incidencia de la enfermedad es baja aunque, en este último país, sí se encontró una frecuencia elevada de B51 en el subgrupo de pacientes con uveítis<sup>110</sup>. En el Norte de Japón la frecuencia de la enfermedad es más alta que en el Sur<sup>20</sup> y, curiosamente, los japoneses que emigran a EEUU no sufren la enfermedad<sup>21</sup>. Todos estos datos apuntan a que B51 no es elemento desencadenante por sí mismo y que requiere la cooperación de elementos ambientales, que parecen estar condicionados por factores geográficos, para que se desencadene la enfermedad.

Con respecto a moléculas DR los resultados son muy dispares<sup>102,114, 115</sup>. En cuanto a DQ, diversos autores detectan una mayor frecuencia de DQ3<sup>116</sup>, sobre todo alguno de sus subtipos, especialmente relacionados con la patología ocular de peor evolución<sup>115</sup>, así como una menor frecuencia de DQ1<sup>101,116</sup>. La relación de la enfermedad de Behçet con moléculas de clase III<sup>101 116</sup>

o con los genes que codifican el TNF $\beta$ <sup>101</sup> es algo diferente que en los controles, pero en ningún caso se alcanza una diferencia tan significativa como con B51.

Ohno<sup>117</sup> interpreta que la peculiar distribución de la enfermedad de Behçet a lo largo de la Ruta de la Seda se debe a un origen étnico común. Según este autor debió existir un haplotipo ancestral, que fue distribuido en esta zona por la población nómada que la recorrió durante siglos, y que el elemento patogénico debe estar localizado en el gen que codifica B51 o en una zona muy próxima a él en el haplotipo. De esta forma, las diferencias encontradas con moléculas de clase II, III y de TNF $\beta$  se explicarían por el diferente desequilibrio de ligamiento de cada una de ellas con B51.

Hay otro elemento que dificulta el análisis de la relación de B51 con la enfermedad de Behçet y es la diversidad de criterios diagnósticos utilizados en las distintas series. En la mayoría de publicaciones japonesas solo se habla de formas completas si existe patología ocular y no se consideran elementos diagnósticos otros síntomas cardinales (aftas orales, aftas genitales, afección ocular y artritis). Por el contrario, en países anglosajones no se considera obligatoria la presencia de patología ocular para establecer el diagnóstico y se da el mismo valor a las manifestaciones menos frecuentes de la enfermedad (patología neurológica o cutánea) que a los síntomas cardinales. El elemento que se considera imprescindible en todos los sistemas de criterios es la aftosis. De esta manera, no sabemos si la distinta frecuencia de B51 en los pacientes con enfermedad de Behçet es solo fruto de factores ambientales y genéticos o si, por el contrario, está sesgada, al menos en parte, por la forma de establecer el diagnóstico. También se puede interpretar que la enfermedad tenga un espectro distinto de manifestaciones, influido por factores ambientales y genéticos, y que la asociación con B51 esté solo en función de la afección ocular.

No conocemos ningún otro trabajo encaminado a estudiar la posible asociación de los genes TAP con este proceso. Esta tesis doctoral es una muestra del interés de nuestro grupo de investigación por el estudio de los factores desencadenantes (genéticos o ambientales) en la enfermedad de Behçet.

## **II.- OBJETIVOS.**

Se ha demostrado ampliamente la asociación de determinados alelos HLA de clase I y II tanto con la enfermedad de Behçet en sí misma como con determinadas variantes clínicas de dicha enfermedad. Sin embargo, no conocemos que exista ningún otro estudio, aparte del de nuestro grupo de trabajo, que analice el posible papel inductor que pueden jugar los genes TAP1 y TAP2 en este proceso.

Aunque se han encontrado relaciones con determinadas moléculas HLA de clase II (especialmente con moléculas DQ) la asociación más fuerte se produce, en esta enfermedad, con moléculas de clase I (asociación positiva con B51). Además, estas asociaciones tienen carácter discriminativo respecto a determinados subgrupos de pacientes. Así, B51 se asocia positivamente y B15 negativamente en pacientes con uveítis, mientras que las relaciones con estos mismos marcadores son inversas en los pacientes con afección del sistema nervioso central.

Las moléculas de clase I están ligadas funcionalmente de forma muy directa con los productos de los genes TAP (mientras que en la mayoría de los procesos en los que se han estudiado posibles relaciones con genes TAP, que hemos enumerado anteriormente, las asociaciones conocidas con moléculas HLA se refieren en su mayoría a las de clase II).

Consideramos, por lo tanto, de un gran interés continuar la línea de investigación seguida en nuestra Unidad de Colagenosis acerca de las relaciones entre enfermedad de Behçet y genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad ampliándola al estudio de moléculas TAP en un

esfuerzo por lograr establecer sistemas de marcadores más efectivos en el proceso que nos ocupa, en relación con el cual los problemas de diagnóstico y prevención entrañan grandes dificultades.

Nos hemos propuesto, en el planteamiento de este trabajo, los siguientes objetivos:

- 1.- Estudiar las frecuencias relativas de las formas alélicas de moléculas TAP1 y TAP2 en nuestra serie de pacientes con enfermedad de Behçet, previamente tipados para antígenos de clase I y II por métodos serológicos y mediante secuencia específica de oligonucleótidos.
- 2.- Comparar dichos resultados con los observados en una población control sana del mismo origen étnico.
- 3.- Valorar estadísticamente si existe una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad (y/o algunas de sus variantes sindrómicas) en individuos portadores de determinadas formas alélicas en concreto.
- 4.- Comparar la intensidad de dichas hipotéticas asociaciones en relación con la que confieren los genes de clase I y II utilizando para ello los resultados previamente obtenidos en nuestra propia serie.
- 5.- Analizar, en su caso, el carácter independiente o no con respecto a otros genes (desequilibrios de ligamiento con moléculas HLA) de las posibles asociaciones.

6.- Introducir, en un estudio de categorías, la positividad o negatividad para cada una de las formas alélicas TAP1 y TAP2 como variables cualitativas a fin de conocer si pueden ser de ayuda en la definición de distintos subgrupos de pacientes con enfermedad de Behçet.



### **III.- MATERIAL Y METODO.**

### 3.1. POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO:

La muestra de pacientes analizada consta de 57 individuos diagnosticados de enfermedad de Behçet mediante cualquiera de los sistemas de criterios descritos: O'Duffy<sup>13</sup>, Mason y Barnes<sup>12</sup>, *Behçet's Disease Research Committee of Japan*<sup>14</sup> o *International Study Group for Behçet's Disease de 1990*<sup>17</sup>. Esta muestra procede de la serie estudiada conjuntamente por la Unidad de Colagenosis y el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario "Virgen del Rocío", previamente tipada para antígenos HLA de clase I y II<sup>165, 166</sup>

Todos los pacientes fueron sometidos al mismo protocolo de estudio clínico que comprendía:

- A) Historia clínica con especial atención a las manifestaciones sistémicas de la enfermedad de Behçet.
- B) Estudio oftalmológico convencional o mediante angiografía fluoresceínica si procedía.
- C) Analítica convencional.
- D) Estudio inmunológico:
  - a) autoanticuerpos, factor reumatoide, complemento, test de tuberculina.
  - b) tipaje HLA para moléculas de clase I y II y moléculas TAP.
  - c) serología frente a virus herpes, citomegalovirus y virus B de la hepatitis.

### 3.2.- TÉCNICAS ESPECÍFICAS DE LABORATORIO:

#### A) TIPAJE HLA DE CLASE I Y II.

Había sido efectuado previamente con motivo de la Tesis Doctoral realizada por un miembro de nuestro grupo de trabajo en una serie más amplia (dentro de la cual estaban incluidos todos los pacientes de la serie actual)<sup>165</sup>. La metodología empleada y los resultados obtenidos han sido objeto de una publicación<sup>166</sup>, por lo que describiremos muy someramente la sistemática de estudio.

##### a) HLA de clase I:

Tipaje realizado, usando linfocitos de sangre periférica, mediante tests de microlinfocitotoxicidad, de acuerdo con la técnica standard NIH<sup>130</sup>, tanto en todos los pacientes como en 223 controles sanos (donantes de sangre y personal voluntario del hospital).

##### b) HLA de clase II:

Técnica de *oligotyping* tras amplificación por PCR: cincuenta y siete pacientes (previamente estudiados con técnica serológica) y 189 controles, se tiparon utilizando sondas oligonucleotídicas específicas de secuencia (PCR-SSO) que permiten identificar 12 especificidades HLA-DR y 12 alelos DQB1, según la técnica ya descrita<sup>167</sup> y que consta, fundamentalmente, de dos pasos:

1.- Amplificación mediante PCR de segmentos de DNA preseleccionados utilizando cebadores específicos para el segundo exón de los genes DRB1 y DQB1<sup>168</sup>. Como material de partida se emplearon células de sangre periférica.

2.- Tipaje mediante oligonucleótidos propiamente dichos: consistente en enfrentar el amplificado, obtenido en cada caso mediante PCR, con un panel de sondas oligonucleotídicas complementarias específicas para diferentes moléculas HLA-DR y para los diferentes alelos DQB1 que se pretendan tipar. Se emplearon 14 sondas oligonucleotídicas, para la tipificación genérica HLA-DR, que permiten identificar 12 especificidades HLA-DR y 14 sondas para la identificación de 12 alelos DQB1<sup>169</sup>. Se analizaron las diferencias, para cada una de las especificidades o alelos, entre la serie control y la serie de pacientes, tanto en su totalidad como agrupados según la sintomatología: serie ocular, cutánea, articular, digestiva, trombótica y neurológica.

## **B) TIPAJE PARA GENES TAP.**

### **a) Extracción de ADN.**

El ADN genómico se extrajo a partir de 100 µl de sangre periférica obtenida por venopunción que se recogió directamente en tubos estériles con anticoagulante (EDTA-K<sub>3</sub>). En un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se añade 1 ml de TE (Tris-Cl 10 mM pH 7.6, EDTA 1 mM, Sigma, pH 8.0) a 100 µl de sangre y se centrifuga durante 10 segundos a 13.000 x g. A continuación, el botón celular se resuspende en 1 ml de TE y, de nuevo, se centrifuga durante 10 segundos a 13.000 x g repitiendo este procedimiento 2 veces más para, finalmente, resuspender el botón en 100 µl de tampón K (KCl 50 mM, Sigma, Tris-ClH 10-20 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, Merck, 0.5% de Tween-20, Sigma, y 100 µg/ml de proteinasa K fresca, Sigma). Se incuba durante 45 minutos a 56°C para digerir las células y, posteriormente, durante 10 minutos a 95°C para inactivar las proteasas. En las reacciones de PCR se emplean 10 µl del lisado celular.

### **b) Amplificación utilizando PCR-ARMS.**

El tipaje de alelos TAP se realizó mediante técnica de PCR-ARMS. Los alelos relativos a los *loci* TAP1 y TAP2 se reconocen de acuerdo con la presencia de determinadas combinaciones polimórficas identificadas usando la técnica de PCR-ARMS (*polymerasa chain reaction-amplification refractory mutation system*) descrita por Powis et al<sup>113</sup> y que utiliza oligonucleótidos que se comportan como cebadores específicos para cada uno de los sitios polimórficos en estudio. Además, en cada reacción se introducen como control de amplificación, cebadores que amplifican la región adyacente no polimórfica. Con esta técnica se obvia el marcaje con radioisótopos, la digestión mediante endonucleasas de restricción y el análisis de la secuencia.

Las muestras de ADN genómico (0,1-1 µg) fueron amplificadas en 100 µl de mezclas de reacción que contenían 0,25 µg de cada cebador oligonucleotídico, 200 µM de cada dNTP, tampón de Taq DNA polimerasa 1x y 2 unidades de Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, WI). Las condiciones de reacción, usando un termociclador, fueron: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales consta de una etapa de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, otra de apareamiento de los cebadores que se realiza a 58 ó 60°C, dependiendo de los cebadores, durante 2 minutos y una etapa de extensión que se realiza a 72°C durante 2 minutos. Para terminar se realiza una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de la reacción fueron separados en un gel de agarosa al 2% al que se había añadido bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml<sup>113</sup>. El producto de reacción se visualiza en un transiluminador de ultravioleta, fotografiándose para la interpretación. En la tabla 3. 1 se detallan las secuencias de los cebadores que se emplearon, las temperaturas de apareamiento para las diferentes combinaciones de cebadores utilizadas, así como

el tamaño correspondiente tanto a la banda control de la secuencia adyacente no polimórfica, como a la banda específica para cada posible variante, en cada posición.

**c) Alelos TAP1 y TAP2:**

Los alelos del locus TAP1 y TAP2 fueron asignados de acuerdo con la presencia de variantes dimórficas: isoleucina o valina en la posición 333 y aspartico o glicina en la posición 637 para TAP1; isoleucina o valina en la posición 379, alanina o treonina en la posición 565 y alanina o treonina en la posición 665 para TAP2. Los alelos fueron definidos de acuerdo con la presencia de una determinada combinación para estas variantes dimórficas (Tablas 1.1 y 1.2).

De estudios previos con células homocigotas, se conoce que determinados alelos TAP1 y TAP2 son mucho menos frecuentes que otros, incluso algunas combinaciones en teoría posibles no se han encontrado nunca. Este hecho es de gran ayuda en los relativamente pocos casos donde los resultados obtenidos presentan varias interpretaciones alternativas. Esto sucede, por ejemplo, para TAP1 cuando en el mismo individuo se encuentra la combinación Val-333/Ile-333 y Gly-637/Asp-637 que puede ser debida a que dicho individuo presente los alelos TAP1A/TAP1B ó los alelos TAP1C/TAP1D. En este caso, la combinación mas probable es la primera, dado que el alelo TAP1C es menos frecuente y sobre todo a que la existencia de un alelo TAP1D es sólo hipotética, ya que no se ha encontrado en los estudios realizados con líneas celulares homocigotas. Lo mismo sucede con TAP2B, donde la combinación que da lugar a la interpretación TAP2B/2C es idéntica a la que se presentaría para TAP2A/2H, como TAP2H es un alelo muy raro, la presencia de Ile/Val-379 y de Thr/Ala-665, se interpretó siempre como TAP2B/2C. Por otra parte, TAP2A/2D daría lugar a una combinación idéntica a TAP2C/2E,

aunque esto no afectó al presente trabajo, ya que tanto TAP2D como TAP2E, presentan Thr-565, y la banda correspondiente a ésta no fue detectada en ningún individuo en este estudio.

### **C) ESTUDIO ESTADÍSTICO:**

**a)** Estudio descriptivo: comprende la determinación de la media aritmética, la desviación standard y los valores límites para todas las variables paramétricas y cálculo de porcentajes para las no paramétricas.

**b)** Las asociaciones simples se estudiaron mediante la prueba *t* de *Student* para datos no apareados, en el caso de variables continuas, y mediante la prueba de *ji* al cuadrado (con corrección de Yates o sustituyéndola por la prueba exacta de Fisher cuando el tamaño reducido de la muestra lo hizo necesario) si se trataba de variables no paramétricas. En todos los casos se rechazó la hipótesis nula cuando el valor *p*, de significación estadística, fue inferior a 0,05. Dicho valor se corrigió multiplicándolo en cada caso por el número de alelos investigados (Bonferroni), método equivalente al propuesto por Svejgaard<sup>170</sup>.

**c)** El riesgo relativo (RR) para cada forma alélica se estudió mediante la prueba de Wolf<sup>171</sup> corregida, cuando fue necesario, según el método de Haldane<sup>172</sup>.

**d)** Los datos evolutivos (dependientes de tiempo) se analizaron mediante curvas de supervivencia actuarial (método de Kaplan-Meier) y las relaciones entre grupos analizados paralelamente con dichas curvas, mediante el test de Mantel-Haenszel

e) En los casos en que se apreció desequilibrio de ligamiento entre dos alelos de diferentes *loci* se realizó el cálculo del valor  $\Delta$ . Un valor de 0, ó próximo a 0, indica que la asociación de dicho par de alelos se debe al azar. Valores positivos o negativos indican desequilibrio de ligamiento positivo y negativo respectivamente.

f) Para estudiar el posible agrupamiento de individuos ("*clusters*") y su interdependencia respecto a las distintas variables, se realizó un test multivariante de datos cualitativos interdependientes mediante análisis de categorías según método de Benzécri<sup>173</sup> desarrollado por Lebart et al<sup>174</sup>. Se relacionaron para ello las variables clínicas y biológicas que se consideraron más representativas. Las variables continuas (temporales especialmente) se transformaron previamente en categóricas que se delimitaron tras analizar su distribución en histogramas de frecuencias.

g) Los datos se recogieron en un fichero dBase III+ (Ashton-Tate, 1987) y se emplearon, para el análisis de los mismos, los paquetes estadísticos SPSS+ (SPSS Inc, 1994) y Kwikstat.4 (TexaSoft, 1994). Las fórmulas de Wolf, Haldane, Svejgaard y Bonferroni y el cálculo del valor  $\Delta$  se aplicaron mediante subprogramas elaborados por nosotros.



Tabla 3.1.- Cebadores utilizados para amplificación de los genes TAP 1 y TAP2				
Sitio polimórf.	Nombre	Secuencia oligonucleotídica	Especificidad	Tamaño
TAP1 Posición 333 (58°C)	TAP1/ARMS1 TAP1/ARMS2 TAP1/ARMS3 TAP1/ARMS4	5' -CCCTGCACTGAGATTTGCAGACCTCTGGAG- 3' 5' -GATCAGTGTCCCTCACCATGGTCACCCGGA- 3' 5' -GGGCAGAAGGAAAAGCAGAGGCAGGCTCAC- 3' 5' -ACCTGGGAACATGGACCACAGGGACAGGGT- 3'	Secuencia 5'* TAP1 Ile-333 TAP1 Val-333 Secuencia 3'**	Control-533 bp Ile-333 especific. - 241 bp Val-333 especific. -351 bp
TAP1 Posición 637 (58°C)	TAP1/ARMS5 TAP1/ARMS6 TAP1/ARMS7 TAP1/ARMS8	5' -CATCTTCCCAGAATCTCCCCTATCCAGCTA- 3' 5' -CATCTTGGCCCTTTGCTCTGCAGAGGTACA- 3' 5' -ACCCCTGACAGCTGGCTCCAGCCTCCC- 3' 5' -TGGGGAGGCATCCAATGGAAGTGGATTTGG- 3'	Secuencia 5'* TAP1 Asp-637 TAP1 Gly-637 Secuencia 3'**	Control-429 bp Asp-637 especific. -307 bp Gly-637 especific. -180 bp
TAP2 Posición 379 (58°C)	TAP2/ARMS1 TAP2/ARMS2 TAP2/ARMS3 TAP2/ARMS4	5' -TTGGAGGGCTGCAGACCGTTCGCAGTTTTG- 3' 5' -GAGACCTGGAACGCGCCTTGACCTGCGCG- 3' 5' -ACAACCACTCTGGTATCTTACCCTCCTGAT- 3' 5' -ACATAGCTCCCCACGCTCTCCTGGTAGATC- 3'	Secuencia 5'* TAP2 Val-379 TAP2 Ile-379 Secuencia 3'**	Control-427 bp Val-379 especific. -328 bp Ile-379 especific. -158 bp
TAP2 Posición 565 (60°C)	TAP2/ARMS5 TAP2/ARMS6 TAP2/ARMS7 TAP2/ARMS8	5' -CTCACAGTATGAACACTGCTACCTGCACAG- 3' 5' -TGTTCTCCGGTTCTGTGAGGAACAACAGTA- 3' 5' -ATCATCTTCGCAGCTCTGCAGCCATAAAC- 3' 5' -GGAGCAAGCTTACAATTTGTAGAAGATACC- 3'	Secuencia 5'* TAP2 Thr-565 TAP2 Ala-565 Secuencia 3'**	Control-400 bp Thr-565 especific. -161 bp Ala-565 especific. -298 bp
TAP2 Posición 665 (58°C)	TAP2/ARMS9 TAP2/ARMS10 TAP2/ARMS11 TAP2/ARMS12	5' -TTGGGGAATGGAATCCGGTGGTGTGAGGGC- 3' 5' -CAGTGCTGGTGATTGCTCACAGGCTGCAA- 3' 5' -CACCAGGATCTGGTGGCGCGCTGAACTAC- 3' 5' -TCAGCCGCTGCTGCACCAGGCGGGAATAGA- 3'	Secuencia 5'* TAP2 Thr-665 TAP2 Ala-665 Secuencia 3'**	Control-408 bp Thr-665 especific. -141 bp Ala-665 especific. -326 bp

(\*) Secuencia 5': cebador derecho para la secuencia adyacente.

(\*\*) Secuencia 3': cebador izquierdo para la secuencia adyacente

## **IV.- RESULTADOS:**

#### 4.1.- DATOS EPIDEMIOLÓGICOS:

La prevalencia de la enfermedad de Behçet, en nuestro medio, ha sido calculada con anterioridad por nuestro grupo en un valor aproximado de 9/100.000 habitantes (valor obtenido de acuerdo con la proporción de pacientes procedentes del área asistencial atendida por nuestro Hospital)<sup>165</sup>, tal como se expresa en la figura 4.1. La serie objeto de este trabajo, que fué incluida en dicha valoración, comprende 57 pacientes. Sus principales características epidemiológicas están descritas en la tabla 4.1.

Para el diagnóstico de la enfermedad de Behçet nos basamos fundamentalmente en los criterios de O'Duffy y Goldstein<sup>13</sup>. No obstante se aceptó el diagnóstico cuando, en su defecto, se cumplieron suficientes criterios de cualquiera de los otros sistemas admitidos. La valoración del diagnóstico se realizó mediante análisis simultáneo de cuatro sistemas de criterios según programa informático elaborado por nosotros (Tabla 4.2).

<b>Tabla 4.1.- Datos epidemiológicos.</b>	
Número de pacientes	57 (28 hombres; 29 mujeres)
Edad en el momento del estudio:	41,6 años (D.S.= 12,7; límites 18-77).
Edad de inicio:	28 años (D.S.= 11,8; límites 10-66).
Retraso del diagnóstico:	6,9 años (D.S.= 9,8; límites 0-36).



Figura 4.1.- Distribución territorial, en Andalucía, de la enfermedad de Behçet.

## 4.2. DATOS CLINICOS

### A) VALORACIÓN GENERAL.

En la tabla 4.3 se recogen los datos clínicos más relevantes, relacionados con la enfermedad de Behcet, que presentaba cada uno de los pacientes: triada clásica (aftas orales, aftas genitales y afección ocular), manifestaciones cutáneas, neurológicas, articulares, digestivas, tromboflebitis y epididimitis. Otras manifestaciones clínicas, menos frecuentes, no figuran en dicha tabla pero se comentarán más adelante. En la tabla 4.4 se recoge la frecuencia relativa de dichas manifestaciones y en la tabla 4.5 se detallan los síntomas que estuvieron presentes en el inicio de la enfermedad. Se comprobaron antecedentes familiares de la enfermedad en 3 pacientes de la serie (5,3 %) no emparentados entre sí.

<b>Tabla 4.2.- Criterios diagnósticos.</b>			
<b>CRITERIOS</b>	<b>TIPO</b>	<b>PACIENTES=57</b>	<b>%</b>
<b>O'DUFFY Y GOLDSTEIN</b> 1976.	<b>COMPLETO</b>	55	96,5
	<b>INCOMPLETO</b>	2	3,5
<b>MASON Y BARNES</b> 1969.	<b>DIAGNOSTICO</b>	52	91,2
	<b>NO DIAGNOSTICO</b>	5	8,8
<b>COMITE JAPONES</b> 1979.	<b>COMPLETO</b>	18	31,6
	<b>INCOMPLETO</b>	30	52,6
	<b>NO DIAGNOSTICO</b>	9	17,8
<b>COMITE INTERNACIONAL</b> 1990	<b>DIAGNOSTICO</b>	45	79
	<b>NO DIAGNOSTICO</b>	12	21

TABLA 4.3.

## MANIFESTACIONES CLINICAS FUNDAMENTALES EN PACIENTES.

<u>PAC.N°</u>	<u>SEXO</u>	<u>UORA</u>	<u>UGEN</u>	<u>CUTA</u>	<u>OFTL</u>	<u>NEUR</u>	<u>ARTIC</u>	<u>TFLEB</u>	<u>EPID</u>	<u>DIGES</u>
1	M	1	1	1	1	0	1	0	0	0
2	M	1	1	0	0	0	1	1	0	0
3	V	1	0	1	1	0	0	0	0	0
4	M	1	1	1	1	0	0	1	0	0
5	V	1	1	1	0	0	1	0	1	1
6	M	1	1	1	1	0	1	0	0	0
7	M	1	1	1	1	0	0	0	0	0
8	V	1	1	1	1	0	1	0	0	0
9	V	1	1	0	0	1	1	1	0	0
10	V	1	1	1	0	0	1	0	0	0
11	V	1	1	1	0	0	1	0	0	0
12	V	1	1	1	1	0	1	0	1	0
13	V	1	0	0	1	1	1	0	0	0
14	M	1	1	0	1	0	1	0	0	0
15	M	1	1	0	1	0	0	0	0	1
16	V	1	0	1	1	0	0	0	0	0
17	M	1	1	1	1	0	1	0	0	0
18	M	1	1	1	0	0	0	0	0	0
19	V	1	1	0	1	0	0	0	0	0
20	V	1	0	0	0	1	0	1	0	1
21	V	1	1	0	1	0	0	0	0	0
22	V	1	0	1	1	0	1	0	0	0
23	M	1	1	1	1	0	0	0	0	0
24	M	1	1	0	0	0	1	0	0	0
25	M	1	1	1	0	0	1	0	0	1
26	V	1	1	0	1	0	0	0	0	0
27	V	1	1	1	0	1	1	0	1	0
28	M	1	1	0	1	0	1	0	0	0

M= mujer; V= varón; UORA= úlceras orales; UGEN= úlceras genitales; CUTA= afección cutánea; OFTL= id. oftalmológica; NEUR= id. neurológica; ARTIC= id. articular; TFLEB= tromboflebitis; EPID= epididimitis; DIGES= afección digestiva; 1= presente; 0= ausente.

**TABLA 4.3 (continuación).**  
**MANIFESTACIONES CLINICAS FUNDAMENTALES EN PACIENTES.**

<u>PAC.N°</u>	<u>SEXO</u>	<u>UORA</u>	<u>UGEN</u>	<u>CUTA</u>	<u>OFTL</u>	<u>NEUR</u>	<u>ARTIC</u>	<u>TFLEB</u>	<u>EPID</u>	<u>DIGES</u>
29	V	1	1	0	0	0	1	0	1	0
30	V	1	1	1	1	1	0	0	1	0
31	M	1	0	1	1	0	0	0	0	1
32	V	1	1	1	1	0	1	0	0	0
33	V	1	1	1	0	0	1	1	0	0
34	V	1	1	1	1	0	1	0	0	0
35	V	1	1	0	1	0	1	1	0	1
36	V	1	1	1	1	0	1	0	0	0
37	V	1	1	1	1	1	1	0	1	0
38	M	1	1	0	0	0	1	1	0	0
39	V	1	0	0	1	0	1	0	0	0
40	M	1	1	1	1	1	1	0	0	0
41	M	1	1	1	0	0	0	0	0	0
42	M	1	0	1	1	1	1	0	0	0
43	M	1	1	0	0	1	1	0	0	0
44	M	1	1	1	0	0	0	0	0	0
45	M	1	0	0	1	0	0	0	0	0
46	M	1	1	0	0	1	1	0	0	0
47	M	1	0	1	1	0	0	0	0	0
48	V	1	1	1	0	0	1	1	1	0
49	M	1	1	1	1	0	0	0	0	0
50	M	1	1	1	1	0	0	0	0	1
51	V	1	0	1	1	0	1	0	1	0
52	M	1	1	1	1	0	0	0	0	0
53	V	1	1	0	1	0	0	0	0	0
54	V	1	1	0	0	0	1	0	0	0
55	M	1	1	0	1	0	1	1	0	1
56	M	1	1	1	0	0	0	0	0	0
57	M	1	1	1	1	1	0	0	0	0

M= mujer; V= varón; UORA= úlceras orales; UGEN= úlceras genitales; CUTA= afección cutánea;  
 OFTL= id. oftalmológica; NEUR= id. neurológica; ARTIC= id. articular; TFLEB= tromboflebitis;  
 EPID= epididimitis; DIGES= afección digestiva; 1= presente; 0= ausente.

<b>Tabla 4.4.- Datos clínicos.</b>		
<b>MANIF. CLINICAS</b>	<b>NUMERO</b>	<b>%</b>
Ulceras orales.	57	100
Ulceras genitales.	46	80,7
Afección ocular.	37	65
Afección cutánea.	36	63
Afección articular	34	59,6
.Afección neurológica.	11	19,3
Tromboflebitis.	9	15,8
Afección digestiva.	8	14
Epididimitis.	8	28,6*
Historia familiar.	3	5,3
Afección cardíaca.	2	3,5

(\*) Relativo a varones.

<b>Tabla 4.5.- Datos clínicos iniciales.</b>		
<b>MANIF. CLINICAS</b>	<b>NUMERO</b>	<b>%</b>
Ulceras orales.	41	72
Ulceras genitales.	24	42
Afección ocular.	18	31,6
Afección articular.	7	12,3
Afección cutánea.	4	7
Tromboflebitis.	4	7
Afección neurológica.	3	5,3
Epididimitis.	1	3,6*
Digestiva.	1	1,76

(\*) Relativo a varones.



### B) AFECCION CUTANEO-MUCOSA:

El 100 % de los pacientes tuvieron aftas orales (Fig 4.2) de repetición en el curso de la enfermedad (la presencia de aftosis oral se consideró criterio diagnóstico obligatorio). Las úlceras genitales se comprobaron en el 80,7 % de los casos. La afección cutánea, observada en 36 (63%) de nuestros pacientes, viene detallada en la tabla 4.6.

<b>Tabla 4.6.- Afección cutánea en 36 pacientes (63%).</b>		
<b>TIPO:</b>	<b>NUMERO</b>	<b>%</b>
Foliculitis.	23	40,4
Eritema nodoso.	17	30
Vasculitis (comprobación histológica)	3	5,3
Tromboflebitis subcutánea	2	3,5

La lesión cutánea observada más frecuentemente fué la foliculitis (40,4 %). Sólo se valoró cuando se trataba de enfermos en edad postpuberal y que no estuviesen sometidos a tratamiento esteroideo. Sólo se registraron los casos de vasculitis cutánea comprobada histológicamente (no bastó la apreciación de púrpura palpable). La biopsia positiva correspondió, en todos los casos, a una vasculitis de pequeño vaso con infiltrado polimorfonuclear con cariorexis (vasculitis leucocitoclástica) tal como se aprecia en la figura 4.3



**Fig 4.2- Aftas orales en una paciente con enfermedad de Behçet.**



**Figura 4.3.- Biopsia cutánea. Vasculitis leucocitoclástica.**

En 5 pacientes (8,8 %) se registró una dudosa reacción patérgica (utilizando la técnica de Dilsen) de escasa intensidad. No obstante ni la frecuencia ni la intensidad de la reacción difiere, en nuestra experiencia, de lo que observamos en controles sanos<sup>9</sup>.

### C) AFECCION ARTICULAR.

Los síntomas articulares fueron muy frecuentes (Tabla 4.7). Se comprobó artritis en el 79% de los pacientes en alguna fase de la enfermedad. La afección articular era predominantemente periférica, bilateral y simétrica. Se localizó sobre todo en grandes articulaciones, especialmente en miembros inferiores. Siete de los pacientes (21 %) tuvieron intensas poliartralgias, con ritmo

Tabla 4.7.- Afección articular en 34 pacientes (59,6%).		
DESCRIPCION	NUMERO	%
ARTRITIS.	27	79
- Distribución:		
Simétrica.	20	74
Asimétrica.	7	26
- Localización.		
Rodillas.	16	59
Tobillos.	16	59
Muñecas.	10	37
Caderas.	6	22,2
Interfalángicas.	2	7,4
POLIARTRALGIAS.	7	21

inflamatorio, durante los brotes de actividad de la enfermedad sin que pudiesen observarse datos objetivos de inflamación durante la exploración.

#### D) AFECCION NEUROLOGICA.

En 11 pacientes (19.3%) se objetivó afección neurológica (Tabla 4.8). La manifestación más frecuente fué la meningoencefalitis recidivante (63.7%) encontrándose en el contenido celular del LCR un predominio linfocitario. La afectación de los pares craneales se constató en 5 pacientes. Cuatro pacientes (36.4%) presentaron convulsiones. Un paciente tuvo afectación cerebelosa asociada a síndrome de Parinaud. En la RNM (resonancia nuclear magnética) se observaron lesiones hiperintensas, en T2, a nivel cerebeloso y mesencefálico (Figura 4.4). En un paciente, que sufrió un absceso cerebral aséptico (secundario a necrosis por vasculitis del sistema nervioso central), se desarrolló posteriormente una paraparesia espástica que ha permanecido inalterada hasta la actualidad. En uno de estos 11 pacientes, y en otros tres más que no presentaban ninguna otra sintomatología neurológica, se desarrolló una afección del nervio mediano por atrapamiento (síndrome del túnel carpiano) diagnosticada clínica y electromiográficamente. Ya que es dudoso que este síndrome, aislado, represente una neuropatía primitiva

<b>Tabla 4.8.-Afección neurológica en 11 pacientes (19,3%).</b>		
<b>TIPO:</b>	<b>NUMERO</b>	<b>%</b>
Meningoencefalitis recidivante	7	63.7
Afectación de pares craneales	5	45.5
Atrapamiento del mediano	4	28,6*
Convulsiones	4	36.4
Hemiparesia	1	9.1
Paraparesia espástica	1	9.1
Síndrome cerebeloso	1	9.1

(\*). Relacionado con 14 pacientes (explicación en el texto).

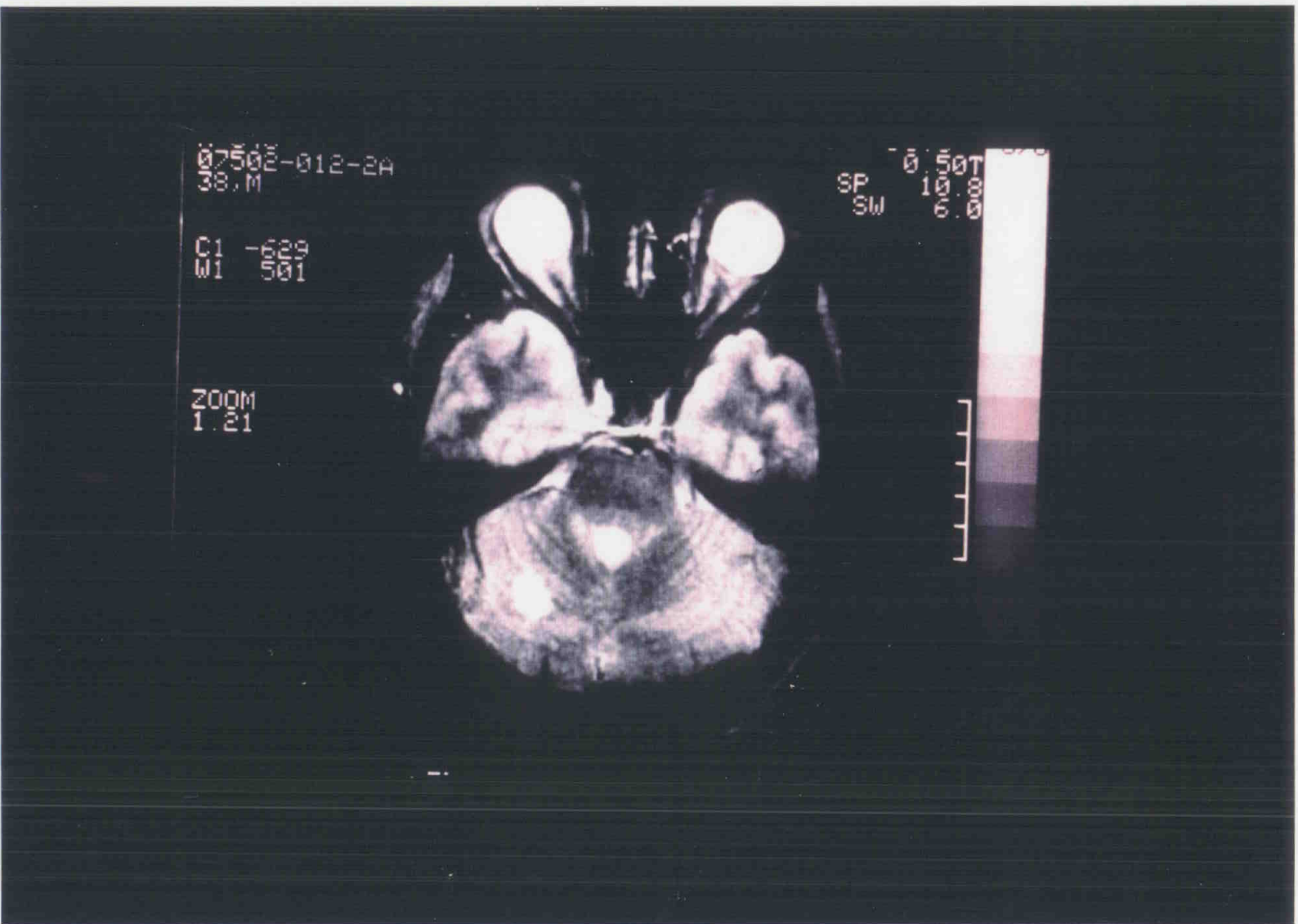


Figura 4.4.- RM en un paciente con afección del SNC. Lesiones hiperintensas en T2.

(mas bien podría encuadrarse dentro de la patología articular), los consideraremos un grupo aparte cuando se trate de establecer relaciones clínico-biológicas, (por ejemplo, para el estudio de la influencia de determinado marcador de histocompatibilidad con el grupo de pacientes con neuropatía). No obstante se citan en la tabla (con corrección paralela del porcentaje).

### **E) AFECCION DIGESTIVA.**

Se constató la existencia de manifestaciones digestivas (Tabla 4.9), posiblemente relacionadas con la enfermedad de Behçet, en 8 pacientes (14%), aparte de las aftas orales. En 4 (50%) dicha participación se manifestó como ulcus gastroduodenal y en otros 4 como hemorragia digestiva. En uno de estos casos (12.5%) la hemorragia se debió a lesiones aftosas en el intestino delgado, puestas de manifiesto en el tránsito como úlceras planas en anillo de sello (Figura 4.5), que se comprobaron durante la intervención quirúrgica. En los tres restantes no pudo aclararse el origen de la hemorragia.

<b>Tabla 4.9.- Afección digestiva en 8 pacientes (14 %).</b>		
<b>TIPO:</b>	<b>NUMERO</b>	<b>%</b>
Úlcera gastroduodenal	4	50
Hemorragia digestiva	4	50
- sin causa clara	3	37.5
- por lesión aftosa	1	12.5

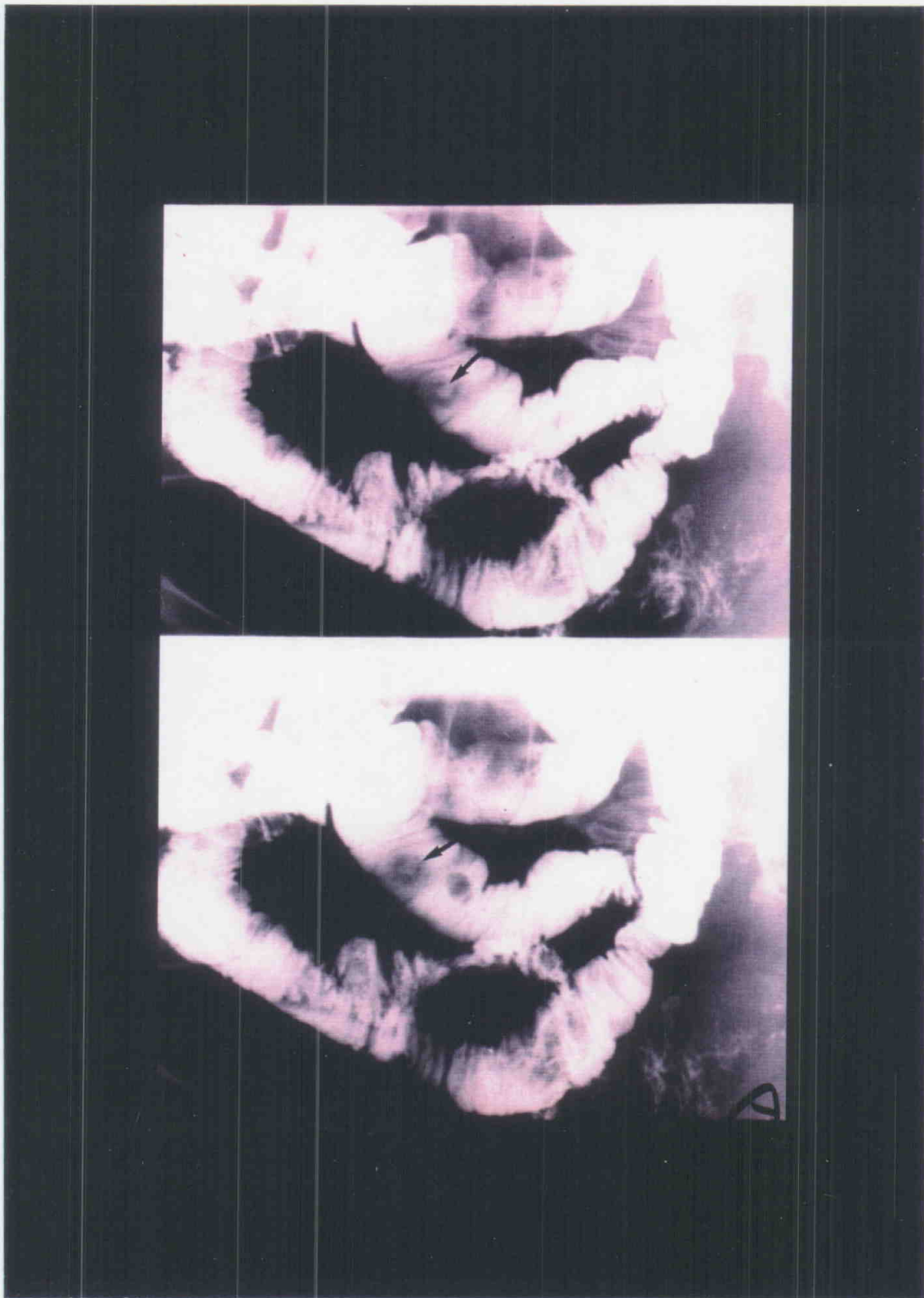


Fig. 4.5.- Enfermedad de Behçet. Ulceras en anillo de sello en intestino delgado.



#### F) AFECCION VENOSA:

Se objetivó patología trombótica (Tabla 4.10) en 9 pacientes (15,8 %). Predominaba la tromboflebitis de miembros inferiores (77,8 % de los casos con patología venosa) y, en un paciente, se comprobó trombosis de cava inferior. También registramos un caso de trombosis de seno cavernoso (fué el cuadro con el que debutó la enfermedad) y, en dos pacientes (22%), se produjeron episodios graves de tromboembolismo pulmonar.

TIPO:	NUMERO	%
Tromboflebitis.	9	15,8
- miembros inferiores.	7	77,8
- cava inferior.	1	11
Trombosis de seno cavernoso.	1	11
Tromboembolismo pulmonar.	2	22

#### G) MANIFESTACIONES OCULARES:

A lo largo de su seguimiento se registró la presencia de uveítis (Fig. 4.6) en 37 pacientes (65 %). No consideraron relacionadas con la enfermedad las alteraciones de otras estructuras oculares (esclera, cornea, conjuntiva) que no correspondían a inflamación del tracto uveal (Tabla 4.11).

Se registró uveítis posterior en 33 casos (89 %), 22 de ellas estrictamente posteriores

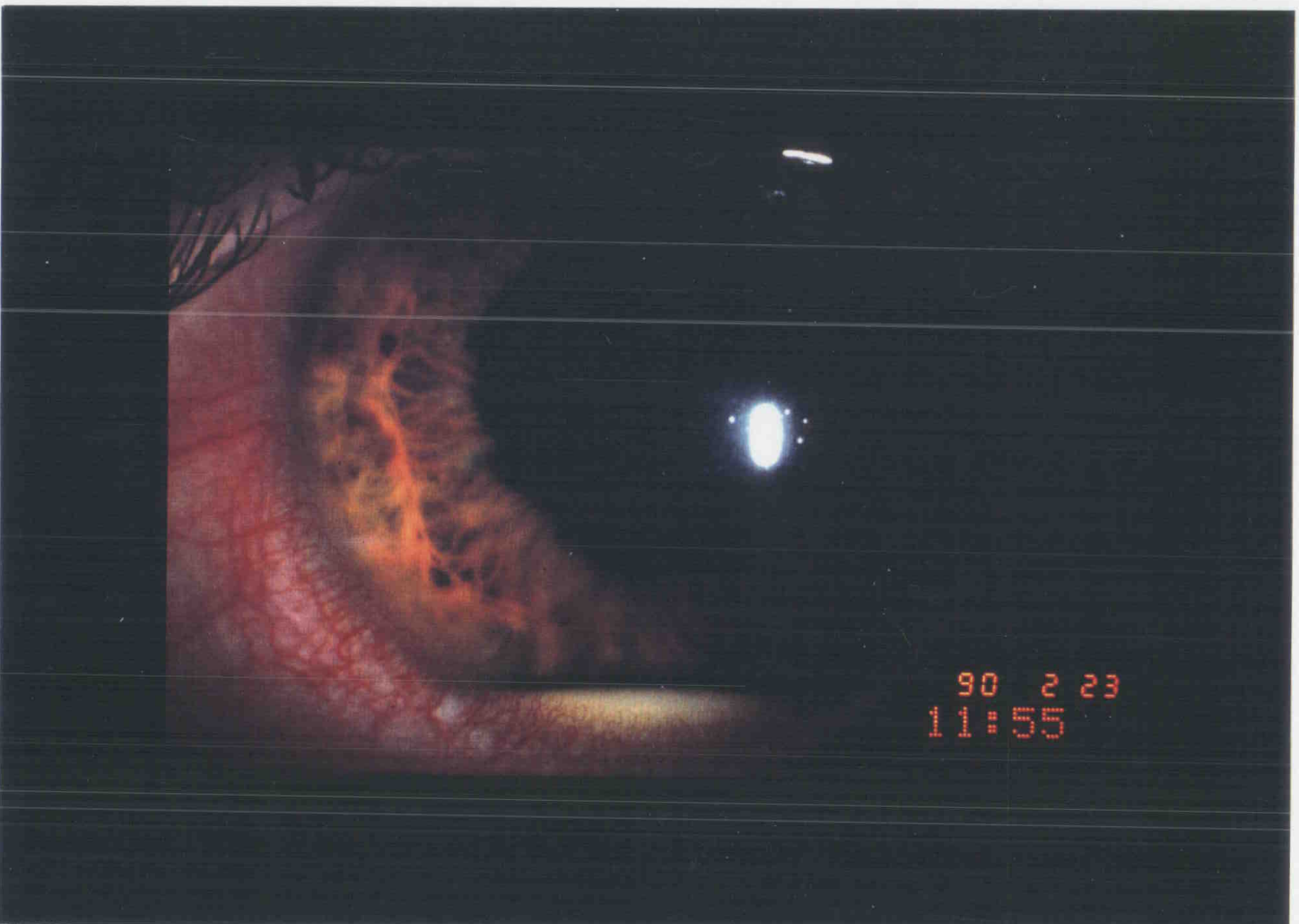


Fig 4.6.- Enfermedad de Behçet. Uveítis anterior con hipopion.

(59,5%) y 11 con participación anterior (iridociclitis) concomitante (29,7 %). La uveítis anterior pura y aislada sólo se constató en 4 casos (10,8 %).

<b>Tabla 4.11.- Afección ocular en 37 pacientes (65 %).</b>		
<b>TIPO:</b>	<b>NUMERO</b>	<b>%</b>
<b>LATERALIDAD:</b>		
- Bilateral.	30	81
- Unilateral.	7	19
<b>LOCALIZACION:</b>		
- Posterior.	22	59,5
- Anterior.	4	10,8
- Panuveítis.	11	29,7

La participación ocular fué tan frecuente en mujeres como en varones (65 %). Veinte de los 37 casos con afección oftalmológica (54 %) presentaron una uveítis refractaria al tratamiento convencional; su frecuencia fué idéntica en hombres y mujeres. Estos pacientes se incluyeron en protocolo de tratamiento con ciclosporina. Algunos de ellos, también resistentes a la acción de ciclosporina han sido sometidos a terapia inmunomoduladora con interferón alfa recombinante<sup>175</sup>. En la tabla 4.12 se detallan los hallazgos más frecuentes relativos a participación ocular.

En la figura 4.7 se muestra la curva actuarial de afección ocular dependiendo del tiempo de evolución de la enfermedad. En la figura 4.8 se comparan las diferencias en cuanto a la precocidad de participación ocular en hombres respecto a mujeres. En ellos, la media de retraso de la aparición de uveítis es de 1,8 años desde el diagnóstico (d.s. 3,5 años) mientras que este

<b>Tabla 4.12.- Lesiones oculares en 37 pacientes (65%).</b>		
<b>LESIONES.</b>	<b>NUMERO</b>	<b>%</b>
Turbidez vítrea.	13	35.1
Iritis.	13	35.1
Edema de retina.	12	32
Edema de papila.	11	29,7
Coroiditis.	11	29.7
Edema de mácula.	11	29.7
Tyndal.	10	27
Vasculitis retiniana.	9	24,3
Amaurosis.	6	16
Precipitados queráticos	6	16
Opacidad vítrea.	6	16
Hemorragia retiniana.	5	13.5
Exudados retinianos.	4	10.8
Cataratas.	4	10.8
Atrofia óptica.	4	10.8
Fibrosis retino-vítrea	2	5.4
Hemorragia vítrea.	2	5.4
Ulcera corneal.	2	5.4
Sinequias posteriores	2	5.4
Quiste macular.	1	2.7
Hipopion.	1	2.7

valor es de 3 años (d.s. 6,8) para las mujeres (Fig. 4.8). Sin embargo, debido a la gran dispersión de estos valores, las diferencias no alcanzan significación estadística ( $p= 0.51$ ).

### Curva actuarial de afección ocular.

Diferencias por sexo.

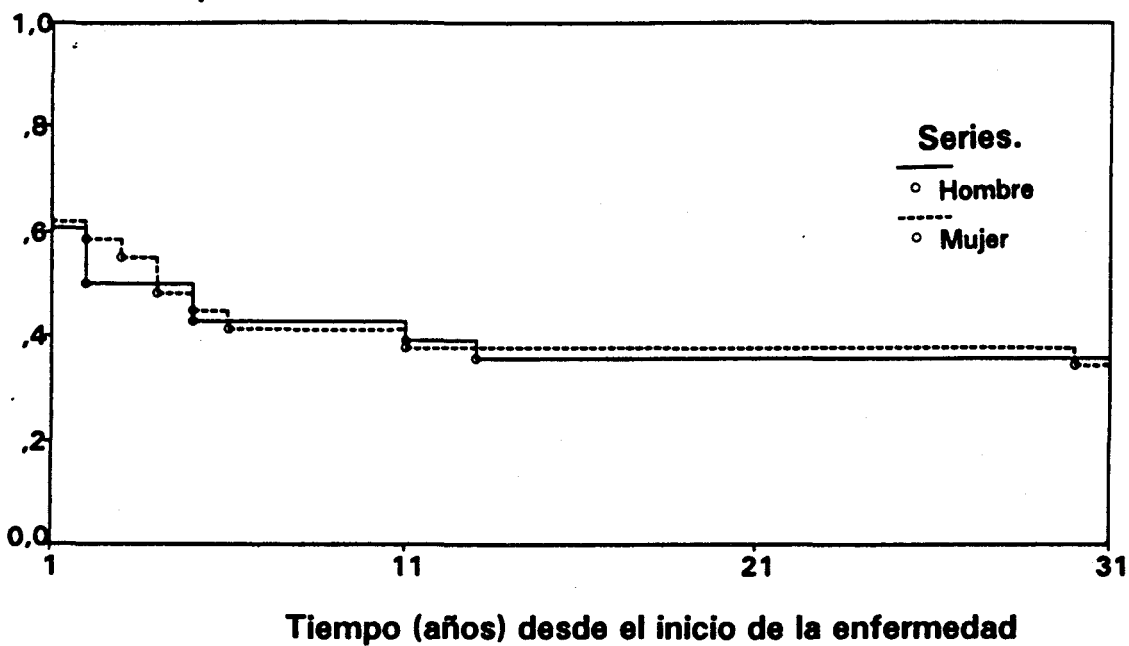


Fig.- 4.7

### Tiempo medio de afección ocular\*

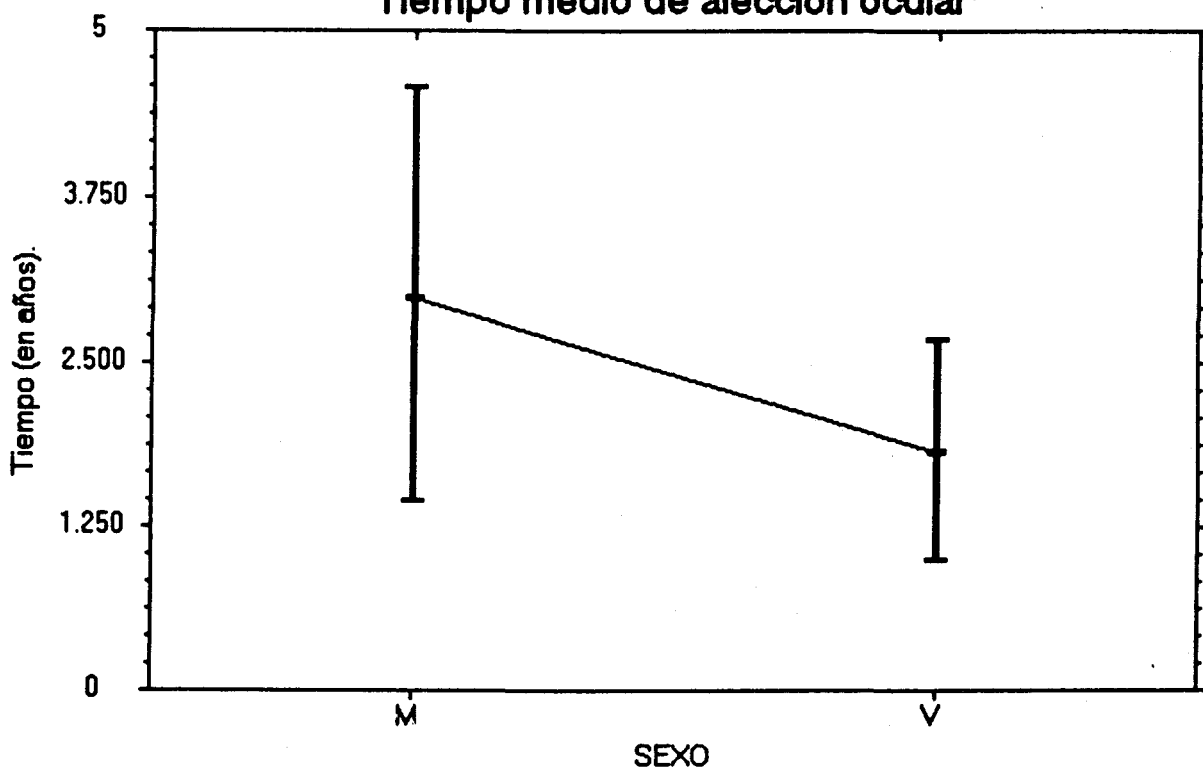


Fig.- 4.8

## H) OTROS SÍNTOMAS:

En 2 pacientes (3,5%) coexistía enfermedad coronaria (en uno de ellos se registró un infarto agudo de miocardio). Es difícil asegurar que dicha patología estuviese directamente relacionada (o condicionada en parte) por la enfermedad de Behçet aunque la tendencia hacia una mayor frecuencia de accidentes trombóticos puede hacerlo posible<sup>176</sup>. En ningún paciente (ni en ningún otro en una serie más amplia) hemos podido comprobar la existencia de dilataciones aneurismáticas de arterias pulmonares (síndrome de Hughes-Stovin)<sup>177</sup>.

Presentaron epididimitis 8 pacientes (26,6 % de los varones). Aunque esta es una manifestación muy evocadora de la enfermedad, su aparición suele ser tardía. Sólo estuvo presente como síntoma inicial en uno de los pacientes.

### 4.3.- DATOS ANALÍTICOS:

Todos los datos analíticos generales fueron poco específicos y sin clara relación con la enfermedad de Behçet ni con el grado de actividad de la misma (Tabla 4.13 ). La VSG y la PCR estaban elevados en el 26 % y en el 31,5 % de los pacientes respectivamente. La concentración sérica de crioglobulinas estaba elevada en 14 %. Cierta grado de anemia, leucocitosis e hipergammaglobulinemia fue detectado en el 5,3% de los pacientes. Respecto al complemento sólo encontramos descenso de C4 en dos enfermos (3,5%). Los anticuerpos antinucleares fueron positivos en el 40% de los casos, pero siempre a títulos bajos: sólo en un paciente fue superior a 1/320. El 72 % de los pacientes presentaba anticuerpos positivos frente a virus herpes tipo I.

Fueron positivos los anticuerpos frente a CMV en el 42 % y frente al virus de hepatitis en el 3,5%. La reacción tuberculínica fue positiva en el 28,3% de los 46 casos en los que se investigó.

<b>Tabla 4.13.- Datos analíticos en 57 pacientes.</b>		
<b>PARAMETROS.</b>	<b>NUMERO</b>	<b>%</b>
VSG elevada	15	26,3
Anemia.	3	5,3
Leucocitosis.	3	5,3
Hipergammaglobulinemia.	3	5,3
Crioglobulinas.	8	14
Factor reumatoide positivo.	1	1,75
A.S.L.O. elevado.	9	15,8
Hipocomplementemia.	2	3,5
Proteína C reactiva elevada.	18	31,5
Anticuerpos antinucleares positivos.	23	40
= 1/20	12	43,5
= 1/40	6	26
= 1/80	1	4,3
= 1/160	3	13
= 1/320	1	4,3
Serología positiva para:		
- Herpesvirus.	41	72
- Citomegalovirus.	24	42
- Virus B de hepatitis.	2	3,5
- Virus C de hepatitis.	0	0
Mantoux positivo.	13	28,3*

(\*) Sobre 46 pacientes.

#### 4. 4.- MOLECULAS HLA:

La tabla 4.14 detalla el fenotipo HLA de clase I y II de la presente serie. Las moléculas HLA de clase I y II han sido estudiadas previamente en un conjunto más amplio (67 pacientes), del que procede la serie actual<sup>165,166</sup>. Por ello, no repetiremos ahora exhaustivamente dicha valoración. Las relaciones clínico-biológicas más importantes que se obtuvieron y que son plenamente aplicables a esta serie fueron, de forma muy resumida, las siguientes:

En cuanto a moléculas de clase I, HLA-B51 era más frecuente en la serie total ( $p=0,003$ ), en varones con patología ocular ( $p=0,0001$ ), en pacientes con patología cutánea ( $p=0,001$ ) y digestiva ( $p=0,05$ ), con respecto a la serie control. Los varones con positividad para HLAB51 eran más jóvenes al inicio de la enfermedad ( $p=0,01$ ); en ellos, la patología neurológica fue infrecuente ( $p=0,03$ ). HLA B15 se asociaba con patología neurológica ( $p=0,06$ ) y articular ( $p=0,05$ ). Es decir, B51 refuerza el diagnóstico de EB, especialmente como marcador de riesgo de uveítis en varones jóvenes. La sintomatología neurológica se asoció negativamente con B51 y positivamente con B15 (así, B51 y B15 actuarían en cierto modo de manera inversa y recíprocamente excluyente).

En lo referente a moléculas de clase II se comprobó una asociación llamativa entre DQB1\*0303 con uveítis de mala evolución ( $p=0,01$ ). Se observó también asociación entre DR11 y DQB1\*0301 en pacientes HLA-B51 positivos. Inversamente, DQ5 se asoció negativamente con la presencia de enfermedad de Behçet ( $p=0,05$ ), especialmente en pacientes HLA-B51 positivos.



**TABLA 4.14.**  
**MOLECULAS HLA DE CLASE I Y II EN PACIENTES .**

<u>PAC. N°</u>	<u>HLA-A</u>	<u>HLA-B</u>	<u>DRB1</u>	<u>DOB1</u>	<u>DRW</u>
1	A29,A31	B14,B44,	4,07	201,303	53
2	A02,-	B14,B62,	17,01	201,501	52
3	A02,A24	B35,B44	15,4	303,602	
4	A02,A26	B17,B45	4,07	201,302	53
5	A11,A32	B51,B44	11,6	301,603	52
6	A03,-	B07,B51	01,4	301,501	53
7	A02,-	B18,B50	17,11	201,301	52
8	A02,-	B51,B60	4,11	301,302	52,53
9	A33,-	B44,-	07,4	201,302	53
10	A09,A10	B15,-	07,11	201,301	
11	A02,-	B07,B62	6,07	201,603	52,53
12	A24,-	B35,B51	11,12	301,-	
13	A24,A26	B44,B62	4,6	301,603	52,53
14	A30,A33	B14,B27	01,6	501,-	
15	A09,-	B21,B44	01,6	501,-	
16	A01,A24	B44,B51	11,4	301,-	52,53
17	A01,A03	B08,B50			
18	A09,A30	B44,-	07,11		
19	A03,A23	B07,B44	15,07	201,602	53
20	A02,A03	B07,B45	8,10	402,501	
21	A24,A29	B44,B51	6,07	201,603	
22	A01,A28	B51,B8	4,-	301,302	53
23	A01,A02	B08,B27	6,11	301,501	52
24	A01,A29	B53,B44	4,07	303,201	53
25	A02,-	B07,B62	6,07	201,604	52,53
26	A02,A28	B14,B51	11,6	301,604	52
27	A32,-	B53,-	07,11		52
28	A02,A30	B27,B60	15,17	201,601	52
29	A01,A26	B08,B40			
30	A01,A03	B08,B18	10,17	201,501	52
31	A02,A24	B35,B51	17,11	201,301	52
32	A02,A23	B44,B51	6,07		52,53

**TABLA 4.14. (Continuación)**  
**MOLECULAS HLA DE CLASE I Y II EN PACIENTES .**

<u>PAC. Nº</u>	<u>HLA-A</u>	<u>HLA-B</u>	<u>DRB1</u>	<u>DOB1</u>	<u>DRW</u>
33	A02,A03	B35,B50	6,11	301,602	52
34	A02,A26	B14,B44	07,-	201,-	53
35	A02,A25	B39,B58	15,11	301,502	
36	A29,A31	B17,B51	4,8	301,402	52,53
37	A01,-	B44,B57	07,-	201,303	53
38	A02,A11	B44,B51	11,07	201,301	52,53
39	A29,A11	B18,B51	15,17	201,602	52
40	A02,A11	B51,B50	01,6	501,603	52
41	A01,A02	B44,B51	15,6	501,602	52
42	A02,-	B44,B49	11,-		52
43	A24,A26	B35,B53	15,6		
44	A26,A30	B18,B49	17,-	201,-	52
45	A02,A29	B14,B51	4,11	301,303	52,53
46	A03,A26	B14,B44	07,-	201,-	53
47	A02,A-	B45,B51	6,07	201,603	52,53
48	A01,A33	B08,B-	17,-	201,-	52
49	A30,A33	B14,B18	01,17	201,501	52
50	A01,A02	B17,B51	15,11	301,602	52
51	A02,A23	B18,B51	17,4	201,301	52,53
52	A01,A24	B39,B52	15,8	601,402	52
53	A30,A-	B35,B60,	01,04	302,501	
54	A02,A03	B14,B35	17,11		
55	A02,A26	B07,B51	6,-		
56	A02,A24	B17,B51	07,11	301,303	
57	A02,A28	B27,B56			

TABLA 4.15.

## MOLECULAS TAP1 y TAP2 EN PACIENTES.

<u>PAC.Nº</u>	<u>TAP1</u>	<u>TAP1(333)</u>	<u>TAP1(637)</u>	<u>TAP2</u>	<u>TAP2(379)</u>	<u>TAP2(565)</u>	<u>TAP2(665)</u>
1	101	ILE	ASP	101	VAL	ALA	THR
2	101-102	ILE-VAL	ASP-GLY	101-201	VAL	ALA	ALA-THR
3	101	ILE	ASP	101	VAL	ALA	THR
4	101	ILE	ASP	101	VAL	ALA	THR
5	101	ILE	ASP	201	VAL	ALA	ALA
6	101-102	ILE-VAL	ASP-GLY	102-201	VAL	ALA	ALA-THR
7	101	ILE	ASP	101-102	VAL-ILE	ALA	THR
8	101	ILE	ASP	101-102	VAL-ILE	ALA	THR
9	101	ILE	ASP	201	VAL	ALA	ALA
10	101	ILE	ASP	101	VAL	ALA	THR
11	101	ILE	ASP	102-201	VAL-ILE	ALA	ALA-THR
12	101	ILE	ASP	101-201	VAL	ALA	ALA-THR
13	101	ILE	ASP	102-201	ILE-VAL	ALA	ALA-THR
14	101-102	ILE-VAL	ASP-GLY	201	VAL	ALA	ALA
15	101	ILE	ASP	101-201	VAL	ALA	ALA-THR
16	101	ILE	ASP	101-201	VAL	ALA	ALA-THR
17	101	ILE	ASP	101-201	VAL	ALA	ALA-THR
18	101	ILE	ASP	101-102	VAL-ILE	ALA	THR
19	101	ILE	ASP	101	VAL	ALA	THR
20	101-102	ILE-VAL	ASP-GLY	101-201	VAL	ALA	ALA-THR
21	101	ILE	ASP	101	VAL	ALA	THR
22	101	ILE	ASP	101	VAL	ALA	THR
23	101	ILE	ASP	102-201	VAL-ILE	ALA	ALA-THR
24	101	ILE	ASP	101	VAL	ALA	THR
25	101	ILE	ASP	101-201	VAL	ALA	ALA-THR
26	101-102	ILE-VAL	ASP-GLY	101-201	VAL	ALA	ALA-THR
27	101-102	ILE-VAL	ASP-GLY	101	VAL	ALA	ALA-THR
28	101	ILE	ASP	101	VAL	ALA	THR
29	101	ILE	ASP	101	VAL	ALA	THR
30	101	ILE	ASP	101-201	VAL	ALA	ALA-THR

ALA= alanina; ASP= ácido aspártico; GLY= glicina; ILE= isoleucina; THR= treonina; VAL= valina;

**TABLA 4.15 (Continuación).**  
**MOLECULAS TAP1 y TAP2 EN PACIENTES.**

<u>PAC.Nº</u>	<u>TAP1</u>	<u>TAP1(333)</u>	<u>TAP1(637)</u>	<u>TAP2</u>	<u>TAP2(379)</u>	<u>TAP2(565)</u>	<u>TAP2(665)</u>
31	101	ILE	ASP	201	VAL	ALA	ALA
32	101	ILE	ASP	101-201	VAL	ALA	ALA-THR
33	101	ILE	ASP	101-102	VAL-ILE	ALA	THR
34	101-102	ILE-VAL	ASP-GLY	101-102	VAL-ILE	ALA	THR
35	101	ILE	ASP	101-201	VAL	ALA	ALA-THR
36	101-102	ILE-VAL	ASP-GLY	101-102	VAL-ILE	ALA	THR
37	101-102	ILE-VAL	ASP-GLY	101	VAL	ALA	THR
38	101	ILE	ASP	101-102	VAL-ILE	ALA	THR
39	101	ILE	ASP	101	VAL	ALA	THR
40	101-102	ILE-VAL	ASP-GLY	101-201	VAL	ALA	ALA-THR
41	101	ILE	ASP	101-102	VAL-ILE	ALA	THR
42	101-102	ILE-VAL	ASP-GLY	101-102	VAL-ILE	ALA	THR
43	101	ILE	ASP	201	VAL	ALA	ALA
44	101	ILE	ASP	101	VAL	ALA	THR
45	101	ILE	ASP	101	VAL	ALA	THR
46	101-102	VAL-ILE	ASP-GLY	101	VAL	ALA	THR
47	101	ILE	ASP	101-201	VAL	ALA	ALA-THR
48	101	ILE	ASP	101	VAL	ALA	THR
49	101-102	ILE-VAL	ASP-GLY	101-201	VAL	ALA	ALA-THR
50	101	ILE	ASP	101	VAL	ALA	THR
51	101	ILE	ASP	101	VAL	ALA	THR
52	101	ILE	ASP	201	VAL	ALA	ALA
53	101	ILE	ASP	101-201	VAL	ALA	ALA-THR
54	101	ILE	ASP	101	VAL	ALA	THR
55	101	ILE	ASP	101-201	VAL	ALA	ALA-THR
56	101	ILE	ASP	101-201	VAL	ALA	ALA-THR
57	101	ILE	ASP	101-201	VAL	ALA	ALA-THR

ALA= alanina; ASP= ácido aspártico; GLY= glicina; ILE= isoleucina; THR= treonina; VAL= valina;

## 4.5.- MOLECULAS TAP:

Se estudiaron las frecuencias alélicas, tanto de las moléculas TAP1 como de TAP2, en los 57 pacientes de esta serie y en 116 controles sanos de idéntico origen étnico y habitantes de un mismo territorio. En la tabla 4.15 se indica el tipaje para moléculas TAP1 y TAP2 en los 57 pacientes de la serie. En las Tablas 4.16 y 4.17 se expone las frecuencia con que se observó cada una de las formas alélicas tanto en pacientes como en controles.

<b>Tabla 4.16.- Frecuencias alélicas de polimorfismo TAP1</b>						
TAP1	Posición.		Pacientes = 57		Controles= 116	
	333	637	N	%	N	%
1A	Ile	Asp	57	100	109	94
1B	Val	Gly	13	23	31	27
1C	Val	Asp	0	0	14	12
1D	Ile	Gly	0	0	0	0

<b>Tabla 4.17.- Frecuencias alélicas de polimorfismo TAP2</b>							
TAP2	Posición.			Pacientes = 57		Controles= 116	
	379	565	665	N	%	N	%
2A	Val	Ala	Thr	47	82	91	78,5
2B	Val	Ala	Ala	28	49	67	57,8
2C	Ile	Ala	Ala	13	22,8	28	24,1
2D	Ile	Thr	Thr	0	0	0	0
2E	Val	Thr	Thr	0	0	0	0

En las tablas 4.18 y 4.19 se expresa el riesgo relativo (RR) conferido por cada una de las distintas formas alélicas de las moléculas, TAP1 y TAP2 respectivamente. Se incluye el coeficiente  $p$  de significación estadística relativo a la comparación de porcentajes correspondientes (sólo se indica RR cuando  $p < 0,05$ ). Se ha realizado tanto una valoración global de la serie como estudios estratificados según la distinta sintomatología.

#### **A) COMPARACIONES CON LA SERIE CONTROL.**

En cuanto a las moléculas TAP1, para la forma TAP1A (que aparece en todos los pacientes) y TAP1B no se observaron proporciones distintas de las que aparecen en la población control. Por el contrario, TAP1C, que está presente en el 12,1% de los controles no aparece en ninguno de los pacientes de la serie total (RR=0,06;  $p=0,015$ ;  $p_c=0,045$ ).

La frecuencia relativa de cada una de las formas alélicas de TAP2 tampoco difería estadísticamente de las que se observaron en la población control, ni en cuanto a la serie de pacientes considerada como un todo ni en cuanto a subgrupos clínicos.

#### **B) COMPARACIONES ENTRE VARIANTES CLÍNICAS.**

Las frecuencias observadas para aquellas variantes clínicas en las que los cálculos del apartado anterior así lo aconsejaron se compararon de todas las formas posibles con las observadas en otros subgrupos sindrómicos de pacientes. Los valores eran muy uniformes, para los alelos de TAP1, en todas las series excepto en la de TAP1B en pacientes con afección neurológica (cuya frecuencia duplicaba la de la serie control, aunque sin alcanzar significación estadística); comparando la frecuencia en dicha serie (54 %), con la observada en el resto de los pacientes (15 %) se apreció un RR de 6,7 ( $p=0,011$ ;  $p_c=0,033$ ).

**Tabla 4.18.- Frecuencias alélicas de polimorfismo TAP1 en subgrupos.**

	TAP1A			TAP1B			TAP1C		
	N(%)	RR	p	N(%)	RR	p	N%	RR	p
CONTROLES	1 09(94)	-	-	31(26,7)	-	-	14(12,1)	-	-
SERIE TOTAL	57(100)	-	NS	13(23)	-	NS	0(0)	0,06	0,015
S. OCULAR	37(100)	-	NS	9(24)	-	NS	0(0)	0,09	0,083
S. CUTANEA	36(100)	-	NS	8(22)	-	NS	0(0)	-	NS
S. ARTICULAR	34(100)	-	NS	10(29,4)	-	NS	0(0)	0,1	0,08
S.NEUROLOGICA	11(100)	-	NS	6(54,5)	-	NS	0(0)	-	NS
S.DIGESTIVA	8(100)	-	NS	1(12,5)	-	NS	0(0)	-	NS
S.CARDIOVASC.	9(100)	-	NS	2(22,2)	-	NS	0(0)	-	NS
S. OCUL (no neurol)	31(100)	-	NS	6(19)	-	NS	0(0)	0,11	0,092
OCULAR (refract.).	20(100)	-	NS	4(20)	-	NS	0(0)	-	NS
PAC. B51 Positivos	21(100)	-	NS	4(19)	-	NS	0(0)	-	NS

RR= riesgo relativo; NS= no significativo.

**Tabla 4.19.- Frecuencias alélicas de polimorfismo TAP2 en subgrupos.**

	TAP2A			TAP2B			TAP2C		
	N(%)	RR	p	N(%)	RR	p	N%	RR	p
CONTROLES	91(78,5)	-	-	67(57,8)	-	-	28(24,1)	-	-
SERIE TOTAL	47(82)	-	NS	28(49)	-	NS	13(22,8)	-	NS
S. OCULAR	31(83,8)	-	NS	20(54)	-	NS	8(21,6)	-	NS
S. CUTANEA	30(83)	-	NS	17(47)	-	NS	11(30)	-	NS
S. ARTICULAR	27(79,4)	-	NS	15(44)	-	NS	9(26,4)	-	NS
S.NEUROLOGICA	8(72,7)	-	NS	7(57,7)	-	NS	2(18)	-	NS
S.DIGESTIVA	6(75)	-	NS	7(87,5)	-	NS	0(0)	-	NS
S.CARDIOVASC.	8(89)	-	NS	5(55,5)	-	NS	2(22,2)	-	NS
S. OCUL (no neurol)	26(83,8)	-	NS	16(51,6)	-	NS	6(19,3)	-	NS
OCULAR (refract.).	17(85)	-	NS	9(45)	-	NS	5(25)	-	NS
PAC. B51 Positivos	18(85)	-	NS	11(52)	-	NS	5(23,8)	-	NS

RR= riesgo relativo; NS= no significativo.



En cuanto a moléculas TAP2, el único subgrupo, también en la comparación con la serie control, que ofrecía una diferencia llamativa (aunque no significativa) fué el de pacientes con clínica digestiva con respecto a TAP2B. Analizando la frecuencia de dicho alelo (87,5 %) con la observada en pacientes libres de participación digestiva (42 %) se apreció un RR de 9,3 ( $p=0,025$ ;  $p_c=0,075$ ).

La participación ocular no se asociaba, en nuestra serie, a diferencias en la frecuencia de ninguno de los alelos de TAP1 ni de TAP2, ni comparada con la serie control ni con el grupo de pacientes sin uveítis. Tampoco los pacientes con uveítis refractaria al tratamiento con esteroides ofrecía ningún patrón específico respecto a moléculas TAP.

Al comparar el ritmo con el que se produce la aparición de participación ocular en pacientes positivos para TAP1B en relación con los negativos (Fig 4.9), se comprobó que era más rápido en los pacientes negativos (1,25 años por término medio) que en los positivos (6,1 años por término medio) aunque, a largo plazo, los porcentajes de participación se igualan en ambos grupos. En cuanto a moléculas TAP2, las curvas de inicio de afección ocular son superponibles para pacientes positivos y negativos para TAP2A (Fig 4.10) pero difieren según TAP2B (afección ocular por término medio a los 1,9 años para TAP2B positivos y 3 años para los negativos, figura 4.11) y según TAP2C (afección ocular a los 1,4 años en pacientes negativos y a los 6 años por término medio en los positivos, figura 4.12). Pero todas estas curvas no difieren, significativamente, cuando se valoran en toda su extensión y a largo plazo:  $p=0,99$  para TAP1B,  $p=0,75$  para TAP2A,  $p=0,23$  para TAP2B y  $p=0,67$  para TAP2C (comparación de Mantel-Haenszel).

### Curva actuarial de afección ocular.

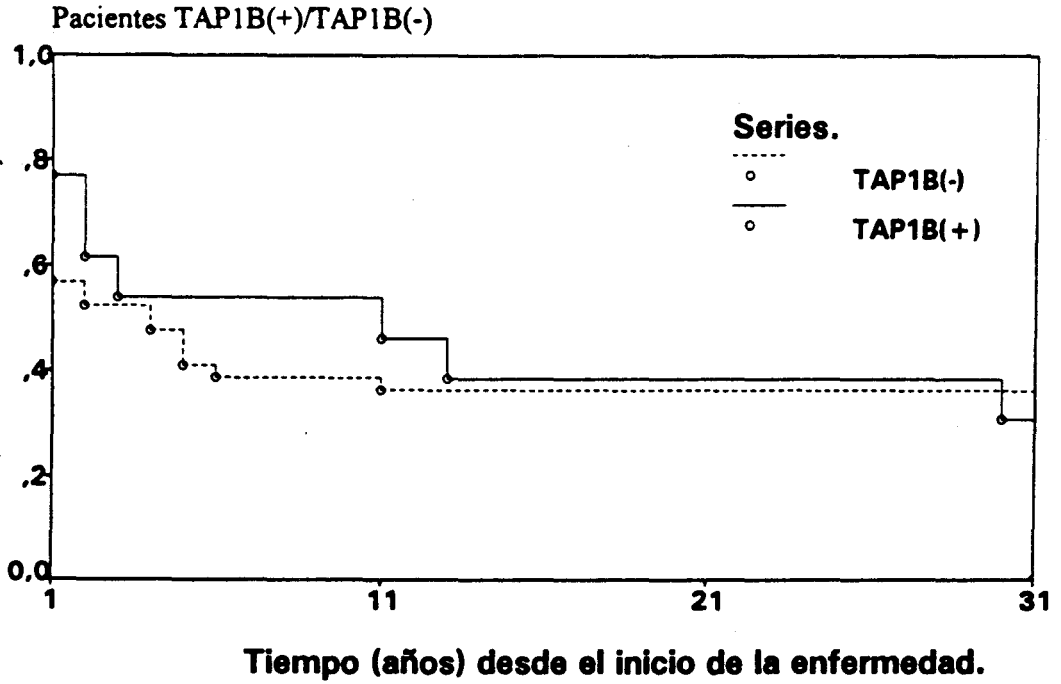


Fig.- 4.9

### Curva actuarial de afección ocular.

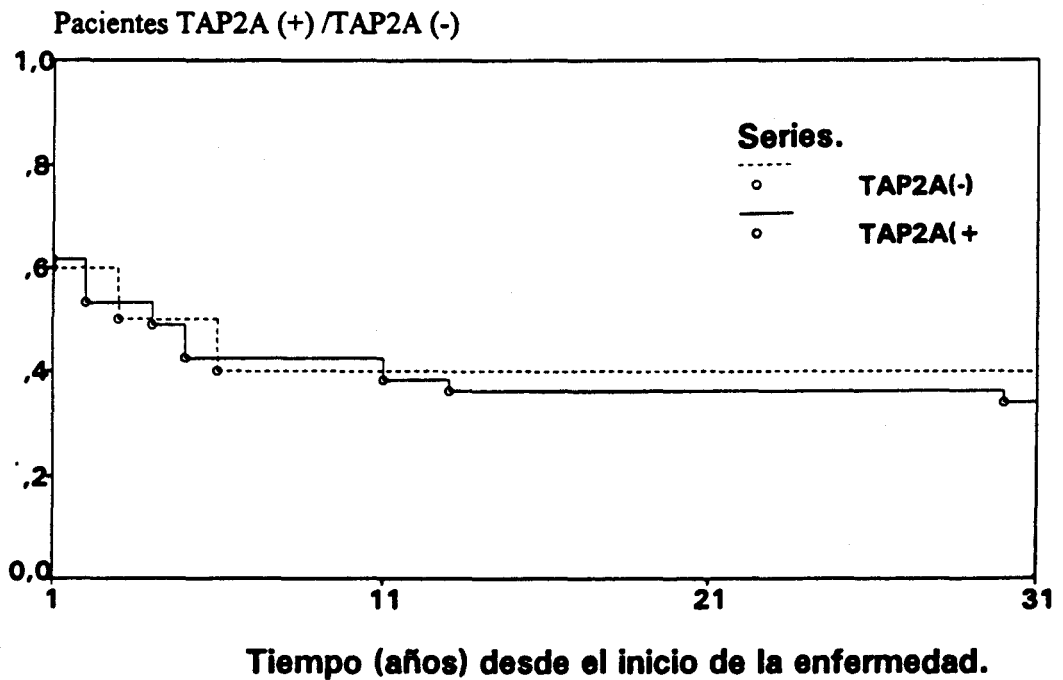


Fig.- 4.10

### Curva actuarial de afección ocular.

Pacientes TAP2B(+)/TAP2B(-).

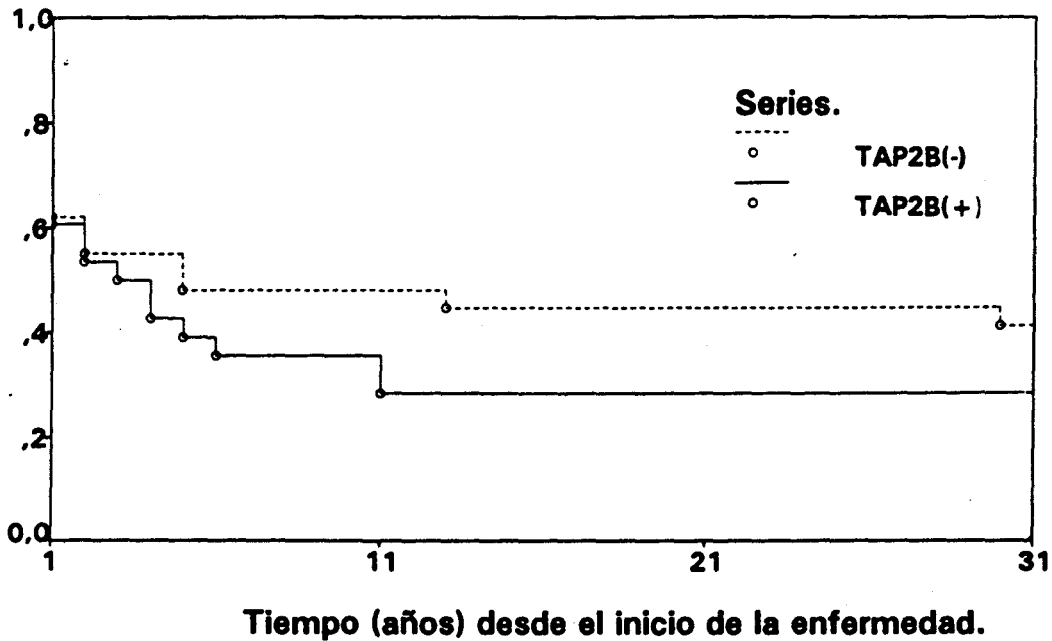


Fig.- 4.11

### Curva actuarial de afección ocular.

Pacientes TAP2C(+)/TAP2C(-)

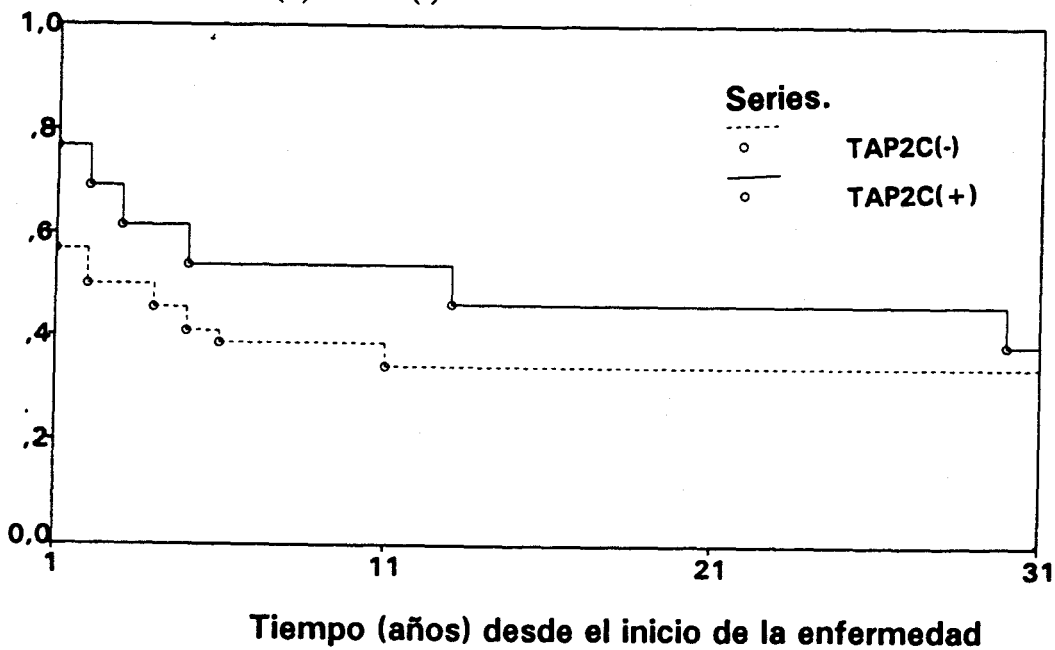


Fig.- 4.12

### C) DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO ENTRE MOLÉCULAS TAP Y HLA.

Se investigó la posibilidad de asociación entre moléculas HLA y TAP calculando sus frecuencias respectivas en la serie completa (tomando como referencia la serie control) y comparando los porcentajes entre las variantes clínicas de los pacientes con enfermedad de Behçet. Se investigaron especialmente posibles asociaciones con genes HLA para los que, en valoraciones previas (resumidas anteriormente), se comprobaron asociaciones peculiares.

En la serie total, no se encontró asociación alguna entre formas alélicas de genes TAP con la positividad o negatividad de HLA-B51 (Tablas 4.18 y 4.19) en comparación con los controles. Tampoco se comprobó asociación alguna entre pacientes HLA-B51 positivos con afección ocular y distintos alelos TAP tomando la serie control como referencia.

La distribución de las moléculas TAP es muy semejante entre los dos grupos de pacientes HLA-B51 positivos y B51 negativos (Tabla 4.20). No se apreciaron diferencias significativas entre ambos grupos para ninguno de los alelos.

	HLA-B51 (+); N=21		HLA-B51 (-); N=36		Riesgo Relativo	p
	N	%	N	%		
TAP1A	21	100	36	100	-	-
TAP1B	4	19	9	25	-	NS
TAP1C	0	0	0	0	-	-
TAP2A	18	85	29	80	-	NS
TAP2B	11	52	17	47	-	NS
TAP2C	5	23,8	8	30,7	-	NS

En la tabla 4.21 se representa la distribución de alelos TAP exclusivamente en los pacientes con afección ocular y estratificados en dos grupos de acuerdo con la positividad o negatividad de HLA-B51. No hay diferencias significativas en la frecuencia de aparición de ninguno de ellos.

<b>Tabla 4.21.- Polimorfismo TAP en pacientes con uveítis. Relación con HLA-B51.</b>						
	HLA-B51 (+); N=17		HLA-B51 (-); N=20		Riesgo Relativo	p
	N	%	N	%		
TAP1A	17	100	20	100	-	-
TAP1B	4	23,5	5	25	-	NS
TAP1C	0	0	0	0	-	-
TAP2A	15	88	16	80	-	NS
TAP2B	9	53	11	55	-	NS
TAP2C	3	23,5	5	25	-	NS

En lo que se refiere a posibles relaciones entre moléculas TAP y moléculas HLA de clase II, se prestó especial importancia a DQ5 (sobre todo a DQB1\*0501) ya que es el marcador de clase II más discriminante, de forma aislada, en la enfermedad de Behçet. Se comprobó que TAP1B se asocia a DQ5 (considerando equivalentes DQB1\*0501, DQB1\*0502 y DQB1\*0503) en pacientes, pero no en controles (Tabla 4.22) en el límite de significación estadística (RR=6;  $p=0,02$ ;  $p_c=0,06$ ). El valor  $\Delta$  fué de 0,06 para los pacientes y de 0,01 para los controles. TAP2B se asociaba fuertemente a DQ5 en los pacientes (RR=21;  $p=0,001$ ;  $p_c=0,003$ ;  $\Delta=0,1$ ) mientras que dicha relación no se encontró en controles (RR=0.9;  $p$  NS,  $\Delta=-0,003$ ).

Cuando se estudió específicamente DQB1\*0501 (Tabla 4.23) las relaciones de dicho marcador con TAP1B en los pacientes se reforzaron (con respecto a las observadas para el conjunto DQ5): RR=7,4; p=0,011;  $p_c$ =0,033;  $\Delta$ =0,07. Ello, de forma independiente respecto al grupo control (RR=1,3; p NS;  $\Delta$ =0,006).

Para TAP2B ocurrió otro tanto (RR=17,7; p=0,002;  $p_c$ =0,006;  $\Delta$ = 0,098), también de forma independiente respecto a la serie control (RR=1,3; p NS;  $\Delta$ =0,014).

En la tabla 4.24 se analizaron estas mismas relaciones en el subgrupo de pacientes con uveítis. La única asociación importante que se observó fué la de TAP2B y DQB1\*0501 en

Tabla 4.22.- Polimorfismo TAP . Relación con DQ5.								
	PACIENTES ( N=47)		RR	p	CONTR. ( N = 116)*		RR	p
	DQ5+=12	DQ5-=35			DQ5+=41	DQ5-=75		
	N(%)	N(%)			N(%)	N(%)		
TAP1A	12 (100)	35 (100)	-	-	39 (95)	70 (93)	-	-
TAP1B	6 (50)	5 (14)	6	0,02	13 (31,7)	18 (24)	-	NS
TAP1C	0	0	-	-	4 (9,7)	10 (13)	-	-
TAP2A	9 (75)	29 (82)	-	NS	32 (72,7)	59 (82)	-	NS
TAP2B	11 (91)	12 (34)	21	<0,001	25 (56,8)	42 (58)	-	NS
TAP2C	3 (25)	8 (22)	-	NS	13 (29,5)	15 (20,8)	-	NS

(\*) Para los controles, los valores de N, respecto a alelos TAP2, son: DQ5+=44; DQ5-=72.

pacientes afectos: todos los individuos con inflamación ocular que, además eran positivos para DQB1\*0501, eran positivos también para TAP2B (RR=33; p=0,004;  $p_c$ =0,012;  $\Delta$ =0,125).

**Tabla 4.23.- Polimorfismo TAP . Relación con DQB1\*0501.**

	PACIENTES (N=47)		RR	p	CONTR. (N = 116)*		RR	p
	0501+=11	0501-=36			0501+=27	0501-=89		
	N(%)	N(%)			N(%)	N(%)		
TAP1A	11 (100)	36 (100)	-	-	25 (92))	84 (94)	-	-
TAP1B	6 (54)	5 (13)	7,4	0,011	8 (29,6)	23 (25,8)	-	NS
TAP1C	0	0	-	-	4 (15)	10 (11,2)	-	-
TAP2A	8 (72)	30 (83)	-	NS	21 (70)	70 (81)	-	NS
TAP2B	10 (91)	13 (36)	17,7	<0,002	19 (63)	48 (55,8)	-	NS
TAP2C	3 (27)	8 (22)	-	NS	8 (26,7)	20 (23,2)	-	NS

(\*) Para los controles, los valores de N, respecto a alelos TAP2, son: 0501+=30; 0501-=86.

Esta asociación, sólo se observó en la tercera parte de los pacientes con uveítis, negativos para DQB1\*0501 (RR=2,8; p NS;  $\Delta=0,04$ ). Anteriormente (Tabla 4.23) se expresaron los valores relativos a la serie control en sus relaciones con DQB1\*0501.

**Tabla 4.24.- Polimorfismo TAP . Relación con DQB1\*0501 en pacientes con uveítis (N=47).**

	Con uveítis (32)		RR	p	Sin uveítis (N = 15)		RR	p
	0501+=8	0501-=24			0501+=3	0501-=12		
	N(%)	N(%)			N(%)	N(%)		
TAP1A	8 (100)	24 (100)	-	-	3 (100)	12 (100)	-	-
TAP1B	4 (50)	4 (16,6)	-	NS	2 (66)	1 (8,3)	-	NS
TAP1C	0	0	-	-	0	0	-	-
TAP2A	5 (62,5)	21 (87,5)	-	NS	3 (100)	9 (75)	-	NS
TAP2B	8 (100)	8 (33)	33	0,004	2 (66)	5 (41,6)	-	NS
TAP2C	2 (25)	5 (20)	-	NS	1 (33)	3 (25)	-	NS

#### 4.6. ESTUDIO MULTIVARIANTE:

Se llevó a cabo mediante "análisis de correspondencias" elaborado según la propuesta de Benzécri, desarrollada en el procedimiento denominado 'análisis de homogeneidad' por el Departamento de Teoría de Datos de la Universidad de Leiden, Holanda. Se empleó el paquete estadístico SPSS PC+ (Chicago: SPSS Inc, 1990).

En primer lugar se recodificaron las variables de naturaleza cuantitativa (por ejemplo, la edad de los pacientes), que introducían una variabilidad injustificada cuando se ponían en relación con las variables nominales dicotómicas, y se eliminaron del análisis las variables, como "presencia de aftas orales", que afectaban por igual a todos los pacientes y no resultaban, por tanto, discriminativas.

Se consideraron, en primer lugar las siguientes variables:

Edad de los pacientes	Edad de comienzo.	Sexo
Historia familiar	Uveítis.	Uveítis refractaria.
Tiempo de inicio uveítis	Aftas orales.	Úlceras genitales
Afec. cutánea.	Afec. articular	Afec. cardiovascular.
Tromboflebitis.	Afec. neurológica.	Afec. digestiva.
HLA B51.	DQB1*0501	TAP1B
TAP2A	TAP2B	TAP2C



La variable edad quedó transformada en tres categorías (1= adolescencia, hasta 19 años; 2= de 20 hasta 44 años; 3= 45 años en adelante) y el tiempo hasta inicio de uveítis en otras tres (0= no aparece; 1= de 3 a 30 años; 2= en los dos primeros años).

Con los datos resultantes, se ha realizado el análisis dos veces. La primera de ellas, con inclusión de todas las variables y la segunda con la consideración exclusiva de aquellas que resultaron relevantes en el análisis anterior. En ambos casos, los resultados son coincidentes, definen el mismo espacio vectorial y la misma agrupación de sujetos y variables. Por esta razón exponemos el segundo de los análisis, de naturaleza más detallada.

La muestra podía ser perfectamente descrita por medio de tres dimensiones o ejes factoriales, que explican el 100% de la varianza de los datos (Tabla 4.25). El ajuste de los datos al modelo matemático es adecuado. No es precisa, por tanto, una nueva dimensión ni es conveniente, como se aprecia, renunciar al tercero de los ejes para simplificar el análisis, porque ello dejaría sin explicación a una parte importante de la realidad estudiada. Como se comentará, la naturaleza de cada eje no puede identificarse con una única variable, según se corresponde con el carácter multivariado de nuestro modelo.

En la citada tabla (realizada mediante aplicación de la fórmula de Benzécri) se expresa la proporción de varianza explicada por cada dimensión.

DIMENSION	VAL. PROPIO	VPT	VAR. EXPLI (*)
1	.2034	.1319	48.66 %
2	.1522	.0808	29.80 %
3	.1298	.0584	21.54 %
			100.00 %

La tabla 4.26 incluye la proyección de cada una de las categorías relevantes sobre el eje de cada dimensión, que permite su interpretación. Tras la etiqueta identificativa de cada variable se indica su presencia (1) ó ausencia (0). Los valores relativos al retraso de aparición de uveítis (TIEM) se indicaron anteriormente.

Dimensión 1	Dimensión 2	Dimensión 3
1.50 = CARD <sub>1</sub>	1.69 = HIST <sub>1</sub>	.93 = TAP2C <sub>1</sub>
1.25 = TIEM <sub>0</sub>	.72 = TAP2B <sub>0</sub>	.74 = TAP1B <sub>1</sub>
1.25 = OFT <sub>0</sub>	.46 = CARD <sub>1</sub>	.71 = HIST <sub>1</sub>
1.24 = TFLEB <sub>1</sub>	.45 = DQ5 <sub>0</sub>	.62 = NEUR <sub>1</sub>
.98 = HIST <sub>1</sub>	-.55 = TIEM <sub>1</sub>	.43 = TIEM <sub>1</sub>
.54 = REFR <sub>0</sub>	-.67 = DIG <sub>1</sub>	.40 = TAP2B <sub>0</sub>
-.56 = TIEM <sub>2</sub>	-.76 = TAP2B <sub>1</sub>	-.40 = TAP2B <sub>1</sub>
-.67 = OFT <sub>1</sub>	-.90 = TAP1B <sub>1</sub>	-.44 = TIEM <sub>2</sub>
-.77 = GEN <sub>0</sub>	-1.04 = NEUR <sub>1</sub>	-.89 = TFLEB <sub>1</sub>
-.93 = TIEM <sub>1</sub>	-1.07 = TAP2A <sub>0</sub>	-1.59 = DIG <sub>1</sub>
-.99 = REFR <sub>1</sub>	-1.29 = DQ5 <sub>1</sub>	-2.77 = CARD <sub>1</sub>

**A) ANALISIS DE DIMENSIONES:****a) Dimensión 1**

Los dos polos de esta dimensión vienen definidos por la afectación oftálmica, en especial con la presencia de uveitis refractaria y, en el otro extremo, las alteraciones cardiovasculares y presencia de tromboflebitis. Aunque el tamaño de la muestra no permita establecer conclusiones definitivas al respecto, parece que los antecedentes familiares se asocian más a la afectación cardiovascular que a la oftálmica.

**b) Dimensión 2:**

La segunda dimensión se define por la presencia de DQ5, TAP1B y TAP2B, con afectación neurológica y, en menor medida, digestiva. A esta presencia se asocia la ausencia de TAP2A. En el polo opuesto adquiere mucha fuerza la presencia de antecedentes familiares, que hay que admitir con reservas hasta el examen de muestras mayores, y el peso moderado de la afectación cardiovascular.

**c) Dimensión 3:**

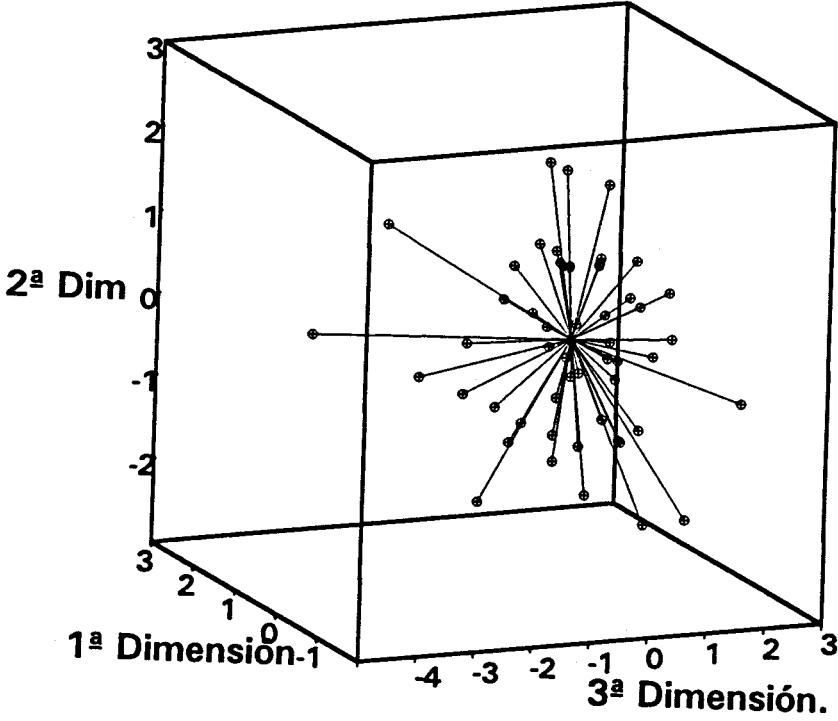
La tercera dimensión es el resultado de las interacciones de TAP2C, TAP1B con la afectación neurológica en el primer extremo del eje. El extremo opuesto se caracteriza por la participación cardiovascular y digestiva con presencia de TAP2B. Esta dimensión parece que influye en la latencia de presentación de la uveítis. El debut es más temprano en los cuadros con TAP2B positiva y afectación cardiovascular y más tardío con TAP2C y TAP1B.

## B) CLASIFICACIÓN DE LOS SUJETOS DE LA MUESTRA.

Sin pretender la generalización de nuestros hallazgos, que sólo se podrá realizar tras la replicación con muestras mayores, puede afirmarse que de los datos que poseemos se desprende una tipología de pacientes, cuyas características se describen más adelante. Para proceder a la clasificación de los sujetos, de acuerdo con las dimensiones definidas, se ha calculado la proyección de cada uno sobre cada uno de los ejes.

**Tabla 4.27.-Puntuación de cada sujeto (Pac.) en cada una de las dimensiones (D).**

Pac.	1ªD.	2ªD.	3ªD	Pac.	1ªD	2ªD	3ªD
1 *	-.42	1.97	.30	29 *	1.14	.57	.60
2 *	1.32	-1.40	.13	30 *	-.39	-1.17	-.11
3 *	-1.12	1.27	-.35	31 *	-.66	-.96	-1.52
4 *	.27	.87	-.82	32 *	-1.09	-.18	.00
5 *	1.11	-.93	-1.05	33 *	1.93	1.52	.96
6 *	-1.18	-1.90	1.19	34 *	-.33	.43	.95
7 *	-.79	1.15	.54	35 *	.87	.03	-3.86
8 *	-.92	.76	1.02	36 *	-.45	.04	1.42
9 *	1.52	-1.25	-.19	37 *	-.82	-.03	.83
10 *	1.06	.74	.48	38 *	1.57	.68	.55
11 *	.96	-.54	.62	39 *	-1.12	1.27	-.35
12 *	-1.00	.05	-.08	40 *	-.59	-2.10	.90
13 *	-.65	-.79	.10	41 *	.97	-.06	1.29
14 *	-.51	-1.72	-.07	42 *	-1.40	-.50	1.95
15 *	-.94	-1.14	-.95	43 *	1.07	-1.49	.50
16 *	-1.21	.58	-.79	44 *	1.06	.74	.48
17 *	-.37	.05	-.65	45 *	-1.12	1.27	-.35
18 *	1.13	.59	1.31	46 *	1.03	-.42	1.42
19 *	-.78	1.13	-.11	47 *	-.67	.40	-.91
20 *	1.17	-2.24	-.70	48 *	2.12	.88	-1.69
21 *	-.24	.95	-.24	49 *	-1.04	-.93	.12
22 *	-1.12	1.27	-.35	50 *	-.10	.59	-1.26
23 *	-.98	-.97	.19	51 *	-.58	1.09	-.47
24 *	1.42	1.58	.89	52 *	-.88	-.17	-.62
25 *	1.12	-.32	-.99	53 *	-.42	-.56	-.53
26 *	-.41	-.29	-.15	54 *	1.14	.57	.60
27 *	1.10	-.68	1.62	55 *	.35	-.43	-2.37
28 *	-.91	.74	.36	56 *	.97	.04	.03
				57 *	-1.05	-.83	.45



**4.13.- Representación espacial de los pacientes de la serie en estudio con respecto a las tres dimensiones definidas mediante análisis de correspondencias. Cada punto representa a un paciente.**

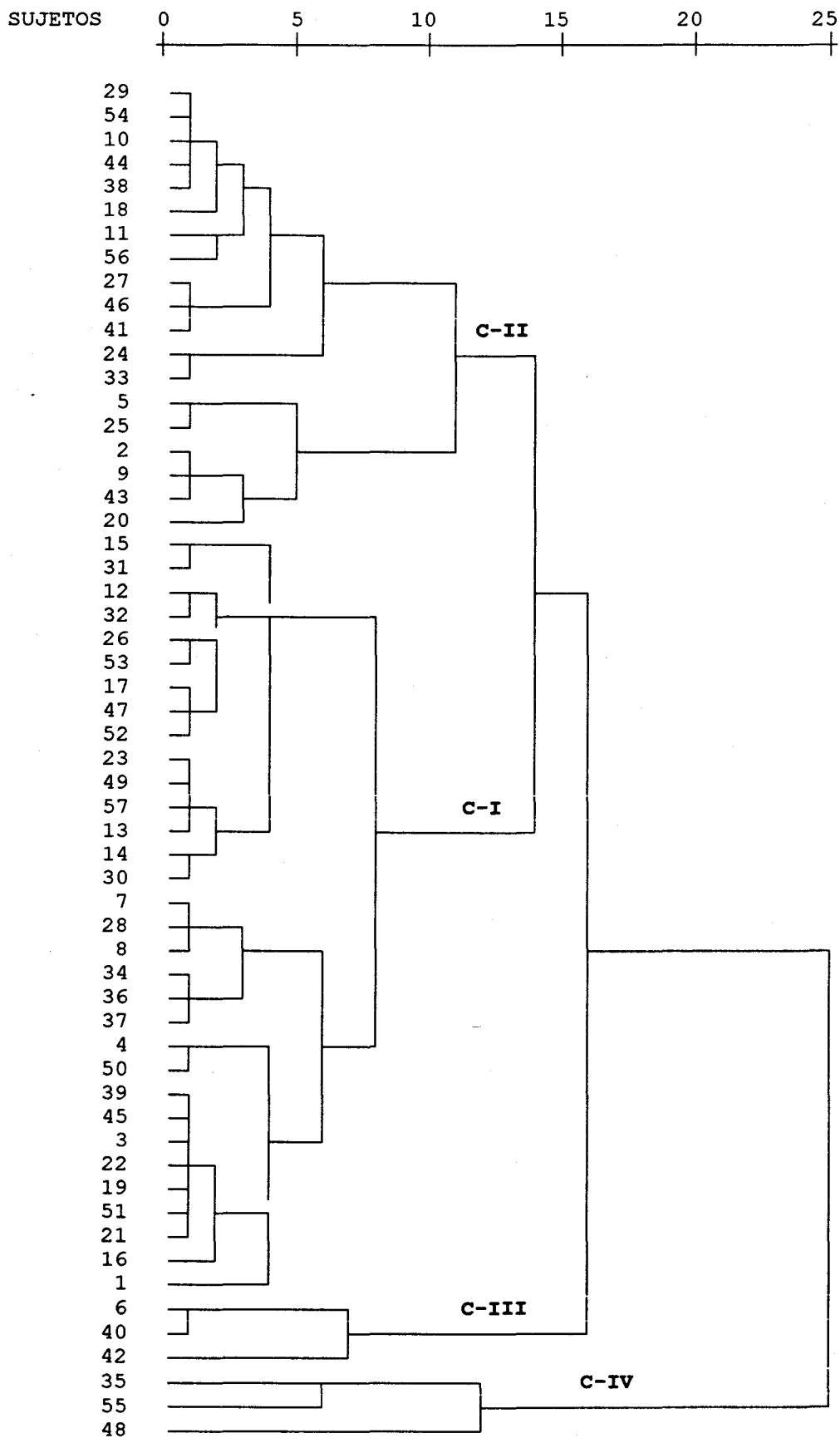


Fig. 4.14.- Dendrograma. Los distintos "clusters" están numerados en su origen.

El resultado es la definición de una nube de 57 puntos en un espacio tridimensional (Fig 4.13). El cálculo de las distancias entre estos puntos permite establecer agrupamientos de sujetos con comunalidad en sus características clínicas multivariadas. La representación gráfica de lo anterior es compleja, por lo que hemos recurrido a la técnica del dendograma para examinar los sucesivos grupos de sujetos y de conjuntos de sujetos que se pueden definir (Fig 4.14)

Aunque se han calculado las configuraciones resultantes para dos a seis clusters, el examen del dendograma aconseja centrar el análisis en la distribución de sujetos en cuatro conjuntos.

**Tabla 4.28.-Clasificación de los sujetos con respecto a los conjuntos ("clusters").**

Paciente	Cluster	Paciente	Cluster	Paciente	Cluster	Paciente	Cluster
1	1	16	1	31	1	46	2
2	2	17	1	32	1	47	1
3	1	18	2	33	2	48	4
4	1	19	1	34	1	49	1
5	2	20	2	35	4	50	1
6	3	21	1	36	1	51	1
7	1	22	1	37	1	52	1
8	1	23	1	38	2	53	1
9	2	24	2	39	1	54	2
10	2	25	2	40	3	55	4
11	2	26	1	41	2	56	2
12	1	27	2	42	3	57	1
13	1	28	1	43	2		
14	1	29	2	44	2		
15	1	30	1	45	1		

El número de sujetos incluidos en cada cluster es el siguiente:

- = 32 para el cluster número 1.
- = 19 para el cluster número 2.
- = 3 para el cluster número 3.
- = 3 para el cluster número 4

Un análisis de la varianza de las medidas de distancia de cada sujeto respecto al centro de cada cluster muestra que hay una probabilidad significativamente muy baja de haber clasificado erróneamente a los sujetos. El modelo matemático de conjuntos que se ha definido parece apropiado a la naturaleza de los datos. En la tabla 4.29 se muestra el resultado del análisis de varianza (SPSS PC+).

<b>Tabla 4.29.- Análisis de varianza.</b>						
Variable	Cluster MS	DF	Error MS	DF	F	Prob
OBSAVE01	9.3269	5	.2182	51.0	42.7413	.000
OBSAVE02	7.4580	5	.3932	51.0	18.9660	.000
OBSAVE03	7.4407	5	.4096	51.0	18.1644	.000

Para describir mejor el contenido de los clusters, se ha buscado la asociación de cada una de las variables en estudio con cada uno de los cuatro clusters, medida con la *ji* cuadrado de Pearson (valor convencional de probabilidad de 0,05 como puntuación de corte para la significatividad). Se consignan sólo las asociaciones significativas (Tabla 4.29).



La afección oftálmica define claramente los clusters, en especial el primero y el segundo que son los que tienen mayor número de sujetos. El primer cluster está formado por sujetos con afección y el segundo por pacientes que no la tienen. No puede establecerse una conclusión general sobre los dos grupos de pacientes restantes, dado su reducido número de efectivos. Con todo, señalemos que los tres miembros del tercer cluster tienen también afección ocular, aunque ésta debuta más precozmente en los sujetos del cuarto cluster que la padecen. Para completar el análisis, debe señalarse que la uveítis refractaria sólo se da en sujetos del primer y tercer cluster.

La afección articular resulta estadísticamente significativa ( $p= 0,02963$ ). Se da de modo inconsistente en el primer cluster y es muy probable en los sujetos de los grupos restantes. Con todo, la significación del estadístico debe considerarse con cautela, debido a los pocos efectivos de los clusters tercero y cuarto que no obstante tienen un gran peso en el cálculo final de la ji cuadrado.

La tromboflebitis es un elemento básico en la distinción entre el tercer y cuarto cluster. Los tres sujetos del cuarto la han padecido, y ninguno del tercero. No tiene significación, en cambio, para los dos primeros conjuntos.

La baja incidencia de afección cardiovascular en la muestra obliga a evitar generalizaciones que estudios posteriores deberían permitir. Con todo, cabe decir ahora que es muy significativa la presencia exclusiva entre los pacientes del cuarto grupo. El dato converge con lo reseñado respecto a la tromboflebitis.

La afección digestiva resulta significativa, aunque con valor próximo al límite. Se distribuye por igual entre los grupos uno, dos y cuatro sin que ningún sujeto del tercero la padezca. El dato debe interpretarse con la cautela señalada, por el escaso número de pacientes en este cluster.

TAP1B no discrimina entre los pacientes del primer y segundo grupo, pero sí entre los del tercero y el cuarto. La presencia es positiva en todos los sujetos del tercero y negativa en todos los del cuarto. La extensión de la muestra no permite establecer conclusiones generales para los cuatro grupos. Algo similar ocurre con DQ5, aunque el valor está en el límite de significación ( $p=0,06$ ).

<b>Tabla 4.30. - Características de cada tipo</b>	
<b>TIPO</b>	<b>CARACTERISTICAS</b>
I	Afección ocular Uveítis refractaria
II	No afección ocular
III	Afección ocular Uveítis refractaria No afección cardiovascular(*) No afección digestiva TAP1B DQ5
IV	Afección ocular dudosa Afección cardiovascular(*) No TAP1B No DQ5

(\*) incluye tromboflebitis.

## **V.- DISCUSSION.**

Nuestro grupo de trabajo ha dedicado una gran atención, desde hace años, a los aspectos clínicos y etiopatogénicos de la enfermedad de Behçet<sup>4,9,25,26,31,34,165,166,175,178</sup>. Con anterioridad, realizó un estudio extenso encaminado a valorar, en nuestro país, el significado (diagnóstico y patogénico) de las moléculas HLA I y II en este terreno<sup>165,166</sup>. Las nuevas aportaciones acerca de la importancia de las moléculas TAP1 y TAP2, cuyo control genético está estrechamente ligado (por proximidad de localización de los propios genes y por la evidencia de complementareidad de sus funciones) al de las moléculas HLA, nos han llevado a dedicar nuestro interés al significado de sus formas alélicas en la enfermedad de Behçet. A pesar de que el conocimiento relativo a los genes TAP es relativamente reciente, existe un volumen de documentación bastante considerable<sup>144-164</sup> acerca de sus relaciones con distintas enfermedades. Sin embargo no conocemos ningún trabajo dedicado al análisis de su importancia en la enfermedad de Behçet, aparte de los estudios preliminares que ha publicado nuestro grupo<sup>179,180</sup>.

La serie de pacientes analizada se seleccionó empleando preferentemente los criterios de O'Duffy y Goldstein<sup>13</sup>, aunque se aceptó cualquier otro de los sistemas habituales<sup>12,14</sup>. Con anterioridad explicamos las razones que, por el momento, aconsejan no rechazar los sistemas previamente establecidos en favor del más reciente, elaborado por el Comité Internacional para el estudio de la Enfermedad de Behçet en 1990<sup>17</sup>. La aceptación del fenómeno patérgico como criterio independiente, no nos parece adecuada en nuestro país dada la escasa frecuencia con que se observa<sup>9</sup>.

Cincuenta y cinco de los 57 pacientes (96,5 %) eran encuadrables en la forma completa de la enfermedad según los criterios de O'Duffy y Goldstein<sup>13</sup>. De los dos restantes (formas incompletas), uno cumplía además los criterios del Comité Japonés<sup>14</sup> de forma incompleta (en algunas series publicadas por Ohno, hasta el 42 % de los pacientes son formas incompletas según este sistema de criterios<sup>40</sup>). El segundo paciente con forma incompleta, presentaba aftas orales, uveítis, afección del SNC, tromboflebitis y afección digestiva; se había descartado cualquier otra patología, distinta de la enfermedad de Behçet que pudiera justificar este conjunto de síntomas.

La relación varón/mujer, en la serie, fue de 0,96/1 (en un estudio anterior, en el que estaba incluida esta muestra, fue de 1,2/1)<sup>165,166</sup>. Estos valores son mas bajos que los que se han comunicado en la mayoría de las series españolas<sup>3,181-183</sup>. En otros países dichos cocientes oscilan entre valores más altos<sup>184</sup> o más bajos (con franco predominio de mujeres)<sup>185-186</sup>. La edad de inicio de la enfermedad, 28 años, es también más precoz que la descrita en series españolas<sup>3,181,183</sup>, salvo la de Rodríguez Illera<sup>182</sup>, o anglosajonas<sup>185,186</sup> y es similar a la de Oshima<sup>184</sup> en Japón.

En cuanto a las manifestaciones clínicas iniciales, el único síntoma evocador que aparece con frecuencia notable al inicio de la enfermedad es la aftosis oral (72 %). Los otros dos elementos de la triada clásica, las úlceras genitales y la afección ocular, están presentes al inicio del proceso con una frecuencia mucho más baja (42 y 31,6 % respectivamente). Esta circunstancia explica el retraso en el diagnóstico de muchos pacientes, (que llega a ser de 36 años en uno de nuestra serie). Por otra parte, ni las manifestaciones clínicas iniciales ni las que se pueden observar a lo largo del curso de la enfermedad difieren apreciablemente de lo que aparece en otras series. Ya se ha comentado que la frecuencia de la reacción patérgica es prácticamente nula en nuestros pacientes, sobre todo si no se toman en cuenta reacciones leves directamente relacionadas con el

trauma provocado y que no difieren (macroscópica ni microscópicamente) de las que se observan en controles sanos<sup>9</sup>.

Contrariamente al concepto existente tras las primeras descripciones de la enfermedad de Behçet<sup>1</sup>, la participación uveal posterior es mucho más frecuente que la anterior (Fig. 4.6): se registró uveítis posterior en 33 casos (89 %), 22 de ellas estrictamente posteriores (59,5 %) y 11 con participación anterior (iridociclitis) concomitante (29,7 %). La uveítis anterior aislada sólo se constató en 4 casos (10,8 %). Es de suma importancia, por lo tanto, buscar siempre la participación posterior (investigación angiográfica aún en caso de oftalmoscopia simple normal) en todos los pacientes que desarrollen un brote de uveítis anterior. Dado que gran parte de los casos proceden del Servicio de Oftalmología de nuestro Hospital es comprensible la alta proporción de uveítis graves, refractarias al tratamiento esteroideo, que contempla nuestra serie (más de la mitad de los pacientes oftalmológicos).

La frecuencia con la que aparece la participación ocular es muy rápida en los primeros años de la enfermedad (Figs. 4.7 y 4.8). Hemos comprobado diferencias en cuanto a la precocidad de participación ocular en hombres respecto a mujeres. En ellos, la mayoría de los que sufren formas oftalmológicas, han comenzado a desarrollar síntomas dentro de los dos primeros años, mientras que en las mujeres el proceso de aparición es más lento y se alcanza el 50 % hacia los 3 años. Las curvas se suavizan a continuación, tanto en hombres como en mujeres, y es difícil que aparezcan manifestaciones oculares en aquellos pacientes que no las han tenido en los primeros tres o cuatro años de la enfermedad. Es necesario, por lo tanto, extremar la vigilancia de los pacientes, en cuanto a posible participación ocular, sobre todo en los primeros años de evolución del proceso.

Los datos analíticos generales no tienen ninguna especificidad en nuestra serie. En trabajos previos, nuestro grupo puso de manifiesto una elevación significativa, en los pacientes con enfermedad de Behçet, de los títulos de anticuerpos frente a virus herpes tipo I<sup>31</sup>. En la presente serie comprobamos que el 72 % presenta anticuerpos positivos. No hay elevación significativa de anticuerpos frente a otros virus (CMV o virus de hepatitis) respecto de la observada en la población general<sup>187,188</sup> (los títulos de anticuerpos frente a CMV, aunque se recoge una frecuencia del 42 %, son muy bajos y carecen de significación). La frecuencia de serología positiva para virus de hepatitis B (3,5 %) no difiere estadísticamente de la habitual en nuestra zona<sup>186</sup>. Münke et al<sup>33</sup>, en una comunicación reciente relativa a un sólo caso, sugirieron una asociación positiva entre infección por virus de la hepatitis C y enfermedad de Behçet, basándose en la mejoría simultánea de la enfermedad y de los signos de actividad de hepatitis inducidos por interferón alfa recombinante. Nosotros<sup>34</sup>, en 46 pacientes escogidos al azar, dentro de nuestra serie, no encontramos ningún caso con serología positiva para virus C (mientras que la prevalencia de la misma es de 1.2 % en donantes de sangre de nuestra zona<sup>188</sup>). En contraste, no se encontraron síntomas sugerentes de enfermedad de Behçet en 36 pacientes, con hepatitis crónica por virus C, seguidos prospectivamente en nuestro Hospital. Todas estas circunstancias nos hacen considerar muy improbable la hipótesis de Münke. Pensamos que los efectos antivirales del interferón controlan las lesiones hepáticas (relacionadas con el virus C) mientras que sus efectos inmunomoduladores controlan los síntomas de la enfermedad de Behçet (independientes del virus C) de forma diferente<sup>175</sup>.

La reacción tuberculínica fue positiva en el 28,3% de los 46 casos en los que se investigó. Esta elevada frecuencia nos hace suponer que, en ausencia de datos clínico-epidemiológicos, dicha reacción puede representar una forma ampliada de reacción patérgica inespecífica. Sin

embargo, no hemos comprobado diferencias histológicas entre este tipo de reacción y la que se observa en individuos con reacción tuberculínica positiva que no padecen enfermedad de Behçet<sup>189,190</sup>.

Para el presente trabajo, el estudio de las moléculas HLA de clase I y II sólo se ha enfocado como un complemento en sus relaciones con las moléculas TAP1 y TAP2. Su significación, de forma independiente, como elementos condicionantes del desarrollo de la enfermedad (y de sus variedades sindrómicas) ya se abordó extensamente en trabajos previos realizados por nuestro equipo<sup>31,165,166</sup>. En el capítulo anterior se resumen los datos más significativos al respecto.

La distribución de las frecuencias de las formas alélicas de las moléculas TAP1 y TAP2 muestra ligeras diferencias, en nuestra población, con respecto a la comunicada por otros autores.

**Tabla 5.1.-Frecuencias de TAP1 Y TAP2 en controles (%).**

Autores	Powis	Carring	Wordsw.	Caillat	Ploski	Propia
1A	81,1	77	91	99	97	93
1B	14,5	16	8	31,6	24	26,7
1C	4,4	7	1	1	5	12,1
2A	62	62	57	78,6	84 (*)	78,5
2B	25,5	24	33	51	39	57,8
2C	7,4	14	6	23,5	21(**)	24,1
2D	3,7	-	6	-	-	0
2E	1,4	-	-	-	-	0
Nº	206/216	158/166	58	98	165	116

En la serie de Ploski 2A\* comprende 2A+2E y 2C\* comprende 2C+2D.



En la tabla 5.1 se recoge la frecuencia observada para cada una de las moléculas TAP1 y TAP2 en controles sanos en series de Powis<sup>107, 191</sup>, Carrington<sup>93</sup>, Wordsworth<sup>146</sup>, Ploski<sup>149</sup> y Caillat-Zucman<sup>54</sup>, junto a la de la población objeto de este estudio. Salvo para la de Ploski, se aprecia una distribución muy homogénea de las distintas series de otros autores. La aparente disparidad de la serie de Ploski<sup>149</sup> se debe a que los alelos 2A y 2E por una parte y 2C y 2D por otra, no se pueden distinguir entre sí con la metodología que emplea (no estudia la posición 565 que es donde radica la diferencia entre los citados pares de alelos; ver tabla 1.2). En nuestra serie control se aprecia un ligero incremento para TAP1C y, algo menor, para TAP2C con respecto a las demás. Comparando los valores de TAP1C de nuestra serie con los de las series de Powis (la mayor) y de Caillat (la que ofrece unos porcentajes más bajos) las diferencias resultan evidentemente significativas ( $p=0,011$  y  $0,002$  respectivamente) mientras que ambas series no difieren entre sí de forma apreciable ( $p=0,1$ ). En cuanto a TAP2C, las comparaciones se han realizado con las series de Powis (de nuevo la más extensa) y con la de Wordsworth (la que muestra mayores diferencias en el porcentaje). Una vez más las diferencias son significativas con respecto a una y otra serie ( $p<0,001$  con ambas) que, por otra parte, no difieren entre ellas ( $p=0,7$ ).

Un análisis preliminar, comparando las frecuencias alélicas TAP1 (Tabla 4.18) de la serie en estudio con las observadas en nuestros controles, da como resultado la ausencia de diferencias significativas para todas ellas, excepto para TAP1C ( $p=0,015$ ;  $p_c=0,045$ ) que, curiosamente, está ausente por completo en todo el conjunto de pacientes. No podemos sacar ninguna conclusión acerca de por qué el porcentaje de este alelo es más parecido en nuestros pacientes a otras series "normales" que a nuestra propia serie "normal" hasta que no se publique un estudio paralelo en otros países.

Cuando se separaron distintos grupos sindrómicos dentro de la serie problema tampoco se encontraron diferencias apreciables respecto a la serie control (aparte, lógicamente, de las relativas a TAP1C: la significación se atenuaba o desaparecía en los distintos subgrupos por efecto de disminución del tamaño de la muestra).

En relación con TAP2 (Fig. 4.19) no se apreció ninguna diferencia significativa entre controles y pacientes (bien como serie global o separados en subgrupos por alguna de las manifestaciones clínicas).

Por tanto, la única característica relacionada con las moléculas TAP, que puede distinguir a pacientes y controles es una disminución de la frecuencia de TAP1C ( $RR=0,06$ ). Es decir, TAP1C parece actuar como factor protector con respecto a la enfermedad de Behçet.

Si las frecuencias de formas alélicas TAP son bastante uniformes comparando controles y pacientes, dentro del grupo de estos últimos (cuando se separan en grupos según presenten tal o cual manifestación), observamos que la distribución de alguna de ellas se aparta de la norma general. En los pacientes con sintomatología neurológica, la frecuencia de TAP1B es más del doble de la observada en el resto. TAP1B se comportaría entonces como factor de riesgo de participación neurológica confiriendo un RR, al respecto, de 6,7.

Algo semejante ocurre con los pacientes que sufren manifestaciones digestivas, con respecto a TAP2B. Su frecuencia es mucho más alta en ellos que en los que no presentan dichos síntomas (87,5 % frente a 42 %), diferencia situada, al corregir  $p$ , en el límite de significación (RR de 9,3;  $p=0.025$ ;  $p_c=0.073$ ). Por tanto, con las reservas expresadas, al menos en nuestra serie,

TAP2B se comportó como factor de riesgo para manifestaciones gastrointestinales en los pacientes con enfermedad de Behçet.

Si bien no se encontró ningún tipo de relación entre alelos TAP y frecuencia o gravedad de manifestaciones oftálmicas, sí que se apreciaron posibles influencias entre alguno de ellos y la precocidad en la aparición de éstas. Aunque en su desarrollo total, las curvas actuariales no alcanzaban diferencias estadísticamente significativas creemos que es importante comentarlas como invitación para su aceptación (o su rechazo) estudiando series más amplias. Los pacientes con desarrollo más temprano de uveítis fueron, con mayor frecuencia, negativos para TAP1B. Recordemos que este mismo alelo tendía a ser más frecuente en los pacientes con clínica neurológica. Las manifestaciones oftálmicas y neurológicas suelen excluirse, en cierto modo, en los pacientes con enfermedad de Behçet: En Japón, donde la afección ocular es muy frecuente, Mishima<sup>192</sup> comunicó una prevalencia muy baja de afección neurológica en su serie e Inaba<sup>193</sup> hizo notar la falta de asociación clínica entre patología ocular y neurológica en sus pacientes. Por el contrario en los individuos B51 positivos (sobre todo varones) en los que es muy común la afección ocular, las manifestaciones neurológicas son significativamente infrecuentes<sup>165</sup>. Así, en los países donde la correlación entre enfermedad de Behçet y HLA-B51 es menor, como Estados Unidos, O'Duffy<sup>194</sup> refiere una frecuencia de patología neurológica mayor (42%). En un estudio anterior<sup>116</sup>, comprobamos también en nuestra serie una oposición entre manifestaciones oculares y manifestaciones neurológicas que guardaba un cierto paralelismo con los alelos HLA-B51 y HLA-B15 asociados respectivamente a cada una de aquellas y con tendencia a interexcluirse<sup>195</sup>. El comportamiento de TAP1B, asociado a afección neurológica y ausente en pacientes con clínica ocular precoz (al fin y al cabo un indicador de mal pronóstico ocular), parece afirmar algún

efecto, al menos modulador, por parte de dicho alelo en esta situación bipolar tanto clínica como biológica. Afirmación que, repetimos, es necesario validar en series mas extensas.

También hemos observado una relación entre la precocidad en el inicio de la participación ocular y alelos TAP2 (positiva para TAP2B y negativa para TAP2C). Igual que ocurre para TAP1B su influencia parece limitarse tan sólo al adelanto en la aparición de clínica oftalmológica ya que las curvas actuariales para positivos y negativos se igualan a la larga. Ninguna otra característica indicadora de gravedad ocular (por ejemplo, resistencia al tratamiento) se asocia en nuestra serie con ninguna forma alélica en concreto.

Hemos intentado aclarar si, aparte de asociaciones clínicas, pueden existir desequilibrio de ligamiento en los pacientes entre genes TAP y moléculas HLA I y II y, en caso afirmativo, si las relaciones existentes difieren entre pacientes y controles. Otros autores han abordado dicho problema. En población general se ha comunicado la existencia de desequilibrio positivo entre TAP1C y TAP2E con HLA-B27<sup>145</sup>; positivo de TAP2D<sup>146, 148</sup> y negativo de TAP2B<sup>146,156</sup> con DR4; positivo entre TAP1B y TAP2C/D con DR8<sup>149,162</sup>; positivo entre genes TAP2 y genes DR y DQ<sup>152,153,15</sup>. Se discute si las relaciones descritas entre ciertas enfermedades y determinadas formas alélicas de moléculas TAP se deben realmente a otros genes diferentes que están implicados en alguno de los desequilibrios que hemos citado o bien, como suponen otros, si dichos alelos actúan de forma independiente (o bien mediante distintas asociaciones que no se dan en la población control<sup>141,142,150,154,158 ,164</sup>).

Las posibles combinaciones entre genes que pueden imaginarse son infinitas. Sin embargo, nos hemos limitado a considerar tan sólo las que se producirían entre genes TAP y

aquellos para los que, en el repertorio HLA I y HLA II, se han demostrado las asociaciones más consistentes con aspectos generales o parciales de la enfermedad de Behçet.

Como puede comprobarse en las tablas 4.1 y 4.2 . No se demostró ninguna asociación entre alelos TAP1 o TAP2 con HLA B51 ni cuando los pacientes HLA B51 positivos se compararon con los controles (Tablas 4.18 y 4.19), ni en las comparaciones entre pacientes positivos y negativos para B51 (Tabla 4.20), ni en las comparaciones entre pacientes con patología ocular agrupados según la presencia o ausencia de B51 (Tabla 4.21).

Por el contrario, se hallaron indicios consistentes de asociación con moléculas de clase II, especialmente con DQ5. Encontramos que TAP1B se asociaba en el límite de significación estadística (asociación positiva) a DQ5 (englobando conjuntamente sus tres formas alélicas) en pacientes pero no en controles (Tabla 4.22). Esta asociación era mucho más evidente para TAP2B ( $p_c=0,003$ ) también de forma independiente de lo que ocurre en controles.

La relación con DQ5 dependía, específicamente de una de sus formas alélicas, DQB1\*0501 (Tabla 4.23) ya que las dos relaciones que acabamos de comentar volvieron a comprobarse de forma estadísticamente significativa (esta vez incluso para TAP1B).

TAP1C, se indicó con anterioridad, no se detectó en ninguno de los pacientes de la serie lo que nos hace pensar en su posible efecto protector de la enfermedad. No se encontró que existiese desequilibrio de ligamiento entre TAP1C y DQ5 (ni con DQB1\*0501) en la serie control (Tablas 4.22 y 4.23). Esto nos hace pensar que el efecto protector sobre la enfermedad debe actuar de forma independiente de DQ5 y sus variantes.

Es muy interesante la relación que hemos encontrado en pacientes con uveítis entre la presencia o ausencia de DQB1\*0501 y de TAP2B (Tabla 4.24). Todos los pacientes que eran positivos para DQB1\*0501 lo eran a la vez para TAP2B. Nuevamente se ponen de manifiesto relaciones entre dicha forma alélica y la participación ocular. Anteriormente se comentó la relación entre la positividad de TAP2B y la precocidad en la aparición de uveítis. Varios autores han indicado el papel protector de DQ5 (ó de DQB1\*0501, ó bien de DQ1) en relación con padecer la enfermedad o su participación ocular<sup>195,196</sup>. Nosotros también hemos comprobado una disminución de su frecuencia en los pacientes con enfermedad de Behçet<sup>165,166</sup>. TAP2B se comportaría como un agente inductor de participación ocular, no solo influyendo en su mayor precocidad sino también anulando el papel protector que se ha supuesto que confiere DQB1\*0501.

La asimetría en la distribución de TAP2B sólo se cumplió en los pacientes con uveítis y no en los que no la padecían lo que nos hace pensar que el efecto inductor de uveítis, que parece corresponder a TAP2B, se realiza, por así decirlo, no *sustituyendo* sino *invirtiendo* el efecto habitual de DQB1\*0501.

El análisis de datos se simplifica y hace más evidente cuando la relación entre variables es lineal y cuando puede identificarse el efecto de cada una de ellas. Por desgracia para los propósitos de investigación, la realidad es con frecuencia el producto de un sistema de variables que interactúan entre sí de modo no lineal y cuyo efecto independiente es difícil de precisar. Ante esta situación, el investigador puede optar por seguir dos estrategias diferentes, no incompatibles la una con la otra: sobresimplificar el análisis y considerar por separado la relación entre conjuntos limitados de variables (habitualmente entre dos variables) y, en segundo lugar, aplicar técnicas más complejas de análisis multivariados que examinen el conjunto completo de los datos y las

interacciones que se den entre ellos. Ambas estrategias tienen ventajas y ambas se emplean en la presente investigación.

Hasta aquí, hemos intentado estudiar las relaciones entre la presencia de determinados alelos TAP y alguna de las características clínicas de los pacientes. Pero de una manera simplista: analizando dos variables aisladas e ignorando el cúmulo de influencias que el resto de las variables puede ejercer sobre las interdependencias de las demás. A pesar de que, como discutíamos en la introducción, cada vez hay mayores argumentos que explican que el *estar enfermo* en general y, aquí, el *padecer la enfermedad de Behçet*, en particular, depende de un conjunto casi inabarcable de factores. Ya intuíamos al estudiar relaciones simples (DQ5-TAP2B), la repercusión que puede tener un factor, por el hecho de estar presente, modificando la acción de otro sobre un determinado aspecto clínico.

Hemos querido ir un poco más allá e intentar ofrecer una visión global del efecto que el repertorio de variables, consideradas con anterioridad, produce al actuar conjuntamente. Más concretamente, hemos analizado la influencia que los distintos alelos de los genes TAP pueden tener como elementos definidores de subvariedades o agrupamientos de pacientes con enfermedad de Behçet.

Son bien conocidas las técnicas de análisis multivariado de datos cuantitativos que cumplan los principios de aditividad y linealidad (regresión múltiple, análisis factorial, ...). En este trabajo, sin embargo, se ha debido resolver el problema metodológico planteado por la naturaleza cualitativa de muchos de los datos y la imposibilidad de asegurar la relación lineal entre ellos. La mayoría de nuestras variables son categorías nominales y dicotómicas, que recogen la presencia

o ausencia de cierto rasgo clínico. Por ello, se ha optado por la realización de un *análisis de correspondencias* (Benzécri,) desarrollado en el procedimiento denominado *análisis de homogeneidad*.

Los resultados, en conjunto, nos hablan de que las interrelaciones existentes entre los factores estudiados son complejísimas, pero muy probablemente ciertas. Algunas de las conclusiones obtenidas por este método parecen entrar en contradicción con nuestro primer análisis univariante. No es del todo cierto: la diferencia en los resultados depende de que traducen modos distintos de observar la realidad. ¿Que obtenemos con el análisis de correspondencias?: una nube de puntos en un espacio, en este caso tridimensional, que representa la posición de los pacientes con respecto a esas tres dimensiones (definidas por tres ejes ortogonales respectivamente). Cada agrupamiento nos habla de que determinados individuos tienen *cosas* en común que no pueden explicarse por relaciones matemáticas simples.

Sería tedioso repetir aquí lo que se ha expuesto en el capítulo anterior (al que recomendamos encarecidamente volver, ya que el análisis personal de las tablas puede ser de mucho más valor que la descripción fría). No hemos descubierto axiomas: sólo indicios acerca de determinadas agrupaciones de los pacientes y será la observación clínica del día a día la que se encargará de confirmar y ampliar o, por el contrario, rechazar y olvidar.

En el estudio de las tres dimensiones que definen a los pacientes llama la atención (aunque era de prever) la importancia que tiene la afección ocular en la primera dimensión, especialmente la resistente al tratamiento, como elemento de distribución del agrupamiento de pacientes.



También resalta por su interés el agrupamiento (en la segunda dimensión) con respecto a TAP1B y a la afección neurológica, por una parte, y el de TAP2B con la afección digestiva. Estas relaciones ya fueron apuntadas en el estudio univariante.

TAP1B vuelve a determinar en la tercera dimensión tendencias del mismo sentido con la afección neurológica; así mismo coincide la tendencia a la afección digestiva con la orientación de la positividad para TAP2B. Muy importante es que la precocidad de la afección ocular, en esta dimensión, sigue los mismos vectores que TAP2B e inversos a los de TAP1B y TAP2C como también *insinuaban* (que no *probaban*) los análisis univariantes de las curvas actuariales.

El análisis cuidadoso del dendograma nos ha llevado a agrupar a los pacientes en cuatro tipos (podría haberse hecho de muchas maneras diferentes), cuyas características fundamentales (no todas, hemos eliminado las de menor peso en aras de la claridad) están expuestas en la tabla 4.30.

Esta tabla debe interpretarse como un esquema práctico de agrupamiento (lo que no figura no es que *no exista*; es que no tiene carácter *diferenciador*. Por ejemplo: las aftas orales *no están* en ningún grupo *porque están en todos*; no diferencian para nada entre un grupo y otro de pacientes). De la valoración de la tabla pueden extraerse algunas ideas generales interesantes:

Hay un grupo considerable (cluster II) que no tiene nunca afección oftálmica. En el resto sí aparece dicha manifestación: de ellos, los pertenecientes al grupo IV, no presentan uveítis refractaria; en este grupo (IV) DQ5 y TAP1B son negativos. En el grupo I y III sí aparece uveítis refractaria, que, en el último (III), se acompaña de positividad para DQ5 y TAP1B, asociación

intuída, pero no demostrada, en el análisis univariante. Por otra parte, aunque con menor fuerza, también TAP2B marca en los pacientes las mismas tendencias que la uveítis refractaria (aunque en el análisis univariante parecía observarse una relación más directa con esta molécula que con el resto de alelos TAP).

Una última observación: todas estas complejas relaciones *definen* a nuestra muestra. Si son importantes en toda la población de pacientes con enfermedad de Behçet (al menos los sometidos a ambientes y carga genética semejantes) debe ser establecido, como pasa siempre que se utiliza el método científico, por otros grupos investigadores (y, por nuestra parte, por la constante autocrítica).

Hace algo más de un año, un miembro de nuestro equipo (MJC) concluía con esta frase, que ahora hago propia, su Tesis Doctoral acerca de moléculas HLA de clase I y II en la enfermedad de Behçet: *"Este estudio termina aquí. Pero no nuestro trabajo. Seguimos y seguiremos investigando en este campo; porque tenemos ya la perspectiva suficiente para comprender que el estudio de la relación entre HLA y enfermedad (Behçet o cualquier otra) es una espiral continua en la que cada vuelta conquistada abre una nueva incógnita; aunque nos acerque, un paso más, al conocimiento de las leyes que rigen las conexiones entre enfermedad y genética"*. Al final de esa vuelta de espiral nos aguardaban las moléculas TAP. Pero...

En Sevilla, mayo de 1995.

## **VI. CONCLUSIONES.**

**A) MODELOS LINEALES:**

- 1.- Las moléculas TAP ejercen efectos modificadores complejos sobre el resto de los factores etiopatogénicos que actúan en la enfermedad de Behçet.
- 2.- Las moléculas TAP condicionan, al menos en parte, el espectro de manifestaciones clínicas en los individuos afectados.
- 3.- TAP1C parece actuar como factor protector con respecto a la enfermedad de Behçet.
- 4.- TAP1B se comporta como factor de riesgo de participación neurológica confiriendo un RR, al respecto, de 6,7.
- 5.- Los pacientes con desarrollo más temprano de uveítis fueron, con mayor frecuencia, negativos para TAP1B, positivos para TAP2B y negativos para TAP2C.
- 6.- TAP2B se comportó como factor de riesgo para manifestaciones gastrointestinales en los pacientes con enfermedad de Behçet (en el límite de significación estadística).
- 7.- No se demostró ninguna asociación entre alelos TAP1 o TAP2 con HLA B51ni en la serie total ni en ninguna de las variedades clínicas (incluida especialmente la serie ocular).
- 8.- TAP1B , en el límite de significación estadística, y TAP2B (significativamente) se asociaron positivamente a la presencia de DQ5 en pacientes pero no en controles.

9.- TAP1B y TAP2B se asociaron positivamente a la presencia de DQB1\*0501 en pacientes, pero no en controles, de forma estadísticamente significativa.

10.- No se comprobó desequilibrio de ligamiento de TAP1C con DQ5 (ni con DQB1\*0501) en la serie control. Esto nos hace pensar que el efecto protector sobre la enfermedad debe actuar de forma independiente de DQ5 y sus variantes.

11.- TAP2B se comportó como un agente inductor de participación ocular, no solo influyendo en su mayor precocidad sino también anulando el papel protector que se ha supuesto que confiere DQB1\*0501.

## **B) MODELO MULTIVARIANTE.**

12.- La muestra objeto de este estudio puede ser perfectamente descrita por medio de tres dimensiones o ejes factoriales, que explican el 100% de la varianza de los datos.

13.- Los genes TAP, especialmente sus formas alélicas TAP1B, TAP2B y TAP2C, se comportan, junto a otras variables clínicas y biológicas (DQB1\*0501) como elementos con significación estadística que ayudan a delimitar la agrupación de los pacientes, en varias categorías, dentro del modelo multivariante.

14.- Las relaciones de estos alelos, en dicho sistema, con el resto de los parámetros clínicos y biológicos son muy concordantes con las que se observan mediante los modelos lineales.

## **VII.- RESUMEN.**

La enfermedad de Behçet (EB), descrita originalmente en 1937 a partir de la triada sintomática de *aftas orales*, *aftas genitales* y *uveítis anterior*, es un proceso de naturaleza autoinmune caracterizado por una sintomatología mucho más proteiforme de lo que se sospechó inicialmente, tras sus primeras definiciones.

La enfermedad es muy frecuente a lo largo de una franja territorial comprendida entre las latitudes 30° y 45° del hemisferio Norte. Nuestros propios estudios en Andalucía, establecen una frecuencia del 9 por 100.000, que confirma una vez más esta distribución territorial. La elevada prevalencia de EB, obliga a considerarla, no como una rareza, sino como un proceso de gran interés, por sus graves consecuencias, desde el punto de vista sanitario.

La causa de la EB continúa siendo desconocida a pesar de que han transcurrido más de 50 años desde su descripción. No obstante, la acumulación territorial antes citada, ha dado lugar a numerosas investigaciones acerca de su etiopatogenia que apuntan en dos direcciones. En primer lugar, se ha especulado acerca de la importancia que pueden tener los factores ambientales. Halusi Behçet, en su trabajo inicial, ya expresó la opinión de que podría existir un hipotético factor vírico desencadenante y, con posterioridad, distintos trabajos han sugerido una posible relación entre el virus herpes tipo I (VHS-1) y el desarrollo de la EB.

Otra consecuencia a que da lugar la acumulación geográfica de los pacientes, es la consideración de la importancia que pueden tener los factores genéticos y, concretamente, el papel crucial de los antígenos HLA, codificados por genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). Una amplia revisión acerca de este tema ha sido desarrollado en una Tesis Doctoral realizada en nuestro grupo de trabajo.

Estudios muy recientes han puesto de manifiesto que la exposición de los péptidos antigénicos endógenos (unidos a moléculas HLA-1), por parte de las células presentadoras, está precedida por una fase de procesamiento de los mismos. Dicho procesamiento comprende, en primer lugar, su fragmentación por un sistema enzimático especial, denominado LMP (low molecular mass proteins) descubierto por Mónaco y McDevitt, en 1982. El complejo LMP está codificado por dos genes polimórficos (denominados LMP2 y LMP7) que se localizan en la región de clase II del CMH (entre las subregiones DP y DQ). El complejo LMP tiene la particularidad de escindir los péptidos en unidades menores que contienen, casi invariablemente, nueve aminoácidos.

La unión de los fragmentos peptídicos, originados por los complejos LMP, con las moléculas HLA de clase I se produce dentro del sistema retículo endoplasmático (RE). Pero los fragmentos no penetran en su interior por simple difusión; precisan de un sistema transportador constituido por proteínas heterodiméricas codificadas por dos genes, TAP1 y TAP2 (transporter associated with antigen processing), también de carácter polimórfico, ancladas en las membranas del RE.

La variabilidad que caracteriza a los genes LMP y TAP ha conducido a la suposición de que se comportan como elementos de producción y selección de fragmentos peptídicos de carácter específico. Es decir, el polimorfismo de LMP daría lugar a la producción de distintos transportadores y seleccionaría la penetración en el RE de subconjuntos de péptidos también diferentes. Esta variación funcional, consecuencia del polimorfismo molecular que, aunque no ha sido aún suficientemente probada en humanos, parece demostrada en roedores y es de



importancia capital: la presentación de epitopos absolutamente distintos de un mismo antígeno en diferentes individuos podría explicar las diferencias individuales en la respuesta inmune y en la predisposición a padecer enfermedades asociadas al CMH.

Son muy escasos, discordantes, y todos ellos muy recientes, los trabajos que analizan posibles asociaciones entre algunas enfermedades de naturaleza autoinmune y el polimorfismo de los genes TAp o LMP. Para la EB, donde se ha demostrado ampliamente la asociación de determinados alelos HLA de clase I y II tanto con la enfermedad en sí como con determinadas variantes clínicas de la misma, no existe ningún estudio, hasta la fecha, que analice el posible papel inductor que pueden jugar los genes TAP1 y TAP2.

Aunque se han encontrado relaciones entre EB y determinados antígenos HLA de clase II, la asociación más fuerte se produce, en esta enfermedad, con antígenos de clase I (asociación positiva con B51 y negativa con B15). Estos antígenos están ligados funcionalmente de forma mucho más directa con los genes TAP. Consideramos de un gran interés continuar la línea de investigación seguida en nuestra Unidad ampliándola al estudio de estas últimas moléculas en un esfuerzo por lograr establecer sistemas de marcadores más efectivos en un proceso como el que nos ocupa, donde los problemas de diagnóstico y prevención entrañan grandes dificultades.

En este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos: 1) Estudiar las frecuencias relativas de los alelos de los genes TAP1 y TAP2 en nuestra serie de pacientes con EB, previamente tipados para antígenos de clase I y II por métodos serológicos y mediante secuencia específica de oligonucleótidos. 2) Comparar dichos resultados con los observados

en una población control sana. 3) Estudiar si existe una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad (y/o algunas de sus variantes sindrómicas) en individuos portadores de alguna de las formas alélicas en concreto. 4) Comparar la intensidad de dichas hipotéticas asociaciones en relación con la que confieren los genes de clase I y II utilizando para ello los resultados obtenidos en nuestra propia serie. 5) Analizar, en su caso, el carácter independiente o no con respecto a otros genes (desequilibrios de ligamiento con moléculas HLA) de las posibles asociaciones. 6) Valorar la utilidad de las moléculas TAP como factores discriminantes de subgrupos sintomáticos dentro de un análisis multivariante.

La población objeto de estudio comprende 57 pacientes con EB. El tipaje de moléculas HLA de clase I se realizó usando linfocitos de sangre periférica, mediante tests de microlinfocitotoxicidad de acuerdo con la técnica estándar NIH. Para moléculas HLA de clase II se empleó la técnica de "oligotyping" tras amplificación por PCR. En cuanto a genes TAP, los alelos relativos a los loci TAP1 y TAP2 se reconocieron de acuerdo con la presencia de determinadas combinaciones polimórficas identificadas usando la técnica de PCR-ARMS descrita por Powis et al.

En cuanto al tratamiento estadístico: a) Las asociaciones simples se estudiaron mediante la prueba de  $\chi^2$  al cuadrado. b) El riesgo relativo para cada forma alélica se estudió mediante la fórmula de Wolf.

Se comprobó, en nuestra muestra, que las moléculas TAP ejercen efectos modificadores complejos sobre el resto de los factores etiopatogénicos que actúan en la EB y que condicionan, al menos en parte, el espectro de manifestaciones clínicas en los sujetos

afectos. Mientras que TAP1C parece actuar como factor protector con respecto a la enfermedad de Behçet, TAP1B se comporta como factor de riesgo de participación neurológica. Los pacientes con desarrollo más temprano de uveítis fueron, con mayor frecuencia, negativos para TAP1B, positivos para TAP2B y negativos para TAP2C. Tap2B se comportó como factor de riesgo para manifestaciones gastrointestinales.

No se demostró ninguna sociación entre alelos TAP1 o TAP2 con HLAB51 ni en la serie total ni en ninguna de las variedades clínicas (incluida especialmente la serie ocular). TAP1B y TAP2B se asociaron positivamente a la presencia de DQ5 en pacientes pero no en controles y TAP1B y TAP2B lo hicieron con DQB1\*0501; todas estas relaciones en pacientes no se comprobaron en controles. TAP2B se comportó como un agente inductor de participación ocular, no sólo influyendo en su mayor precocidad sino también anulando el papel protector que se ha supuesto que confiere DQB1\*0501.

En el modelo multivariante, la muestra pudo ser descrita por medio de tres dimensiones o ejes factoriales, que explicaban el 100% de la varianza de los datos. Los genes TAP, especialmente sus formas alélicas TAP1B, TAP2B y TAP2C, se comportaron, junto a otras variables clínicas y biológicas (DQB1\*0501) como elementos con significación estadística que ayudaron a delimitar los diversos grupos de pacientes. Las relaciones de estos alelos, en dicho sistema, con el resto de los parámetros clínicos y biológicos fueron muy concordantes con las que se observaron mediante los modelos lineales.

**VIII.- BIBLIOGRAFIA.**

- 1.- Behçet H. Über rezidivierende Aphthose durch ein Virus verursachte Geschwüre am Mund, am Auge und an der Genitalien. *Derm Wschr* 1937; 105: 1152-1157.
- 2.- Ohno S. Behçet disease in the world. En Lehner T y Barnes CG editores. *Recent advances in Behçet's disease*. London: Royal Society of Medicine Services 1986; 181-186.
- 3.- Graña J, Sánchez Bursón J, Atanés A, Alonso C, Galdo B, Enfermedad de Behçet y HLA en Galicia. *Rev Esp Reumatol* 1987; 14:214-217.
- 4.- Sánchez Román J, Castillo Palma MJ, Ocaña Medina C. Enfermedad de Behçet en Andalucía (en preparación).
- 5.- Teter MS, Hochberg C. Diagnostic criteria and epidemiology. In *Behçet's disease: a contemporary synopsis*. Plotkin GR, Calabro JJ, O'Duffy JD. New York: Futura Publishing Co Inc, 1988; 15-17.
- 6.- Chajek T, Farinau M. Behçet's disease. Report of 41 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 1975; 54:179-196.
- 7.- Shoenfeld Y, Alarcón-Segovia D. The mosaic of systemic lupus erythematosus: Highlights of the Third International Conference on SLE 13-15 april 1992. *Lupus* 1992;1:269-283.
- 8.- Blobner F. Zur rezidivierenden hypopyon-iritis. *Zetschrift Augenheilkd* 1937; 91:129-139

- 9.- Sánchez Román J, Castillo Palma MJ, Navarrete Ortega M, Marín García E, Rodríguez Cañas T. Valoración anatomopatológica de la reacción patérgica en andaluces con enfermedad de Behçet. *Rev Clin Esp* 1993; 193:164-167.
- 10.- Hamza M. Pathologie et physiopathologie de la maladie de Behçet. *Revue du Rhumatisme* 1988; 55:771-778.
- 11.- Jorizzo JL, Solomon AR, Cavallo T. Behçet's syndrome. Immunopathologic and histopathologic assesment of pathergy lesions in useful of diagnosis and follow-up. *Arch Pathol Lab Med* 1985; 109:747-751.
- 12.- Mason RM, Barnes CG. Criteria for diagnosis and classification of Behçet's syndrome. En Lehner T, Barnes CG eds: *Behçet's Syndrome. Clinical and immunological features. Proceedings of a conference sponsores by Royal Society of Medicine, February 1979.* London: Academic Press, 1979:1-9.
- 13.- O'Duffy JD, Goldstein NP. Neurological involvement in seven patients with Behçet's disease. *Am J Med* 1976;61:170-178.
- 14.- Shimizu T, Ehrlich GE, Inaba G, Hayashi K, Behçet's disease (Behçet's syndrome). *Semin Arthritis Rheum* 1979; 8:233-260.
- 15.- Touraine A. L'aphtose. *Bull Soc Franç Derm Syph* 1941; 48:61-68.

- 16.- Lehner T, Barnes CG. Oral ulcerations and Behçet's syndrome. *Gut* 1977; 18:491-511.
- 17.- International Study Group for Behçet's Disease. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. *Lancet* 1990 i; 335:1078-1080.
- 18.- Nussemlat RB, Palestine AG. Behçet's disease and other retinal vasculitis. En *Uveítis. Fundamental and clinical practice*. Chicago: Year Book Medical Publisher, 1989; 212-231.
- 19.- Muniain Ezcurra MA. Liberación de superóxido, quimiotaxis y fenómeno patérgico en pacientes con enfermedad de Behçet. En Graña Gil J, ed: *II Symposium Internacional sobre enfermedad de Behçet. I reunión del Grupo Ibérico sobre Enfermedad de Behçet*. Barcelona: Ediciones Consulta S.A. 1991:81-88
- 20.- Bosch JA, Vilardell M, Monasterio I. Estudios de coagulación y enfermedad de Behçet. En Graña Gil J, ed: *II Symposium Internacional sobre enfermedad de Behçet. I reunión del Grupo Ibérico sobre Enfermedad de Behçet*. Barcelona: Ediciones Consulta S.A. 1991:67-71.
- 21.- González T, Gantes M, Bustabad S. Epidemiología de la enfermedad de Behçet en las Islas Canarias. En Graña Gil J, ed: *II Symposium Internacional sobre enfermedad de Behçet. I reunión del Grupo Ibérico sobre Enfermedad de Behçet*. Barcelona: Ediciones Consulta S.A. 1991:23-26.
- 22.- Crespo J, Ribeiro J, Pereira da Silva JA, Reis C, Moura J, Almiro E et al. Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Behçet. Características especiales en el centro de Portugal. En

Graña Gil J, ed: II Symposium Internacional sobre enfermedad de Behçet. I reunión del Grupo Ibérico sobre Enfermedad de Behçet. Barcelona: Ediciones Consulta S.A. 1991: 29-33

23.- Graña Gil J, Sánchez Bursón J, Gómez Rodríguez N, Castro Romero M, Marini Díaz E, Rodríguez García E et al. Manifestaciones vasculares en 30 casos de enfermedad de Behçet. *Rev Clin Esp* 1992; 191:375-379.

24.- Sánchez Bursón J. Manifestaciones articulares, HLA y enfermedad de Behçet. En Graña Gil J, ed:II Symposium Internacional sobre enfermedad de Behçet. I reunión del Grupo Ibérico sobre Enfermedad de Behçet. Barcelona: Ediciones Consulta S.A. 1991:51-56.

25.- Varela Aguilar JM, Sanchez Román J. Enfermedad de Behçet. ¿Que criterios utilizar? *An Med Int* 1990; 7:165.

26- Varela Aguilar JM, Sanchez Román J, Castillo Palma MJ. Diagnóstico de la enfermedad de Behçet: nuevos criterios. *An Med Int*1991; 8:104.

27.- Hussain L, Ward R, Lehner T, Barnes CG. Herpes Simplex virus IgG, IgM and IgG subclass from sera of patients with Behçet's disease and controls. En Lehner T, Barnes CG. *Recent advances in Behçet's Disease* 1986; 73. Royal Society of Medicine, London.

28.- Bonass WA, Stewart JA, Chamberlain MA, Halliburton IW. Molecular studies in Behçet's disease. En Lehner T, Barnes CG. *Recent advances in Behçet's Disease* 1986; 37. Royal Society of Medicine, London.



- 29.- Eglin RP, Lehner T, Subak-Sharpe JH. Detection of RNA complementary to Herpes Simplex virus in mononuclear cells from patients with Behçet's syndrome and recurrent oral ulcers. *Lancet* 1982; ii:1356.
- 30.- Young C, Lehner T, Barnes CG. CD4 and CD8 cell response to herpes simplex virus in Behçet's disease. *Clin Exp Immunol* 1988; 73:6-10.
- 31.- Sánchez Román J, Castillo Palma MJ, Torronteras Santiago R, Varela Aguilar JM, López Checa F, Sánchez García F. Virus del Herpes Simple tipo I, fenotipo HLA y enfermedad de Behçet. *Med Clin (Bar)* 1992; 98:366-368.
- 32.- Ohno S, Aoki K, Sugiura S, Nakayama E, Itokura K, Aizawa M. HLA-5 and Behçet's disease. *Lancet* 1972; 2:1383-1384.
- 33.- Münke MD, Stöckmann F, Ramadori G. Possible association between Behçet's syndrome and chronic hepatitis C virus. *N Engl J Med* 1995; 332:400-401.
- 34.- Sánchez Román J, Castillo Palma MJ, Torronteras Santiago R, Ocaña Medina C, Núñez Roldán A. Enfermedad de Behçet y virus de la hepatitis C. *Med Clin* 1995 (en prensa).
- 35.- Cooper C. Pippard EC. Sharp H. Wickham C. Chamberlain MA. Barker DJ. Is Behçet's disease triggered by childhood infection? *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 421-423.

- 36.- Hirohata S, Oka H, Mizushima Y. Streptococcal related antigens stimulate production of IL-6 and interferon-gamma by T cells from patients with Behçet's disease. *Cell Immunol* 1992; 140: 410-419.
- 37.- Sakane T, Kutani H, Takada S, Tsunematsu T, .- Functional aberrations of T cell subsets in patients with Behçet's disease. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1342-1351.
- 38.- Palmares J, Delgado L, Candeias J, Araújo J, Torrinha JF. "Suppressor-inducer" T cell subsets in uveitis. En 2nd Congress of Immunointervention in Autoimmune Diseases. Paris: 1991, 153.
- 39.- Sigiura S, Aoki K, Kono M, Safurada M, Soto N. Serum antibodies to various pathogenic agents and lymphocytic transformation in Behçet's disease. *Acta Soc Ophthal Jap* 1972; 76:635.
- 40.- Ohno S. Immunological aspects of Behçet's disease and Vogt-Koyanagi-Harada's disease. *Trans.Ophthal.Soc.U.K.* 1981; 101:335-341.
- 41.- Kaneko F, Takahashi Y, Muramatsu R, Hadachi X, Miura Y, Nakani A, Minagawa T. Natural killer cell numbers and function in peripheral lymphoid cells in Behçet's disease. *Br J Dermatol* 1985; 113:313-315.
- 42.- De Maeyer E. De Maeyer-Guignard. Interferons. En Thomson AW ed. *The Cytokine Handbook*. London: Academic Press, 1991: 215-240.

- 43.- Hamzaoui K, Ayed Kh, Hamza M, Touraine JL. Natural killer cells in Behçet's disease. *Clin Exp Immunol* 1988; 71:126-131.
- 44.- Susuki N, Sakane T, Ueda Y, Tsunematsu T. Abnormal B cell function in patients with Behçet's disease. *Arthritis Rheum* 1986; 29:212-219.
- 45.- Levinsky RJ, Paganelli R, Lehner T. Immune complexes and their characterization in Behçet syndrome and recurrent oral ulcers. Proceedings of a conference sponsored by the Royal Society of Medicine, February 1979. London: Academic Press, 1979:13-32.
- 46.- Chi-Chao C, Palestine AG, Nussenblatt RB, Roberge FG, Benezra D. Anti-retinal autoantibodies in Vogt-Koyanagi-Harada syndrome, Behçet's disease and sympathetic ophthalmia. *Ophthalmology* 1985; 92:1025-1028.
- 47.- Lehner T. Behçet's syndrome and autoimmunity. *Br Med J* 1967; 1:465-467.
- 48.- Maori Y, Takeuchi A, Mori M, et al. Antinuclear antibody in Behçet's disease (letter). *J Rheumatol.* 1982; 9:809-810.
- 49.- Inaba G, Aoyama J. Anti-glycolipid antibodies in neuro-Behçet syndrome. En Inaba G, ed. Behçet's Disease Pathogenic Mechanism and Clinical Future. Proceedings of the International Conference of Behçet's disease. 23-24 octubre 1981, Tokyo, University of Tokyo Press, 1982:145-152.

- 50.- Efthimiou J, Harris EN, Hughes GRV. Negative anticardiolipin antibodies and vascular complications in Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1985; 44:725-726.
- 51.- Hull RG, Harris EN, Chavarri AE, et al. Anticardiolipin antibodies: occurrence in Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1984; 43:746-748.
- 52.- Mizushima Y. Chemotaxis and phagocytosis in Behçet's disease. En Lehner T, Barnes CG eds. *Recent Advances in Behçet's disease*. London, Royal Society of Medicine Services, 1986; 235-246.
- 53.- Mastsumura N, Mizushima Y. Leucocyte movement and colchicine treatment in Behçet's disease. *Lancet* 1975; 2:813.
- 54.- Efthimiou J, Addison IE, Johnson BV. In vivo leucocyte migration in Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1989; 48:206-210.
- 55.- Aoki Y, Yoshida M, Kominami E. Enzyme immunoassay of medullasin in peripheral blood. *Clin Chim Acta* 1988; 178:193-204.
- 56.- Niwa Y, Sakane T. Autooxidative damage in Behçet's disease: endothelial cell damage following the elevated oxygen radicals generated by stimulated neutrophils. En Inawa G, ed. *Behçet's disease: Pathogenetic mechanism and clinical future*. Japan Medical Research Foundation (publication 18). *Proceedings of the International Conference on Behçet's Disease*. Tokio University of Tokio Press. 1981.

- 57.- Sakane T, Suzuli N, Ueda Y, et al. Analysis of interleukin-2 activity in patients with Behçet's disease. Ability of T cells to produce and respond to interleukin-2. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 371-378.
- 58.- Nussemblat RB and Palestine AG. Behçet's disease and other retinal vasculitis. En *Uveítis. Fundamental and clinical practice*. Chicago: Year Book Medical Publisher, 1989; 38-46.
- 59.- Nussenblatt RB. Efficacy of ciclosporin therapy for Behçet disease. *Arthritis Rheum* 1985; 28: 671-679.
- 60.- Díaz Llopis M, Menezo JL. Cyclosporin for Behçet's disease. A long-term study. *Curr Eye Dis* 1990; 8:56-60.
- 61.- Schiffenbauer J, Schwartz BD. The HLA complex and its relationship to rheumatic disease. *Rheum Dis Clin N Am* 1987; 13: 463-485.
- 62.- Duquensnoy RJ. Immunogenetic of the human Major Histocompatibility Complex. *Clinics in Laboratory Medicine* 1991; 11:509-535.
- 63.- McDevitt. El sistema HLA y su relación con la enfermedad. *Hospital Practice* (ed. española) 1986; 1:93-110.
- 64.-Bewerton DA, Caffrey M, Nicholls A, et al. Ankylosing spondylitis and HLA-A27. *Lancet* 1973; i:904-907.

- 65.- Trowsdale J, Ragoussi J, Campbell RD. Map of the human MHC. *Immunology Today* 1991; 12:443-446.
- 66.- Pober JS, Guild BC, Strominger JL. Phosphorylation in vivo and in vitro of human histocompatibility antigens (HLA-A and HLA-B) in the carboxy-terminal intracellular domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75:6002-6006.
- 67.- Holmes N, Parham P. Exon shuffling in vivo can generate novel class I molecules. *EMBO J* 1985; 4:2849-2854.
- 68.- Goodfellow PN, Jones EA, van Heyningen V, Solomom E, Bobrow M, Miggiano V, Bodmer WF. The  $\beta$ 2-microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HLA region. *Nature* 1975; 224: 267-269.
- 69.- Björkman PJ, Parham P. Structure, function and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 1990; 59:253-288.
- 70.- Björkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennet WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition of class I histocompatibility complex molecules. *Nature* 1987b; 329:253-288.
- 71.- Orr HT, Lancet D, Robb RJ, Lopez de Castro JA, Strominger JL. The heavy chain of human histocompatibility antigen HLA-B7 contains an Ig-like region. *Nature* 1979; 282:266-270.

- 72.- Geraghty DE, Koller BH, Orr HT. A human histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:9145-9149.
- 73.- Bodmer JG, Marsh SGE, Alber ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA. Nomenclature for Factors of the HLA System, 1991. *Hum Immunol* 1992; 34:4-18.
- 74.- Kaufman JF, Auffary C, Korman AJ, Shackelford DA, Strominger JL. The class II molecules of the human and the murine major histocompatibility complex. *Cell* 1984; 36:1-13.
- 75.- Robinson MA, Kindt TJ. Major Histocompatibility Complex antigens and genes. En Paul WE ed. *Fundamental Immunology*. New York: Raven Press, 1989; 489-539.
- 76.- Auffray C, Kuo J, DeMars R, Strominger JL. A minimum of four human class II  $\alpha$ -chain genes are encoded in the HLA region of the chromosome 6. *Nature* 1983; 304:174-177.
- 77.- Levine F, Ehrlich H, Mach B, Leach R, White R, Pious D. Deletion mapping of HLA and chromosome 6 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985; 3741-3745.
- 78.- Hardy DA, Bell JI, Long EO, Linsten T, McDevitt HO. Mapping of the class II region of the major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. *Nature* 1990; 323:1277-1289.

- 79.- Trowsdale J, Young JA, Kelly AP, Austin PJ, Carson S, Meunier H, So A, Erlich HA, Speilman RS, Dodmer J. Structure, sequence and polymorphism in the HLA-D region. *Inmunol. Rev.* 1985; 85:5-43.
- 80.- Rodey GE, Fuller TC. Public epitopes and antigenic structure of the HLA molecules. *CRC. Crit. Rev. Inmunol.* 1987; 7:229-267
- 81.- Neefjes JJ, Ploegh HL. Intracellular transport of MHC class II molecules. *Immunology Today* 1992; 13: 179-184.
- 82.- Kleijmeer MJ, Lelley A, Geuze HJ, Slot LW, Townsend A, Trowsdale J. Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi. *Nature* 1992; 357: 342-344.
- 83.- Goldberg AL, Rock KL. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 1992; 357: 375-379.
- 84.- Monaco JJ, McDevitt HO. Identification of a fourth class of proteins linked to the murine major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Acad Sci USA* 1982; 79:3001-3005.
- 85.- Robertson M. Proteasomes in the pathway. *Nature* 1991; 353: 300-301.



- 86.- Glynne RG, Powis SH, Beck S, Kelly A, Kerr LA, Trowsdale J. A proteasome-related gene between the two ABC transporters loci in the class II region of the human MHC. *Nature* 1991; 353: 355-357.
- 87.- Brown MG, Driscoll J, Monaco JJ. Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature* 1991; 353: 355-357.
- 88.- Monaco JJ. A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing. *Immunology Today* 1992; 13:173-178.
- 89.-Zhou X, Momburg F, Liu T, Abdel Motal UM, Jondal M, Hämmerling GJ, and Ljunggren HG. Presentation of viral antigens restricted by H-2Kb,Db or Kd in proteasoma subunit LMP2-and LMP7-deficient cells. *Eur J Immunol.* 1994; 24:1863-1868.
- 90.- Jackson MR, Peterson PA. Assembly and intracellular transport of MHC class I molecules. *Annu Rev Cell Biol* 1993; 9: 207-235.
- 91.- Schumacher TNM, Heemels MT, Neeffjes JJ, Kast WM, Melief CJM, Ploegh HL. Direct binding of peptide to empty MHC class I molecules on intact cells and in vitro. *Cell* 1990; 62:563-567.
- 92.- Parham P. Half of a peptide pump. *Nature* 1991; 351: 271-272.

- 93.- Carrington M, Colonna M, Spies T, Stephens JC, Mann DL. Haplotypic variation of the transporter associated with antigen processing (TAP) genes and their extension of HLA class II region haplotyp. *Immunogenetics* 1993, 37: 266-273.
- 94.-Aoki Y, Isselbacher K, Pillai S. Polymorphism involving the transmembrane domains of human TAP2. *Immunogenetics* 1993; 38:382.
- 95.-Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Tonwsend A, Kelly A. Sequences encodes in the class II region of the MHC related to the ABC superfamily of transporters. *Nature* 1990; 348:741-744.
- 96.-Jackson MR, Cohen-Doyle MF, Peterson PA, Williams DB. Regulation of MHC class I transport by the molecular chaperone, calnexina (p88,IP90). *Science* 1994; 263:384-387.
- 97.- Rajagopalan S, Xu Y, Brenner MB. Retention of unassembled components of integral membrane proteins by calnexin. *Science* 1994; 263:387-390.
- 98.-Müller KM, Ebensperger C, and Tampé R. Nucleotide Binding to the Hydrophilic C-terminal Domain of the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Biol Chem* 1994; 269:14032-14037.
- 99.-Malnati MS, Ceman S, Weston M, DeMars R. and Long EO. Presentation of cytosolic antigen by HLA-DR. Requires a function encoded in the class II region of the MHC. *J Immunol* 1993; 151:6751-6756.

- 100.- Neeffjes JJ and Momburg. Cell biology of antigen presentation. *Curr Op Immunol* 1993; 5:27-34.
- 101.- Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ  $\beta$  gene contributes to susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus. *Nature* 1987; 329:599-604.
- 102.- Auffray C, Lillie JW, Korman AJ, Boss JM, Frechin N, Guillemot F, Cooper J, Mulligan RC, Strominger JL. Structure and expression of HLA-DQ $\alpha$  region and DX $\alpha$  genes: Intrallelic alternate splicing of the HLA-DQ $\alpha$  gene and functional splicing of the HLA-DQ $\alpha$  gene using a retroviral vector. *Immunogenetics* 1987; 26:63-73
- 103.- Gong QL, Gregersen PK, Karr RW, Silver J. Recombination between DQ $\alpha$  y DQB genes generates human histocompatibility leukocyte antigen class II haplotype diversity. *J Immunol* 1987; 139:2993-2995.
- 104.- Kappes DJ, Strominger JL. Structure and evolution of the HLA class II SXB gene. *Immunogenetics* 1986; 24:1-7.
- 105.- Roitt I, Brostoff J y Male. *Immunology* (3<sup>a</sup> ed.) Londres: Mosby-Year Book Europe Lim 1993; 6.1-6.14.
- 106.- Parham P. Transport of delight. *Nature* 1990; 348: 674-675.

- 107.- Powis SJ, Deverson EV, Coadwell WJ, Ciruela A, Huskisson NS, Smith H et al .  
Effect of polymorphism of an MHC-linked transporter on the peptides assembled in a class I  
molecule. *Nature* 1992; 357: 211-215.
- 108.- Momburg F, Roelse J, Howard JC, Butcher GW, Hämmerling GJ, Neefjes JJ. Selectivity  
of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature* 1994; 367:  
648-651.
- 109.- Androlewicz MJ, Creswell P. Human transporters associated with antigen processing  
possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity* 1994; 1: 7-14.
- 110.- Neefjes JJ, Momburg F, Hämmerling J. Selective and ATP-dependent translocation of  
peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* 1993; 261: 769-771.
- 111.-Vaske DA, Ruohonen-Lehto MK, Larson RG, Warner CM and Rothschild MF.  
Restriction Fragment length polymorphisms at the porcine transporters associated with antigen  
processing 1 (TAP1) locus. *J Anim Sci* 1994; 72:255.
- 112.- Monaco JJ, Cho S, Attaya M. Transport protein genes in the murine MHC possible  
implications for antigen processing. *Science* 1990; 250:1723-26.
- 113.- Powis S, Tonks S, Mockridge, Kelly A.P, Bodmer J.G. and Trowsdale J. Alleles and  
haplotypes of the MHC-encoded ABC transporters TAP1 and TAP2. *Immunogenetics* 1993;  
37: 373-380.

- 114.- Colonna M, Bresnahan M, Bahram S, Strominger JL, Spies T, Allelic variants of the human putative peptide transporter involved in antigen processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:3932-3936.
- 115.- Moins-Teisserenc H, Bobrynina V, Loiseau P, Charron D. New polymorphisms within the human TAP1 and TAP2 coding regions. *Immunogenetics* 1994; 40:242.
- 116.- Aoki Y, Isselbacher KJ and Pillai S. Polymorphisms involving the transmembrane domains of human TAP2. *Immunogenetics* 1993; 38: 382.
- 117.- Kelly A, Powis SH, Glynn R, Radley E, Beck S, Trowsdale J. Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature* 1991; 353:667-668.
- 118.- Beck S, Kelly A, Radley E, Khurshid F, Alderton RP , Trowsdale J. DNA sequence analysis of 66 Kb of the human MHC class II region encoding a cluster of genes for antigen processing. *J Mol Biol* 1992; 228:433-441.
- 119.- Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Ploegh HL, Tonegawa S. TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell* 1992; 71:1205-1214.
- 120.- Ashton-Rickardt PG, Van Kaer L, Schumacher TNM, Ploegh HL, Tonegawa S. Peptide contributes to the specificity of positive selection of CD8+ T cells in the Thymus. *Cell* 1993; 73:1041-1049.

121.- Ljunggren HG, Kärre K. Host resistance directed selectively against H-2 deficient lymphoma variants: analysis of the mechanism. *J Exp Med* 1985; 162:1745-1759.

122.- Spies T, DeMars R. Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature* 1991; 351:323-324.

123.- Powis SJ, Townsend ARM, Deverson EV, Bastin J, Butcher GW, Howard JC. Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature* 1991; 354:528-531.

124.- Spies T, Bresnahan M, Bahram S, Arnold D, Blanck G, Mellins E, et al. A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature* 1990; 348:744-747.

125.- De la Salle H, Hanau D, Fricker D, Urlacher A, Kelly A, Salamero J, et al. Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science* 1994; 265:237-241.

126.- Yewdell J, Latham Ch, Bacik I, Spies T and Bennink J. MHC-Encoded proteasome subunits LMP2 and LMP7 are not require for efficient antigen presentation. *J Immunol* 1994; 152:1163-1170.

127.- Zhou X, Momburg F, Liu T, Abdel Motal UM, Jondal M, Hämmerling GJ, et al. Presentation of viral antigens restricted by H-2K<sup>b</sup>, D<sup>b</sup> or K<sup>d</sup> in proteasoma subunit LMP2- and LMP7-deficient cells. *Eur J Immunol.* 1994; 24:1863-1868.

128.- Müller KM, Ebensperger C and Tampé R. Nucleotide binding to the hydrophilic C-terminal domain of the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Med Biolog Chem* 1994; 269:14032-14037.

129.- Shepherd JC, Schumacher TM, Ashton-Rickardt G, Imaeda S, Ploegh HL, Janeway CA Jr et al. TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective. *Cell* 1993; 74:577-584.

130.- Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol* 1959; 20:156-159.

131.- Terasaki PI, Mc Clelland JD. Microdroplet assay of human serum cytokins. *Nature (Lond)* 1964; 204:998.

132.- Hirshberg H, Kaakine H, Thorsby E. Typing for HLA-D determinants. Comparison for typing results using homozygous stimulating cells and primed cultures. *Tissue Antigens* 1976; 16:335-367.

133.- Nuñez-Roldán A, Sasportes M, Fradeliz D. Análisis of products involved in primary and secondary allogenic proliferation in man. *Immunogenetics* 1978; 6:43-54.

- 134.- Charron DJ, McDevitt HO. Analysis of the HLA-D region associated molecules with monoclonal antibody. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76:6567-6571.
- 135.- Wake CT, Long EO, Strubin M, Gross N, Accolla R, Carrel S, Mach B. Allelic polymorphism and complexity of the genes of the HLA DR  $\beta$  chains-direct analysis by DNA-DNA hybridation. *Nature* 1982; 300:372-374.
- 136.- Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified  $\beta$ -globin and HLA-DQ $\alpha$  DNA with allele-specific oligonucleotid probes. *Nature* 1986; 324:163-166.
- 137.- Maeda M, Murayama N, Ishi H, Uryu N, Ota M, Tsuji K, Inoko H. A simple and rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. *Tissue Antigens* 1989; 34:290-298.
- 138.- Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1988; 33:30-37.
- 139.- Sinha AA, López MT, McDevitt HO. Autoimmune disease: the failure of self tolerance. *Science* 1990; 248:1380-1388.



- 140.- Townsend A, Bodmer H. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Ann Rev Immunol* 1989; 7:601-624
- 141.- Brown J, Jardetzky T, Saper M, Samraoui B, Bjorkman P, Wiley D. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988; 332:845-848.
- 142.- Cresswell P. Questions of presentation. *Nature* 1990; 343:593-594.
- 143.- Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 1955; 19:251-253.
- 144.- Maksymowych WP, Wessler A, Suárez-Almazor M, Pazderka J, Russell AS. Polymorphism in an HLA-linked proteasome gene influences phenotypic expression of disease in HLA-B27 individuals. *J Cell Biochem* 1993; Suppl 17B:134.
- 145.- Burney RO, Pile KD, Gibson K, Calin A, Kennedy LG, Sinnott PJ et al. Analysis of the MHC class II encoded components of the HLA class I antigen processing pathway in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 58-60.
- 146.- Wordsworth BP, Pile KD, Gibson K, Burney RO, Mockridge I, Powis SH. Analysis of the MHC-encoded transporters TAP1 and TAP2 in rheumatoid arthritis: linkage with DR4 accounts for the association with a minor TAP2 allele. *Tissue Antigens* 1993; 42: 153-155.

- 147.- Singal DP, Ye M, Qiu X, D'Souza M. Polymorphisms in the TAP2 gene and their association with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheum* 1994; 12:29-33.
- 148.- Marshal S, Hall MA, Panayi G, Lanchbury JS. Association of TAP2 polymorphism with rheumatoid arthritis is secondary to allelic association with HLA-DRB1. *Arthritis Rheumatism* 1994; 37:504-513.
- 149.- Ploski R, Undlien E, Vinje O, Forre O, Thorsby E, Ronningen KS. Polymorphism of human major MHC-encoded transporter associated with TAP genes and susceptibility to juvenile rheumatoid arthritis. *Human Immunology* 1994; 39: 54-60.
- 150.- Stastny P, Fink CW, and Fernandez-Viña M.J. Possible role of peptide transporter genes TAP1 and TAP2 in polyarticular juvenile Arthritis *Inmunol* 150 (8 part 2) 1993; 256A.
- 151.- Davies EJ, Donn RP, Hillarby MC, Grennam DM, Ollier WER. Polymorphism of the TAP2 transporter gene in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 61-63.
- 152.- Liblau R, van Endert PM, Sandberg-Wolheim M et al. Antigen processing gene polymorphism in HLA-DR2 multiple sclerosis. *Neurology* 1993; 43:1192-1197.
- 153.- Kellar-Wood HF, Powis SH, Gray J, Compston DAS. MHC-encoded TAP1 and TAP2 dimorphism in multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 1994; 43: 129-132.

- 154- Caillat-Zucman S, Bertin E, Timsit J, Boitard C, Assan R, Bach JF. Protection from insulin-dependent diabetes mellitus is linked to a peptide transporter gene. *Eur J Immunol* 1993; 23: 1784-1788.
- 155.- Ronningen KS, Undlien DE, Ploski R, Maouni N, Konrad RJ, Jensen E, et al. Linkage disequilibrium between TAP2 variants and HLA class II alleles no primary association between TAP2 variants and insulin dependent diabetes mellitus. *J Immunol* 1993; 23: 1050-1056.
- 156.- Yamazaki Y, Miyokawa N, and Katagiri M. Polymorphism of the TAP genes Japanese healthy control and type I Diabetes Mellitus. *Hokkaido J Med Sci* 1994; 69(2),337-346.
- 157.- Kawaguchi Y, Ikegami H, Fukuda M, Takekawa K, Fujioka Y, Fujisawa T, et al. *Life Sciences* 1994; 54:2049-2053.
- 158.- Jackson DG, Capra JD. TAP1 alleles in insulin-dependent diabetes mellitus. A newly defined centromeric boundary of disease susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:11079-11083.
- 159.- Stokes PL, Asquith P, Holmes GTK, Mckintosh P, Cooke WT. Inheritance and influence of histocompatibility (HLA) antigens in adults coeliac disease. *Gut* 1973; 14:627-630.
- 160.- Powis SH, Rosenberg WMC, Hall M, Mockridge I, Tonks S, Ivinson A et al. TAP1 and TAP2 polymorphism in coeliac disease. *Immunogenetics* 1993; 38: 345-350.

- 161.- Tighe MR, Hall MA, Cardi E, Ashkenazi A, Lanchbury JS, Ciclitira PJ. Associations between alleles of the MHC-encoded ABC transporter gene TAP2, HLA class II alleles and celiac disease susceptibility. *Human Immunol* 1994; 39: 9-16.
- 162.- Gregory WL, Daly AK, Dunn AN, Cavanagh G, Idle JR, James OFW et al. Analysis of HLA-class-encoded antigen-processing genes TAP1 and TAP2 in primary biliary cirrhosis. *Q J Med* 1994; 87:237-244.
- 163.- Powis SH, Cooper MD, Trowsdale J, Zhu ZB, Volanakis. Major histocompatibility Haplotypes associated with immunoglobulin-A deficiency and common variable immunodeficiency: Analysis of the peptide transporter genes TAP1 and TAP2. *Tissue Antigens* 1994; 43:261-265.
- 164.- Chevrier D, Giral M, Braud V, Soullillou JP, Bignon JD. Membranous nephropathy and TAP1 gene polymorphism. *N Engl J Med* 1994; 331:133-34.
- 165.- Castillo Palma MJ. Estudio combinado de moléculas de clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad mediante técnicas de microlinfotoxicidad y secuencia específica de oligonucleótidos. Sus aportaciones como índices diagnósticos y pronósticos en la enfermedad de Behçet (Tesis Doctoral). Sevilla 1993.
- 166.- Castillo Palma MJ, Sánchez Román J, Ocaña Medina C, González Escribano MF, Núñez Roldán A, López-Checa F. Tipaje HLA, serológico y molecular, en pacientes andaluces con enfermedad de Behçet.- Correlaciones genético-clínicas. *Medicina Clínica* 1995 (en prensa).

167.- Yélamos J, García Lozano JR, Moreno I, Aguilera I, González MF, García A et al. Association of HLA-DR4-Dw15 (DRB1\*0405) and DR10 with rheumatoid arthritis in a spanish population. *Arthritis Rheum* 1993; 36:811-814.

168.- Mach B, Tiercy JM:. Genotypic typing, of HLA class II: from the bench to the bedside. *Hum Immunol* 1991; 30: 278-284

169.- Mehra NK, Verduijn W, Taneja V, Drabbles J, Singh SP, Giphart MJ. Analysis of HLA-DR2-associated polymorphism by oligonucleotide hybridization in an Asian Indian population. *Hum Immunol* 1991, 32: 246-253.

170.- Svejgaard A, Rider LP. HLA and disease associations: Detecting the strongest association. *Tissue Antigens* 1994; 43:18-27.

171.- Woolf B. On stimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 1955; 19: 251-253.

172.- Haldane JBS. The stimation and significance of the logarithm of a ratio of frecuencies. *Ann Hum Genet* 1956; 2: 309-311.

173.- Benzécri JP. *Analyse des données*. Paris: Dunod, 1973.

174.- Lebart L, Morineau A, Warwick KW. *Multivariate description statistical analysis, correspondence analysis and related techniques for large matrices*. New York: Wiley, 1984.

175.- Sánchez Román J, Pulido Aguilera MC, Castillo Palma MJ, Ocaña Medina C, Toral Peña A, López-Checa F. Utilización de interferon alfa 2r en el tratamiento de las uveítis autoinmunes (primarias o asociadas a enfermedad de Behçet). *Med Clin* 1995 (en prensa).

176.- Graña Gil J, Sánchez Bursón J, Gómez Rodríguez N, Castro Romero B, Marini Díaz M, Rodríguez García E, Martínez Caamaño S. Manifestaciones vasculares en 30 casos de enfermedad de Behçet. *Rev Clin Esp* 1992;191: 375-379.

177.- Hughes JP, Stovin PGI. Segmental pulmonary artery aneurysms with peripheral venous thrombosis. *Br J Dis Chest* 1959; 53:19-27.

178.- Sánchez-Román J, Rey-Romero C, Castillo-Palma MJ, Toral-Peña A, Calderón E, Leal-Noval M et al. Behçet's disease: HTLV I/II retrovirus markers in a series of 35 patients. *Clin Rheumatol* 1994; 13:391.

179.- Castillo-Palma MJ, Sánchez Román J, González Escribano MF, López Checa, Toral Peña A. TAP1 and TAP2 polymorphisms in andalusian (Spain) Behçet's disease patients. *Clin Rheumatol* 1994;13:389.

180.- Ocaña Medina C, Sánchez Román J, Castillo Palma MJ, González Escribano F. Enfermedad de Behçet y polimorfismo de los genes TAP1 y TAP2 (Región de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad). *An Med Int* 1994; 11 (Supl.):17.

181.- Carratalá J, Moreno R, Knobel H, Vidaller A, Bosch J, San José A, Badrinas F, Fernandez-Nogués F. Enfermedad de Behçet. Estudio de 52 pacientes del area de Barcelona. *Rev Esp Rheumato* 1987; 14:218-223.

182.- Rodríguez Illera E, Praga Terente M, España Saz P, Durántez Martin A. Síndrome de Behçet: presentación de 9 casos. *Med Clin (Barcelona)* 1977; 69:331-335.

183.- Mitja J, Olmo JA, Granados J, Rotés J, Muñoz J, Centellas M, Brancós A. Síndrome de Behçet. Revisión a propósito de 11 casos. *Rev Esp Reum* 1976; 3:177-188.

184.- Oshima Y, Shimuzi T, Yokohari R, et al. Clinical Studies on Behçet's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1963; 22:36-45.

185.- Chamberlain MA. Behçet's syndrome in 32 patients in Yorkshire. *Ann Rheum Dis* 1977; 36:491-499.

186.- Colvard DM, Robertson DM, O'Duffy JD. The ocular manifestations of Behçet's disease. *Arch Ophthalmol* 1977; 95:1813-1817.

187.- Sánchez-Quijano A, Lissen-Otero E, García de Pesquera F, Herrera-Castro C, Castro-Artigas R, Carmona-Gonzalez M et al. Prevalencia de los marcadores serológicos de los virus A y B de la hepatitis en donantes voluntarios de Sevilla. *Gastroenterol Hepatol* 1983; 6: 22-30.

188.- Soto B, Rodrigo L, García-Bengoechea M, Sánchez Quijano A, Riestra S, Arenas JI et al. Heterosexual transmission of hepatitis C virus and the possible role of coexistent human immunodeficiency virus infection in the index case. A multicentre study of 423 pairings. *J Intern Med* 1994; 236:515-519.

189.- Sánchez Román J, Castillo Palma MJ, Toral Peña A, Navarrete Ortega M, García Escudero A, Rodríguez Cañas T, Capote Gil F. Tuberculin skin test in Behçet's disease patients from Andalusia (Spain). *Clin Rheumatol* 1994; 13:396.

190.- Castillo Palma MJ, Sánchez Román J, Ocaña Medina C, García Hernández F, Navarrete Ortega M. Reaccion patérgica y test de tuberculina en pacientes con enfermedad de Behçet. *An Med Int* 1994; 11 (Supl.):18.

191.- Powis S H, Mokridge I, Kelly A, Kerr LA, Glynne R, Gileadi U, Beck S, Trowsdale J. Polymorphism in a second ABC transport gene located within the class II región of the human histocompability complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992b; 89:1463-1467.

192.- Mishima S, Masuda K, Izawa Y, et al: Behçet's disease in Japan: Ophtalmologic aspects. *Trans Am Ophtalmol Soc* 1979; 76:225-279.

193.- Inaba G. Clinical features of neuro-Behçet sybdrome, in Lehner T, Barnes CG(eds): *Recent Advances in Behçet's disease*. London, Royal Society of Medicine Services, 1986 pp 235-246.



194.- O'Duffy JD, Robertson DM, Golstein NP. Cholrambucil in the treatment of uveitis and meningoencephalitis of Behçet's disease. *Am J Med* 1984;76:75-84.

195.-Mizuki N, Ohno S, Tanaka H, Sugimura K, Seki T, Mizuki N, Kera J, Inaba G, Tsuji K, Inoko H. Association of HLA-B51 and lack of association of class II alleles with Behçet's disease. *Tissue Antigens* 1992;40:22-30.

196.- Hamza M, Ayed K, Bardi R, Gorgi Y, Meddeb N. Maladie de Behçet et antigènes classes II et III du complexe majeur d'histocompatibilité. *Revue du Rhumatisme* 1990;57:59-61

UNIVERSIDAD DE LA PAZ

Reunido el Directorado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales en el día de la fecha, se aprobó el Tesis Doctoral de

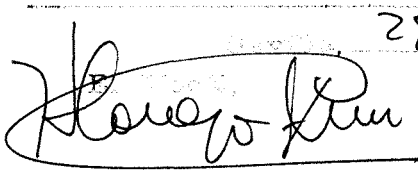
Dr.ª Celia Ocaña Medina

titulada Analisis de la Asociación entre Inf. de

BEHcet y Polimorfismo (firma de los transportados TAP-1 y TAP-2 (Codificado y el Registro de Clase II...))

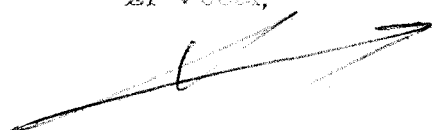
acordó otorgarle la calificación de APTO. CON LAUDE

28 de Septiembre 1995



El Decano,

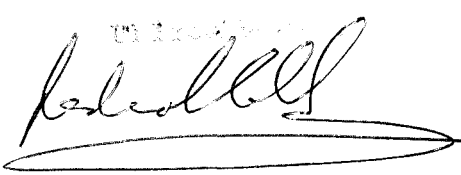
El Viced,



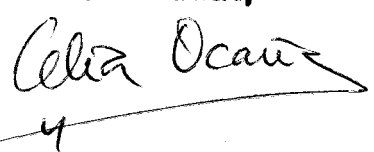
El Secretario,

El Secretario,

El Doctorado,





  
4