



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"**

**DETERMINACIÓN DE ALELOS HLA-DR EN FAMILIARES DE
PRIMER GRADO AFECTADOS Y NO AFECTADOS POR
ONICOMICOSIS DE PACIENTES MEXICANOS CON
ONICOMICOSIS DERMATOFÍTICA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALIDAD EN DERMATOLOGÍA**

P R E S E N T A

DRA. MARÍA TERESA GARCÍA ROMERO



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ROBERTO ARENAS GUZMÁN**

MÉXICO, D. F.

AGOSTO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Dermatología, Micología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” y en la División de Inmunogenética, Departamento de Trasplantes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán bajo la Dirección del Dr. Roberto Arenas Guzmán y del Dr. Julio Granados Arriola.

Este trabajo de Tesis con No. PROT-06-03-2010, presentado por el alumno Maria Teresa García Romero se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dr. Roberto Arenas Guzmán con fecha del 9 de agosto de 2010 para su impresión final.

Autorizaciones

Dr. Octavio Sierra Martínez
Director de enseñanza
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Luciano Domínguez Soto
Jefe de la División de Dermatología
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dra. Elisa Vega Memije.
Subdirectora de Investigación Biomédica
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

**DETERMINACIÓN DE ALELOS HLA-DR EN FAMILIARES DE PRIMER GRADO
AFECTADOS Y NO AFECTADOS POR ONICOMICOSIS DE PACIENTES
MEXICANOS CON ONICOMICOSIS DERMATOFÍTICA**

Colaboradores:

Nombre: Maria Teresa García Romero

Firma: _____

Nombre: Roberto Arenas Guzmán.

Firma: _____

Nombre: Dra. Elisa Vega Memije

Firma: _____

Nombre: Dr. Julio Granados Arriola

Firma: _____

ÍNDICE

Glosario	VIII
Relación de figuras y tablas	IX
Resumen	X
Abstract	X
1. Introducción	1
2. Antecedentes	
La onicomycosis	2
El sistema de antígeno leucocitario humano (HLA)	4
La onicomycosis y la respuesta inmune	8
Factores genéticos asociados a la onicomycosis	10
Genes de inmunidad adaptativa	10
Genes de la inmunidad innata	12
3. Justificación	14
4. Hipótesis.....	15
5. Objetivos	16
6. Material y Métodos	17
6.1 Tipo de estudio.....	17
6.2 Ubicación temporal y espacial.....	17
6.3 Criterios de selección de la muestra.....	17
6.4 Criterios de eliminación.....	17
6.5 Descripción operativa del estudio	18
6.6 Métodos de Laboratorio:	
Extracción de DNA.....	19
Tipificación de los alelos del locus HLA-B y HLA-DR	19
6.7 Análisis estadístico de los datos	20
7. Resultados	21
8. Discusión.....	26
9. Conclusiones.....	29
10. Perspectivas.....	30

11. Bibliografía.....	31
12. Anexos	
12.1 Anexo No. 1 Árboles genealógicos de las familias más representativas	36
12.2 Anexo No. 2 Hoja de consentimiento informado	47
12.3 Anexo No. 3 Hoja de captura de datos	48

GLOSARIO

HLA: Human leucocyte antigens (antígeno leucocitario humano)

MHC: Major histocompatibility complex (Complejo Mayor de Histocompatibilidad)

DNA: Acido desoxirribonucleico (ADN).

Onicomycosis: Infección fúngica de las uñas

Dermatofitosis: Infección de la piel y sus anexos por hongos dermatofíticos.

RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Localización y organización del complejo HLA en el cromosoma 6.

Figura 2. Procesamiento antigénico intracelular.

Figura 3. Procesamiento antigénico de proteínas extracelulares.

Tabla 1. Asociación entre la presencia de varios alelos HLA y enfermedades autoinmunes selectas.

Tabla 2. Haplotipos HLA-B con HLA-DR en pacientes sin onicomycosis.

Tabla 3. Haplotipos HLA-B con HLA-DR más frecuentes en pacientes con onicomycosis.

Tabla 4. Frecuencia génica de alelos del locus HLA-DR en pacientes con onicomycosis comparada con controles sanos.

RESUMEN

Se analizó la frecuencia de alelos HLA-B y HLA-DR en los familiares de pacientes con onicomycosis, tanto familiares afectados y no afectados por onicomycosis. En total se estudiaron 25 familias conformadas por 78 pacientes, de los cuales 47 tenían onicomycosis y 31 eran sanos. Al comparar los haplotipos conformados por HLA-B y HLA-DR no hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa, ya que el número de haplotipos sanos fue muy pequeño. Al comparar con controles históricos, se encontró una asociación del alelo HLA-DR8 y la presencia de onicomycosis ($p=0.03$, OR 1.89, IC 95% 0.98-36), por lo que posiblemente el tener este alelo confiera susceptibilidad para el desarrollo de onicomycosis. No se encontró relación alguna con el locus HLA-B.

ABSTRACT

We analyzed the frequency of HLA-B and HLA-DR alleles in patients with onychomycosis and their relatives with or without this mycosis. Seventy eight cases were studied in 25 families, 47 of them had onychomycosis and 31 were healthy. When HLA-B and HLA-DR haplotypes were compared, no statistically significant difference was found because the number of haplotypes in healthy patients was very small. When patients with onychomycosis were compared with historic controls, an association of the HLA-DR8 allele and the presence of onychomycosis was found ($p=0.03$, OR 1.89, IC 95% 0.98-36). Susceptibility for the development of onychomycosis can be related with this allele. No association was found with the HLA-B locus.

1. INTRODUCCIÓN

Las onicomicosis son las alteraciones ungueales más frecuentes en la consulta dermatológica. Afectan principalmente las uñas de los pies, y hasta en un 71% dependen de dermatofitos, siendo *T. rubrum* el agente causal más frecuente (85%). Son asintomáticas y generalmente se inician a partir de una infección superficial de la piel adyacente.

Existen factores predisponentes bien reconocidos, sin embargo se cree que hay una alteración inmunitaria en los pacientes afectados que permite que el dermatofito permanezca oculto del control inmune tanto humoral como celular. Además se ha observado que la afección por onicomicosis es muy común dentro de una misma familia, en algunos estudios incluso se señala un patrón de herencia autosómico dominante. Esto no puede atribuirse solamente a transmisión intrafamiliar, ya que también hay una muy baja prevalencia de onicomicosis en personas que se casan y viven por años con personas afectadas.

El sistema HLA participa en la fisiopatogenia de varias enfermedades con alteraciones de la respuesta inmune al estar involucrado en la presentación de antígenos y el inicio de la respuesta inmune. Por lo tanto, podría ser un factor clave en el desarrollo de onicomicosis, y hay estudios previos que sustentan esta hipótesis.

En este trabajo se buscó identificar haplotipos de alelos HLA-B con HLA-DR en pacientes con onicomicosis y sus familiares tanto afectados como no afectados que confieran susceptibilidad o resistencia al desarrollo de la enfermedad.

2. ANTECEDENTES

LA ONICOMICOSIS

Las dermatofitosis o tiñas son un conjunto de micosis superficiales que afectan la piel y sus anexos (pelo y uñas). Pueden adquirirse del ambiente, animales o ser humano y son causadas por un grupo de hongos parásitos de la queratina denominados dermatofitos que comprenden tres géneros: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*..^{1,2,3,4,5,6,7}

Presentan una distribución mundial y predominan en zonas tropicales. Afectan a cualquier edad, raza, sexo o medio socioeconómico. Constituyen el 70 a 80% de todas las micosis y tienen una frecuencia del 5% en la consulta dermatológica.^{1,2,3,4,5,7,8} Se estima que aproximadamente un 20% de la población norteamericana padece una infección dermatofítica con una prevalencia de 81 por cada 1000 habitantes.^{4,9}

En México se observan entre los 10 primeros lugares de la consulta dermatológica y las formas clínicas más frecuentes son las onicomicosis (30%) y las tiñas de los pies (25 a 30%)^{1,2,3,5,6,7,9}

Las onicomicosis son las onicopatías más frecuentes (40%).⁵ Predominan entre los 20 a 40 años de edad con una relación hombre-mujer de 2:1; En niños se observan en un 4 a 8%.^{1,5} Afectan en un 90% a las uñas de los pies y 10% en las manos, hasta un 71% dependen de dermatofitos, siendo *T. rubrum* el agente causal más frecuente (70 a 85%). Son ocasionadas por *Candida sp* en 10 a 20% y por mohos no dermatofitos en 4 a 5%.^{1,3,4,5,7,8,10}

Son asintomáticas y se caracterizan por hiperqueratosis subungueal, estrías longitudinales, cambios de coloración, paquioniquia y onicolísis. De acuerdo a su presentación clínica se pueden dividir en: onicomicosis subungueal distal y lateral

(OSDL), onicomycosis blanca superficial (OBS), onicomycosis subungueal blanca proximal (OSBP) y onicomycosis distrófica total (ODT),^{1,2,8}

Por lo general, el padecimiento suele iniciarse a partir de una tiña de la piel lampiña.¹¹ Chanussot y cols. encontraron un frecuencia del 76.5% en tiña de los pies de localización plantar y del 67.1% en tiña interdigital en pacientes con onicomycosis del servicio de dermatología del Hospital Gea González.¹¹ El hongo invade la queratina avanzando a través de una red de túneles excavados (red transversa de Alkiewics) dirigiéndose hacia la matriz ungueal. Comienzan en el borde distal de la uña y en menor proporción en los bordes laterales, proximal o parasitan superficialmente la lámina ungueal^{1,2,4}

El diagnóstico se hace mediante un examen directo micológico en el que se observa al microscopio material obtenido del raspado de la uña con hidróxido de potasio (KOH) al 30% o con negro de clorazol para identificar las estructuras fúngicas, sean filamentos o esporas. El ideal es obtener crecimiento del hongo causal en un cultivo en agar Sabouraud o Mycosel, sin embargo las tasas de aislamiento son muy bajas, del 20 al 30%.^{1,2}

Los principales factores predisponentes incluyen: humedad, maceración, oclusión, traumatismos, diabetes e inmunosupresión.^{1,2,10,12}

EL SISTEMA DE ANTÍGENO LEUCOCITARIO HUMANO (HLA)

El sistema de antígeno leucocitario humano (HLA) es la versión humana del complejo principal de histocompatibilidad (CMH) que contiene 300 genes en una porción de cuatro millones de pares de bases en el cromosoma 6, dentro de éste, se encuentra el sistema HLA que abarca 6 *loci*. Algunos de los genes dentro de este sistema tienen que ver con la regulación de la respuesta inmune y se clasifican dentro de tres grandes grupos: clase I, clase II y clase III, los cuales son estructural y funcionalmente distintos.^{13,14} (Figura 1.)

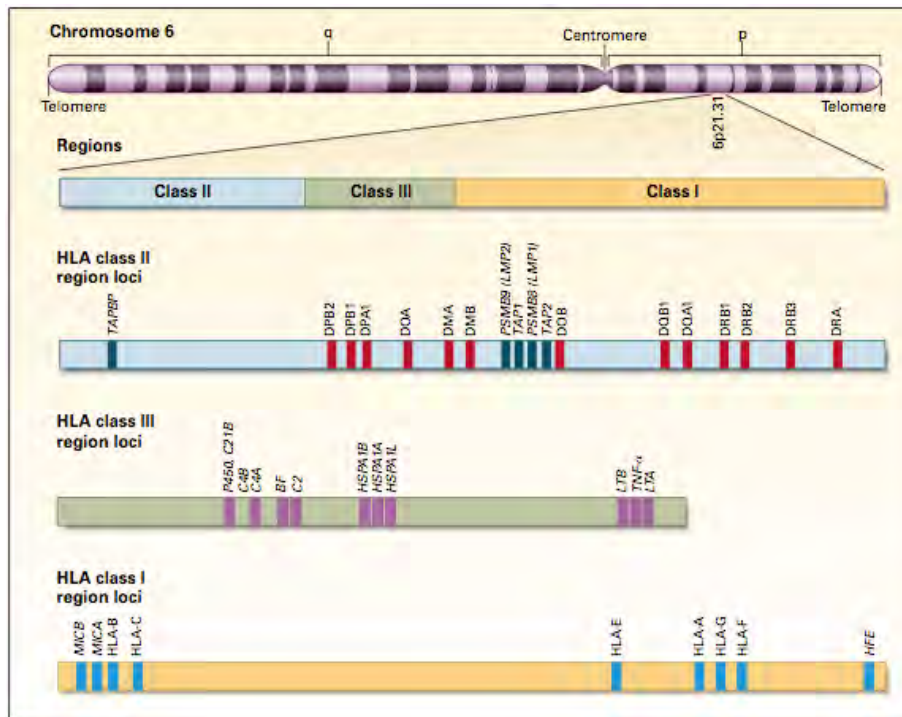


Figura 1. Localización y organización de complejo HLA en el cromosoma 6 (N Engl J Med 2000;343(10)).

Los genes del HLA clase I (A, B y C) se expresan virtualmente en todas las células nucleadas y están involucradas en la presentación de péptidos a linfocitos T CD8+. (Figura 2)

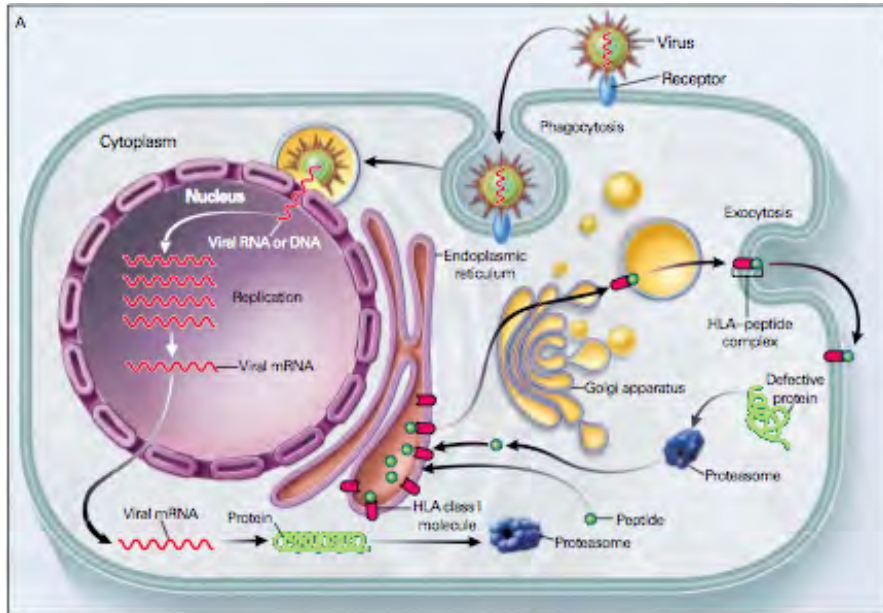


Figura 2. Procesamiento antigénico intracelular- Muestra la generación de péptidos por medio de las moléculas de HLA clase I. Las proteínas defectuosas son degradadas por proteosomas. Los péptidos seleccionados son después transportados hacia el retículo endoplásmico donde son cargados dentro de una molécula de clase I recién sintetizada y exportados hacia la superficie de la célula. (N Engl J Med 2000;343(10)).

Los genes del HLA clase II (DP, DQ y DR) se expresan constitutivamente en un subgrupo de células del sistema inmune que incluye linfocitos B, linfocitos T activados, macrófagos, células dendríticas y células epiteliales del timo. Una de las principales funciones de estas moléculas clase II es la presentación de fragmentos de péptidos antigénicos de infecciones extracelulares a las células T CD4+ para poder desencadenar una respuesta inmune adaptativa.^{13,14,15,16} (Figura 3).

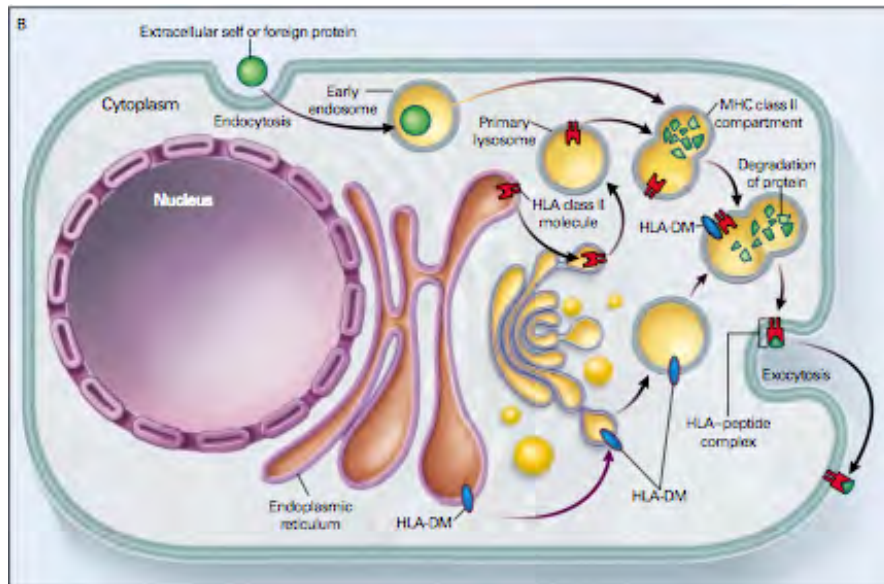


Figura 3. Muestra el procesamiento de proteínas extracelulares. Las proteínas extrañas son capturadas por endocitosis o fagocitosis y secuestradas dentro de los endosomas. Las moléculas de clase II sintetizadas en el retículo endoplásmica son liberadas hacia los lisosomas primarios, los cuales se unen con los endosomas para formar el compartimiento de clase II del CMH. Los complejos péptido-HLA son después exportadas hacia la superficie celular. (N Engl J Med 2000;343(10)).

Los genes de clase II codifican para las cadenas alfa y beta de polipéptidos de las moléculas de clase II. La designación de sus loci en el cromosoma 6 consiste en 3 letras: la primera (D) indica la clase, la segunda (M,O,P,Q o R) la familia y la tercera (A o B) la cadena alfa o beta. Los genes individuales del sistema HLA son diferenciados por números arábigos, y la notación para las numerosas variantes alélicas de estos genes es un número precedido por un asterisco. Por ejemplo, HLA-DRB1*0401 es una variante alélica 0401 del gen 1, el cual codifica para la cadena beta de la clase molecular tipo II perteneciente a la familia R.^{13,14,15,16,17}

Los genes del HLA clase III codifican moléculas importantes para el sistema inmune, componentes del sistema del complemento y citocinas.¹⁸

La introducción de técnicas de biología molecular en la tipificación de los genes HLA ha permitido identificar con gran exactitud aquellas combinaciones alélicas, que induciendo alteraciones inmunológicas, originan diferentes grados de riesgo o protección para una determinada enfermedad.^{15,17,19} (Tabla 1).

Enfermedad	Marcador HLA asociado	Riesgo relativo de enfermedad
Espondilitis anquilosante	B27	87.4
Artropatía reactiva	B27	37.0
Artritis reumatoide	DR4	4.2
Síndrome de Behcet	B51	3.8
Lupus eritematoso sistémico	DR3	5.8
Diabetes mellitus insulino dependiente	DR3	3.3
	DQB1*0201	2.4
	DR4	6.4
	DQB1*0302	9.5
	DR2	0.190.15
	DQB1*0602	
Enfermedad de Addison idiopática	DR3	6.3
Enfermedad de Graves	DR3	3.7
Enfermedad celíaca	DR3	10.8
Dermatitis herpetiforme	DR3	15.9
Miastenia gravis	DR3	2.5
	B8	3.4
Síndrome de Goodpasture	DR2	15.9
Esclerosis múltiple	DR2	4.1
Pénfigo vulgar (en judíos Ashkenazi)	DR4	14.4
Psoriasis vulgaris	Cw6	13.3

Tabla 1. Asociación entre la presencia de varios alelos HLA y enfermedades autoinmunes selectas. (modificado de N Engl J Med 2000;343(10)).

El HLA-DR4 es el alelo más frecuente en la población mestizo mexicana con una frecuencia aproximada de 23%.^{19,20}

LA ONICOMICOSIS Y LA RESPUESTA INMUNE

El desarrollo de la respuesta inmune en infecciones fúngicas depende de dos factores principales: La especie causal y el grado de hipersensibilidad del huésped. La colonización dermatofítica produce una reacción inmune secundaria a los productos metabólicos del hongo que actúan como factores de virulencia. Las queratinasas y proteasas digieren la queratina y liberan antígenos (glucoproteínas) fúngicos.¹

Las dermatofitosis, sin embargo, pueden mostrar una diversidad clínica extraordinaria: pueden ser agudas e inflamatorias o crónicas y no inflamatorias como resultado de la interacción entre el hongo parásito y la respuesta inmune del hospedero.^{21,22}

No se conocen bien las alteraciones inmunitarias en las dermatofitosis, es probable que las células de Langerhans de la epidermis procesen los productos metabólicos del hongo y los presenten a neutrófilos y linfocitos. Sin embargo, en la onicomicosis el dermatofito permanece oculto del control inmune dentro de la lámina ungueal y la hiperqueratosis producida en el curso de la infección fúngica.²³ Tanto la inmunidad humoral como la celular responden para eliminar al hongo, y los mecanismos de defensa no específicos del hospedero previenen invasión a tejidos más profundos. Anticuerpos específicos se encuentran presentes en pacientes infectados (Ig M, IgG, IgA, IgE) pero no parece que provean protección substancial contra la infección. Se sabe que la inmunidad mediada por células es la piedra angular de la defensa contra infecciones dermatofíticas y la depresión específica de la inmunidad celular predispone a infecciones severas y diseminadas. En particular *T. rubrum* produce mananos que disminuyen la intensidad de la respuesta inmune medida por células y crean condiciones favorables para la persistencia fúngica, que resulta en infecciones crónicas no inflamatorias.^{21,23} Se ha postulado que los pacientes con onicomicosis no pueden evocar una respuesta celular adecuada para eliminar el dermatofito y se ha

postulado que tengan deprimida la reactividad de hipersensibilidad retardada.¹⁸ Este déficit inmunológico selectivo, y tal vez inducido, puede ser relativamente común ya que hasta el 20% de la población general tiene una infección fúngica crónica.²¹

FACTORES GENÉTICOS ASOCIADOS A LA ONICOMICOSIS

Las infecciones crónicas por dermatofitos, como la onicomicosis, son típicamente asintomáticas, demostrando una adaptación exitosa del hongo al organismo humano. La inmunidad celular juega un papel importante para erradicar a los dermatofitos del organismo. Los individuos con inmunidad alterada tienen infecciones fúngicas diseminadas y recurrentes.¹⁸

Se han documentado casos de onicomicosis por *T. rubrum* en algunos miembros de una misma familia lo que sugiere un factor genético.^{24,25,26,27,28} English et al. en 1957 hicieron el primer comunicado de onicomicosis por *T. rubrum* en familias, donde el 27% de los familiares de los pacientes de 19 familias estaban infectados.²⁹

Zaias et al estudiaron a 12 familias de pacientes con onicomicosis subungueal distal por *T. rubrum* que mostraron por árbol genealógico un patrón de herencia autonómico dominante.²⁶ Esto no puede atribuirse a transmisión intrafamiliar, ya que hay una muy baja prevalencia de infección por este dermatofito en personas que se casan y viven por años con personas afectadas.^{25,26}

GENES DE INMUNIDAD ADAPTATIVA

Es conocido que el HLA participa en varias enfermedades con alteraciones de la respuesta inmune.^{15,16,17} La inmunidad celular disminuída es un factor de riesgo bien conocido para la onicomicosis, y la inmunidad celular intacta es crítica para erradicar dermatofitos de la piel. El sistema HLA está involucrado en regular respuestas inmunes y los genes de HLA clase II tienen un papel en la presentación de antígenos. Una gran proporción de genes del CMH están involucrados en la respuesta inmune, y la región del CMH se caracteriza por efectos de un fuerte desequilibrio de unión (*strong linkage disequilibrium effects*) entre los genes.^{30,31} Por lo tanto, cualquier alelo HLA asociado a enfermedad

puede ser solamente un marcador del verdadero gen de la susceptibilidad a la enfermedad, con el que está en desequilibrio de unión (LD).^{15,16,,17}

Se han hecho estudios con el propósito de verificar si hay susceptibilidad o resistencia a la infección crónica por *T. rubrum*, pero aún hay controversia. En estudios previos se ha reportado una relación entre los antígenos de histocompatibilidad y la incidencia de la enfermedad. En un estudio inicial de Ahmed et al, se encontró una alta frecuencia de HLA-A26, HLA-AW33 y HLA-DR4 en 29 pacientes con dermatofitosis crónica de los pies. Midieron también un anticuerpo anti sustancia intercelular que se había descrito previamente en pacientes con dermatofitosis crónica (ICS) e inmunoglobulina E que se había implicado en prolongar crecimiento fúngico, e incluso tipificaron el grupo sanguíneo. Concluyeron que si un paciente tiene historia de atopía, niveles altos de IgE, grupo sanguíneo A, y presentara los alelos HLA-A26 y/o HLA-DR4, este paciente tendría un riesgo alto de desarrollar una infección crónica.³²

Posteriormente Zaitz et al,²⁴ estudiaron en Brasil a un grupo de judíos Ashkenazi con onicomycosis. Se incluyeron 12 casos y 10 controles (judíos ashkenazi sin onicomycosis) a los que se les determinó alelos HLA por pruebas serológicas y técnicas de PCR. Se encontró que el HLA-DR52 estaba presente en los 22 pacientes (casos y controles). Por otro lado, el HLA-DR53 (HLA-DR4) se expresó en 3 de los casos (25%) y en 10 controles (100%), de los cuales 60% expresaron HLA-DR7. Se concluyó que el HLA-DR53 juega un papel importante en la respuesta inmune de las células T a los péptidos fúngicos y actúa como un factor protector en la susceptibilidad de desarrollar onicomycosis crónica por *T.rubrum*.²⁴

Sadahiro et al, continuaron este estudio¹⁸ y analizaron la frecuencia de alelos HLA en 25 pacientes judíos Ashkenazi brasileños con dermatofitosis crónica por *T. rubrum* y compararon con 25 individuos sanos de la misma población. Se encontró que HLA-B14 fue más frecuente en el grupo control, indicando una posible asociación con resistencia a infección y desarrollo de la enfermedad por *T.*

rubrum. El HLA-DQB1*06 se asoció a susceptibilidad, estando presente con mayor frecuencia en los casos, y fue estadísticamente significativo. Estos autores sugieren que una o más regiones comunes de la molécula probablemente pueden unirse a antígenos de *T. rubrum*, modulando negativamente la respuesta inmune al hongo por las células T. En otras palabras, presentando péptidos fúngicos que no inducen una respuesta celular protectora (Th1), limitando la acción en el hongo y consecuentemente permitiendo que persista en el organismo humano.¹⁸

En un estudio reciente en pacientes mexicanos, Asz-Sigall et al, encontraron una asociación significativamente baja del alelo HLA-DR6 y onicomycosis por *T. rubrum* en pacientes mexicanos, comparando pacientes con onicomycosis confirmada por clínica y cultivo con el grupo control, lo cual sugiere que el HLA-DR6 confiere protección contra la infección.³³ Al igual que estudios previos^{24,25,26}, este estudio demostró un patrón familiar de onicomycosis, y que el riesgo de adquirir la infección aumenta significativamente en aquellos con un familiar de primer grado afectado. Entre familiares de primer grado, la asociación más fuerte y más significativa se observó con niños, cuyos padres tuvieron un riesgo 9 veces mayor de adquirir la onicomycosis si sus hijos estaban afectados. Estos resultados sugieren una susceptibilidad genética para la onicomycosis en pacientes mexicanos.

También se ha estudiado la asociación entre alelos HLA y otras micosis como paracoccidioidomycosis (encontrándose HLA-A9, -B13 y B40),³⁴ coccidioidomycosis (HLA-DRB1*1301),³⁵ criptococosis (HLA-B*5601),³⁶ histoplasmosis (HLA-B22 and -B17)³⁷ y cromoblastomycosis (HLA-A29).³⁸

GENES DE INMUNIDAD ADAPTATIVA

No solamente se ha estudiado el papel de HLA en la respuesta inmune contra infecciones fúngicas. Irfan Kaya et al, estudiaron muestras de sangre periférica de 43 pacientes con onicomycosis en pies y 30 controles con el objetivo de medir la

población de linfocitos T regulatorios (Treg) CD25+CD4+. Se sabe que éstos son una subpoblación de linfocitos T CD4+ que tienen un papel clave supresor de la acción efectora de linfocitos T que conlleva a la eliminación del agente patógeno pero inflamación extensa. Encontraron que los pacientes con onicomicosis tenían una expresión más alta de células Treg CD25+CD4+ que los controles. Estos resultados pueden sugerir que tener un número incrementado de estas células puede favorecer persistencia de patógenos, como un mecanismo de tolerancia del huésped para prevenir reacciones inflamatorias patológicas.²¹

Por último, se han estudiado extensamente una red de receptores de patrones de reconocimiento que reconocen partes microbianas (patrones moleculares asociados a patrones o PAMPs) y moléculas endógenas producidas por tejido dañado. Estos regulan muchos aspectos de la inmunidad inata y determinan la polarización y función de la inmunidad adaptativa, pero también participan en mantener la homeostasis tisular mediante la reparación y regeneración tisular. Los más estudiados de estos sensores son los receptores tipo toll (*toll-like receptors* o TLRs), de los cuales se han identificado mutaciones y polimorfismos comunes que han hecho posible determinar su papel en la susceptibilidad a la infección y se han asociado con muchas enfermedades no infecciosas.⁴¹

Los TLRs son cruciales en varios aspectos de la eliminación de microbios, incluyendo el reclutamiento de fagocitos al sitio de infección, la eliminación de microbios y activación de células dendríticas que inducen activación de células T. Se han descrito 13 TLRs que reconocen una amplia variedad de estructuras patógenas, como por ejemplo TLR1 y TLR2 que reconocen triacil lipopéptidos bacterianos, TLR3 que reconoce RNA bacteriano, TLR4 que reconoce lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas. Específicamente para infecciones fúngicas se ha encontrado en diferentes estudios que TLR4 y TLR2 reconocen hifas y conidias e inducen FNT-alfa, IL-10 y otras citocinas proinflamatorias indispensables para eliminación fúngica.⁴²

3. JUSTIFICACIÓN

La onicomicosis tiene una alta frecuencia en la consulta dermatológica (5%),^{1,5} siendo una de las 10 primeras causas de consulta y existen pocos estudios de asociación entre moléculas del HLA y el desarrollo de onicomicosis dermatofítica en pacientes mexicanos. No hay estudios que relacionen el HLA y el desarrollo de la onicomicosis dermatofítica en pacientes y su asociación con familiares afectados.

La identificación de los factores genéticos que confieren susceptibilidad o protección tiene implicaciones para aplicaciones farmacogenéticas futuros. La onicomicosis requiere cursos largos de tratamiento con antifúngicos sistémicos, y los derivados azólicos en particular pueden causar hepatotoxicidad. La falla terapéutica no es rara, y puede deberse a resistencia a múltiples fármacos. Los genes asociados a la enfermedad pueden ser responsables de la variación farmacogenética entre individuos, y por tanto su identificación puede ayudar a racionalizar la terapéutica futura.

Se necesitan más estudios epidemiológicos sobre la asociación de la onicomicosis y el HLA, ya sean grupos de casos y controles más grandes o estudios de asociación familiar, y en poblaciones étnicas diversas. Si se identifican factores predisponentes y predisposición genética, será posible informar adecuadamente a las familias susceptibles y desarrollar medidas preventivas para reducir la recurrencia. Pacientes con una susceptibilidad genética conocida y que tienen además diabetes mellitus, infección por VIH o cualquier enfermedad que incrementa el riesgo de padecer onicomicosis, necesitarían tomar medidas adicionales para evitar la infección.

4. HIPÓTESIS

El HLA-DR6 se ha asociado con una menor probabilidad genética para la presencia de onicomycosis dermatofítica en pacientes mestizos mexicanos, por lo que al estudiar familias de pacientes afectados y no afectados por onicomycosis encontraremos que el tener el alelo HLA-DR6 proveerá un factor de protección para no tener onicomycosis con una razón de momios menor a 1.

Además de un alelo de protección, se hizo un diseño de estudio en familias buscando encontrar un alelo HLA-DR que provea susceptibilidad para la onicomycosis.

5. OBJETIVOS

1. Determinar alelos HLA-DR asociados con una menor o mayor probabilidad genética para la presencia de onicomycosis dermatofítica en pacientes mexicanos y en sus familiares afectados y no afectados por onicomycosis.
2. Comprobar si el alelo HLA-DR6 se asocia con una menor probabilidad de presentar onicomycosis como se ha reportado en un estudio previo.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Tipo de Estudio: Estudio transversal, de casos y controles.

6.2. Ubicación Temporal y Espacial.

Servicio de Dermatología, Departamento de Micología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” y Departamento de Trasplantes del INCMNSZ (Enero 2010 a Julio 2010).

6.3. Criterios de Selección de la Muestra

- a) Pacientes mestizos mexicanos de nacimiento (que tengan 2 generaciones previas de mexicanos nacidos en México) con **diagnóstico clínico de onicomicosis**, éste último confirmado por examen directo y/o cultivo micológico positivos para un hongo dermatofito. A estos se les considerará como casos índices.
- b) Sus familiares de primer grado **con o sin diagnóstico clínico de onicomicosis**, en caso de tenerlo éste deberá estar confirmado por examen directo y/o cultivo micológico positivos para un hongo dermatofito.
- c) Tanto pacientes (casos índice) como familiares deberán haber leído, aceptado y firmado la hoja de consentimiento informado para participar en el protocolo.

6.4 Criterios de Eliminación

- a) Pacientes que no acepten participar en el estudio
- b) Pacientes cuya muestra de sangre periférica no sea suficiente para la extracción del DNA y tipificación de alelos HLA DR.

6.5 Descripción operativa del estudio

1. Se invitó a participar a los pacientes que cumplieran los criterios de inclusión y se les explicó el motivo del estudio, pidiendo que se firmara la carta de consentimiento informado. El paciente era motivado a traer a sus familiares para que participaran en el estudio.

2. A cada paciente y/o familiar se le exploró clínicamente. En caso de haber datos clínicos de onicomycosis, se tomó un examen directo micológico que se observó al microscopio con KOH. En caso de ser positivo se tomó un raspado de uña para cultivo en agar Sabouraud y Sabouraud con antibióticos (Micobiótico).

A los familiares sin datos clínicos de onicomycosis no se les realizó ni examen directo micológico ni cultivo.

3. A todos los pacientes y/o familiares se les realizó una venopunción con Vacutainer y se extrajeron 5 ml de sangre venosa periférica. Cada tubo se identificó con los datos de la persona y se almacenó a 4°C hasta que se trasladó al Departamento de Trasplantes del INCMNSZ.

4. Una vez en el INCMNSZ, se procedió a realizar la extracción de DNA y determinación de alelos HLA-B y DR.

6.6 Métodos de laboratorio

Extracción de DNA

Se utilizaron muestras de sangre total (5 ml) recogidas en tubos de tratados con EDTA que se almacenaron a 4°C. Se centrifugaron a 2.000 × *g* durante 20 minutos para separar el material en tres capas: una capa inferior que contiene principalmente hematíes, una capa superior de plasma y una delgada capa blanca en la interfase enriquecida en leucocitos. Se utilizó una pipeta de 1 ml para recoger cuidadosamente los leucocitos enriquecidos (capa leucocitaria) de la interfase. Un volumen de 250 µl de capa leucocitaria (obtenido a partir de 2,5 ml de sangre total) se procesó usando el cartucho de Maxwell® 16 Blood DNA y el método de capa leucocitaria.

Tipificación de los alelos del locus HLA-B y HLA-DR

Se realizó la tipificación de los alelos de los loci HLA DR y HLA B mediante técnicas de baja resolución a nivel del DNA que incluyeron la reacción en cadena de la polimerasa y el revelado con oligonucleótidos específicos de secuencia (PCR-SSO).. La información acerca de la secuencia de HLA DR se obtuvo del 12o Taller Internacional de Histocompatibilidad.

6.7 Análisis estadístico de los datos

Se realizó mediante el programa Stat-Calc dentro del paquete EPIINFO® para determinar la razón de momios con un intervalo de confianza del 95%.

7. RESULTADOS

En total se obtuvieron muestras de sangre periférica de 78 casos, tanto sanos como enfermos, conformando un total de 25 familias (las imágenes de las familias más representativas pueden consultarse en el Anexo 1).

De estos 78 casos, 47 tuvieron onicomycosis confirmada por examen directo y/o cultivo positivo. Los otros 31 eran familiares sanos.

En cuanto a la etiología de los casos de onicomycosis, en el 88% de los cultivos que fueron positivos (15/17) creció *T. rubrum*, 6% (1/17) *Scopulariopsis sp* y 6% (1/17) *T. tonsurans*. Solamente tomamos en cuenta para el análisis los casos de onicomycosis por *T. rubrum*.

Tabla 1. Haplotipos HLA-B con HLA-DR en pacientes sin onicomycosis (n=28).

<u>Haplotipo</u>	<u>Frecuencia</u>
B14DR1	4
B15DR1	1
B15DR11	1
B15DR15	1
B35DR1	2
B35DR8	5
B38DR8	1
B39DR5	1
B39DR8	1
B39DR14	1
B40DR14	2
B44DR13	2
B48DR15	1
B54DR13	2
B55DR15	1
B57DR1	1
B58DR13	1

Las frecuencias de haplotipos HLA-B con HLA-DR se contabilizaron para los enfermos y para los sanos. Los haplotipos determinados en pacientes sanos que ya se hubieran encontrado en pacientes enfermos de la misma familia no se tomaron en cuenta, y por esta razón el número de haplotipos de pacientes sanos fue muy reducido (28 haplotipos), haciendo imposible la comparación entre estos dos grupos.

Tabla 2. Haplotipos HLA-B con HLA-DR más frecuentes en pacientes con onicomicosis (n=71).

<u>HLA B</u>	<u>HLA DR</u>
B35	DR16
	DR11
	DR4
	DR1
	DR14
	DR13
	DR8
B48	DR14
	DR4
	DR15
	DR8
B44	DR4
	DR13
	DR7
	DR3
B51	DR11
	DR8
	DR13
	DR14
B18	DR3
	DR15
	DR11
	DR4
B15	DR12
	DR4
	DR8
	DR7
B39	DR4
	DR14
	DR8

Debido a la alta variabilidad de haplotipos HLA-B con HLA-DR, se decidió limitar la comparación con controles sanos a los alelos del *locus* HLA-DR que sí mostraban un patrón de agrupamiento más claro.

Tabla 3. Frecuencia génica de alelos del locus HLA-DR en pacientes con onicomicosis comparada con controles sanos.

Locus HLA-DR	Pacientes N=71		Controles N=762		p	OR	IC 95%
	n	F.G.	N	F.G.			
DR4	20	0.281	196	0.257	NS	1.92	(1.04-3.54)
DR8	15	0.211	93	0.122	0.03		
DR14	10	0.140	67	0.087	NS		
DR7	6	0.084	69	0.090	NS		
DR13	6	0.084	66	0.086	NS		
DR1	4	0.056	62	0.081	NS		
DR11	3	0.042	46	0.090	NS		
DR3	2	0.028	54	0.070	NS		
DR15	2	0.028	45	0.059	NS		
DR10	1	0.014	12	0.015	NS		
DR12	1	0.014	6	0.007	NS		
DR16	1	0.014	38	0.049	NS		

La tabla 3 muestra las frecuencias génicas en los pacientes con onicomicosis comparados con las presentes en individuos sanos pertenecientes al mismo grupo étnico.

Como se ve, en ambos grupos el alelo más frecuente es el HLA-DR4, lo que demuestra que ambos grupos tienen la misma etnicidad.

El resto de las frecuencias génicas de los distintos alelos fue semejante tanto en los casos como en los controles, excepto para el alelo HLA-DR8, que ocurrió de manera aumentada en el grupo de pacientes comparado con el de controles ($p=0.03$, OR 1.92, IC 95% 1.04-3.54).

8. DISCUSIÓN

Este trabajo mostró un papel preponderante del *locus* HLA-DR en la susceptibilidad al desarrollo de onicomycosis en individuos mestizos mexicanos. En particular, mostró asociación con el alelo HLA-DR8 que fue significativamente más frecuente en el grupo de pacientes afectados.

De la misma manera este trabajo descarta el papel del *locus* HLA-B en dicha susceptibilidad y, en consecuencia, el papel del HLA-DR es independiente del haplotipo del que forma parte.

Nosotros encontramos un alelo de susceptibilidad en el *locus* HLA-DR pero no demostramos uno de resistencia, como fue reportado recientemente por Asz-Sigall y cols. en pacientes mestizos mexicanos con onicomycosis. En este trabajo la frecuencia del HLA-DR6 fue semejante en casos y en controles. Es muy probable que ambos grupos de pacientes pertenezcan al mismo estrato socioeconómico pero los sesgos de selección en el trabajo de Asz-Sigall y su grupo difieran de nuestros hallazgos, ya que en éste trabajo se enfatizó la incorporación de familias, particularmente con más de un enfermo en cada familia nuclear; mientras que el de Asz-Sigall tuvo un diseño de población abierta.

Al comparar con lo informado previamente en la literatura, nuestros resultados concuerdan con el trabajo de Ahmed et al, en el que encontraron que el que un paciente tuviera el alelo HLA-A26 y/o HLA-DR4 le confería un riesgo alto de desarrollar una dermatofitosis crónica.³²

Sin embargo no concuerdan con lo encontrado previamente en los dos estudios en pacientes judíos ashkenazi brasileños, que sabemos son un grupo homogéneo, con poca mezcla genética y que por lo tanto tienen un perfil de HLA bien conocido. En el estudio de Zaits et al, lo que se encontró fue una frecuencia mayor de HLA-DR52 en pacientes con onicomycosis y de HLA-DR53 en los pacientes sanos, sin

embargo en un número muy pequeño de pacientes. Sadahiro et al, compararon 25 pacientes de este mismo grupo étnico con dermatofitosis crónica y 25 pacientes sanos, y encontraron que el alelo HLA-B14 se asoció con resistencia y posiblemente el alelo HLA-DQB1*06 se asoció con susceptibilidad a la dermatofitosis crónica.¹⁸

Es lógico que los perfiles inmunogenéticos de este grupo tan homogéneo de judíos ashkenazi brasileños sean distintos a los pacientes mestizos mexicanos, que son descendientes de la mezcla conformada por habitantes autóctonos de diferentes etnias indígenas con otros grupos étnicos como españoles y negros, en menor proporción.³⁰ Sin embargo en lo que concuerdan estos trabajos es en el papel tan importante de estos antígenos en la modulación de la respuesta inmune y el desarrollo de una infección fúngica crónica como es la onicomycosis.

El mecanismo por el que el HLA-DR8 identifica la susceptibilidad a onicomycosis es diverso, probablemente multifactorial, donde el factor genético contribuye parcialmente; sin embargo, este trabajo es particularmente útil pues incluyó familiares no consanguíneos de los casos índice de cada familia y en ellos el papel del HLA-DR8 se mantuvo independientemente de los factores ambientales. De cualquier manera ese factor genético es poligénico y los genes estudiados regulan la respuesta inmune pero particularmente la adaptativa, será importante añadir en el futuro a ésta marcadores genéticos de moléculas involucradas en la inmunidad innata, como los receptores tipo toll presentes en células fagocíticas. De cualquier manera, este trabajo confirma el papel de la inmunidad adaptativa en la susceptibilidad al desarrollo de onicomycosis.

Finalmente, cabe señalar que en la población mestiza mexicana, y en los indígenas americanos, el alelo HLA-DR8 es el segundo más frecuente, lo que sugiere un proceso de selección natural en contra de patógenos que participaron en las epidemias del siglo XVI que depoblaron el continente americano y en donde el alelo HLA-DR8, al igual que el HLA-DR4, fueron extraordinariamente eficientes

en la eliminación de virus y bacterias pero que a través de los años y de las generaciones, este HLA-DR8 identifica al individuo vulnerable a la onicomycosis, como lo sugieren los datos del presente trabajo.

De acuerdo a los datos actuales el desarrollo de onicomycosis, si bien multifactorial, tiene un fondo genético de susceptibilidad tanto innato como adaptativo en donde el HLA-DR parece particularmente involucrado.

9. CONCLUSIONES

En este trabajo se confirmó el papel del sistema HLA en la respuesta inmune de las células T hacia los antígenos fúngicos y se identificó a la presencia del alelo HLA-DR8 como un probable factor de susceptibilidad para tener onicomycosis dermatofítica en un grupo de familias de mestizos mexicanos.

No se identificó un alelo HLA que confiera resistencia en este grupo de pacientes mexicanos, sin embargo el número de haplotipos en los pacientes sanos fue muy reducido.

No se encontró un papel específico del locus HLA-B en la susceptibilidad o resistencia a la onicomycosis, en consecuencia, el papel del HLA-DR es independiente del haplotipo del que forma parte.

10. PERSPECTIVAS

Sería conveniente ampliar el número de familias para obtener un número suficiente de pacientes sanos con quienes realizar la comparación de frecuencias génicas en vez de recurrir a un grupo control histórico.

Este estudio solamente contempla el papel del locus HLA-DR en la respuesta inmune adaptativa para el desarrollo de onicomicosis, sin embargo, existen muchas otras moléculas relacionadas con la respuesta inmune innata que deben estudiarse en un futuro, como son las células T reguladoras y los receptores toll like.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Arenas R. Micología Médica Ilustrada. México Interamericana McGraw Hill 2003:61-83.
2. Bonifaz A. Micología Médica Básica. México Méndez Editores 2000:35-60.
3. Arenas R, Bonifaz A, Padilla MC. Micosis superficiales. Tercera revisión del consenso nacional de prevención, diagnóstico y tratamiento. UNAM 2006:15-29.
4. Vander Straten M, Hossain M, Ghannoum M. Cutaneous infections: Dermatophytosis, onychomycosis and tinea versicolor. Infect Dis Clin N Am 2003;17:87-112.
5. Arenas R. Dermatofitosis en México. Rev Iberoam Micol 2002;19:63-67.
6. Ríos L, Suchil P, Reynoso S, et al. Incidencia de micosis en el servicio de micología del Centro Dermatológico Pascua, en el año de 1991. Revista del Centro Dermatológico Pascua 1993;2(2):74-80.
7. Garg A, Venkatesh V, Singh M, Pathak KP, Kaushal GP, Agrawal SK. Onychomycosis in central India: a clinicoethiologic correlation. Int J Dermatol 2004;43(7):498-502.
8. Arenas R. Las onicomycosis. Aspectos clínico-epidemiológicos, micológicos y terapéuticos. Gac Med Méx 1990;126(2):84-91.
9. Méndez-Tovar JL, Lemini-López A, Hernández-Hernández F, Manzano-Gayosso P, Blancas-Espinoza R, López-Martínez R. Frecuencia de micosis en tres comunidades de la sierra norte de Puebla. Gac Med Méx 2003;139(2):118-122.

10. Ruíz-Esmenjaud J, Arenas R, Rodríguez-Álvarez M, Monroy E, Felipe Fernández R. *Tinea pedis* y onicomicosis en niños de una comunidad indígena Mazahua. *Gac Méd Méx* 2003;139(3):215-220.
11. Chanussot C, Arenas R. Infección micótica plantar e interdigital en pacientes con onicomicosis. *Rev Iberoam Micol* 2007;24:118-121.
12. Sigurgeirsson B, Steingrímsson O. Risk factors associated with onychomycosis. *JEADV* 2004;18:48-51.
13. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343(10): 702-709.
14. Klein J, Sato A. The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343(11): 782-786.
15. Vega-Memije ME, Sáez de Ocariz MM, Cortés-Franco R, Domínguez-Soto L, Granados-Arriola J. Análisis de HLA-DR en pacientes mexicanos con pénfigo. *Gac Méd Méx* 2001;137(6):535-40.
16. Hojyo-Tomoka T, Granados J, Vargas-Alarcón G, Yamamoto-Furusho JK, Vega-Memije ME, Cortés-Franco R et al. Further evidence of the role of HLA-DR4 in the genetic susceptibility to actinic prurigo. *J Am Acad Dermatol* 1997;36:935-37.
17. García-Corona C, Vega-Memije ME, Mosqueda-Taylor A, Yamamoto-Furusho JK, Rodríguez-Carreón AA, Ruiz-Morales JA et al. Association of HLA-DR4 (DRB1*0404) with human papillomavirus infection in patients with focal epithelial hyperplasia. *Arch Dermatol* 2004;140(10):1227-1231.

18. Sadahiro A, Feresin-Moraes JR, Hue-Moraes ME, Romero M, Alves de Lima Gouvea N et al. HLA in Brazilian ashkenazic jews with chronic dermatophytosis caused by *T. rubrum*. *Braz J Microbiol* 2004;35:69-73.
19. De Leo C, Castelan N, López M, et al. HLA class I and Class II alleles and haplotypes in Mexican mestizos established from serological typing of 50 families. *Hum Biol* 1997;69(6):809-18.
20. Barquera R, Zúñiga J, Hernández-Díaz R, Acuña-Alonzo V, Montoya-Gama K et al. HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico. *Mol Immunol* 2008;45(4):1171-8.
21. Kaya TI, Eskandari G, Guvenc U, Gunes G, Tursen U et al. CD4+CD25+ Treg cells in patients with toenail onychomycosis. *Arch Dermatol Res* 2009;301:725-9.
22. Zaias N, Rebell G. Chronic dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* *J Am Acad Dermatol* 1996;35:S17-S20.
23. Maleszka R, Adamski Z, Dworacki G. Evaluation of lymphocytes subpopulations and natural killer cells in peripheral blood of patients treated for dermatophyte onychomycosis. *Mycoses* 2001;44:487-92.
24. Zaitz C, Campbell I, Moraes JR, Moraes ME, Gouvea C, Romero M et al. HLA-associated susceptibility to chronic onychomycosis in Brazilian Ashkenazi Jews. *Int J Dermatol* 1996; 35(9): 681-2.
25. Faergemann J, Correia O, Nowiki R, Ro BI. Genetic predisposition. Understanding underlying mechanisms of onychomycosis. *JEADV* 2005; 19 (suppl.1):17-19.

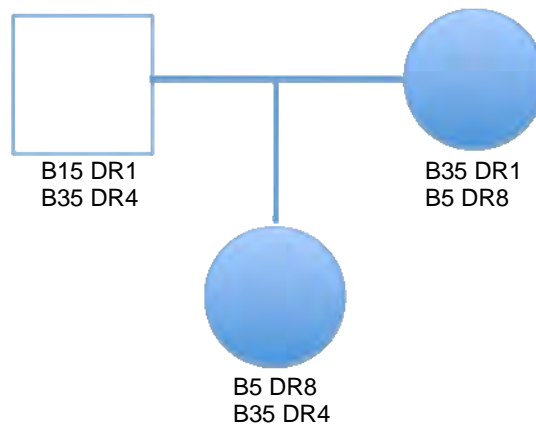
26. Zaias N, Tosti A, Rebell G, Morelli R, Bardazzi F, Bieleley H et al. Autosomal dominant pattern of distal subungual onychomycosis caused by *Trichophyton rubrum*. *J Am Acad Dermatol* 1996;34:302–304.
27. Chang P, Logemann H. Onychomycosis in children. *Int J Dermatol* 1994;33(8):550-1.
28. Many H, Derbes VJ, Friedman L. *Trichophyton rubrum*: exposure and infection within household groups. *Arch Dermatol* 1960;82:226-9.
29. English MP. *Trichophyton rubrum* infection in families. *BMJ* 1957:744-6.
30. Weckmann AL, Vargas-Alarcón G, López M, González N, De Leo C et al. Frequencies of HLA-A and HLA-B alleles in a Mexico City mestizo sample. *Am J Hum Biol* 1997;9:1-5.
31. Joshi A. Hardy-Weinberg equilibrium and the foundations of evolutionary genetics. *Resonance* 2008:951-70.
32. Ahmed AR, Schreiber P, Aiello J, Tiwari JL, Terasaki PI. A preliminary report on the role of some immunologic factors in persistence of chronic tinea pedis. *Clin Exp Dermatol* 1985;10(1):45-50.
33. Asz-Sigall D et al. HLA-DR6 association confers protection against *T. rubrum* onychomycosis in indigenous Mexicans. *Int J Dermatol En Prensa* 2010.
34. Dias MF, Pereira AC, Pereira A, Alves MS. The role of HLA antigens in the development of paraccocidioidomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 2000;14(3):166-71.

35. Louie L, Ng S, Hajjeh R, Johnson R, Vugia D, Werner SB et al. Influence of host genetics on the severity of coccidioidomycosis. *Emerg Infect Dis* 1999; 5(5):672-80.
36. Van Dam MG, Seaton RA, Hamilton AJ. Analysis of HLA association in the susceptibility to infection with *Cryptococcus neoformans var. gatti* in papua New guinean population. *Med Mycol.* 1998; 36(3):185-8.
37. Taylor ML, Pérez-Mejía A, Yamamoto-Furusho JK, et al. Immunologic, genetic and social human risk factors associated to histoplasmosis: studies in the state of Guerrero, Mexico. *Mycopathologia* 1997;138(3):137-42.
38. Tsuneto LT, Arce-Gómez B, Petzl-Erler ML, et al. HLA-A29 and genetic susceptibility to chromoblastomycosis. *J Med Vet Mycol* 1989;27(3):181-5.
39. Glanz S. *Primer of biostatistics.* McGraw Hill 1992.
40. Pamer EG. TLR polymorphisms and the risk of invasive fungal infection. *N Eng J Med* 2008;359(17):1836-8.
41. Montero-Vega MT, de Andrés-Martín A. The significance of toll-like receptors in human diseases. *Allergol Immunopathol* 2009;37(5):252-63.
42. Galich VLG, Pina A, Felonato M, Bernardino S, Costa TA et al. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;53:1-7.

12. ANEXOS

Anexo 1. Árboles genealógicos de las familias más representativas.

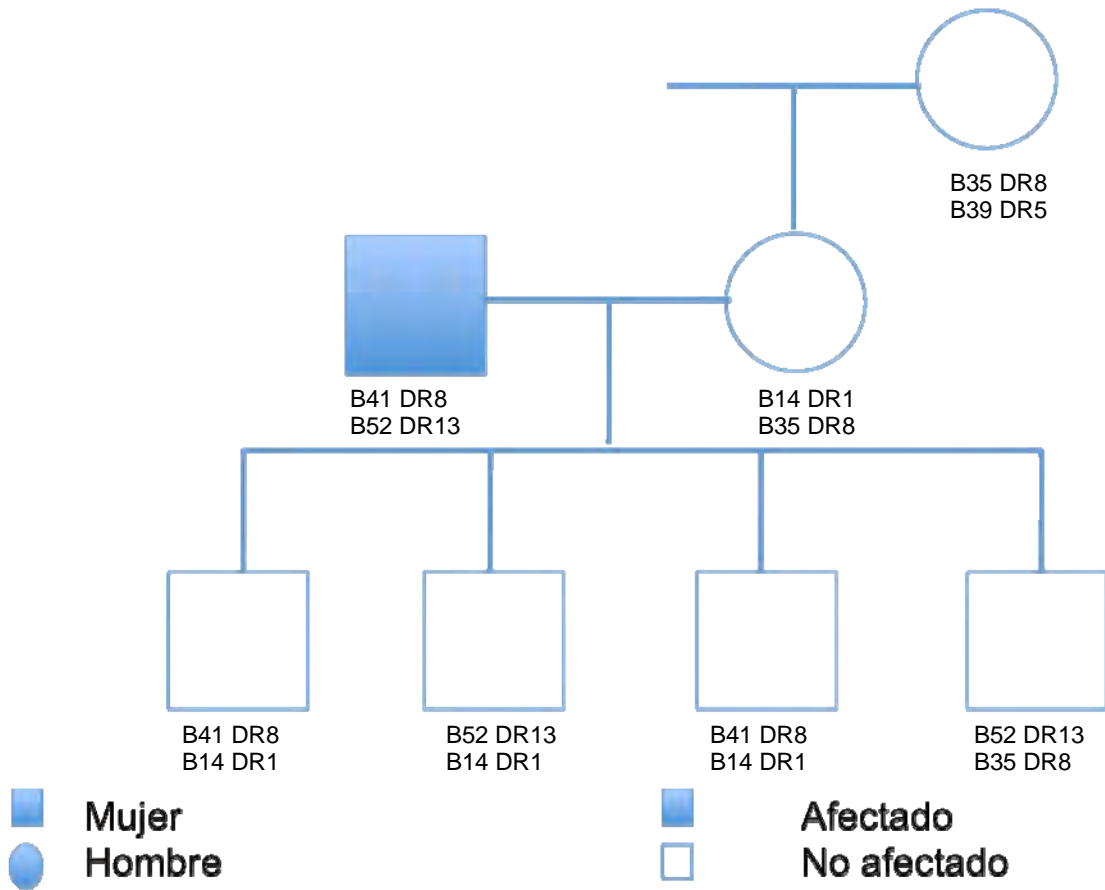
FAMILIA 2



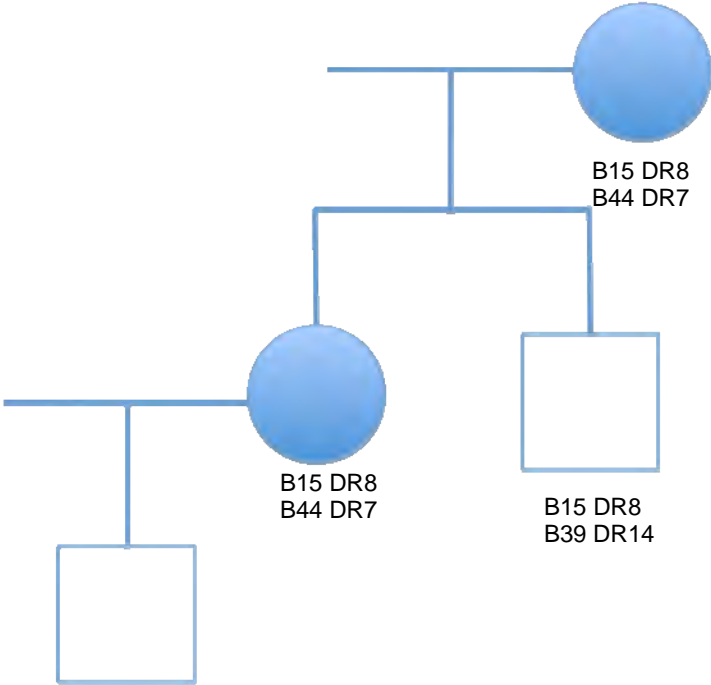
■ Mujer
● Hombre

■ Afectado
□ No afectado

FAMILIA 4



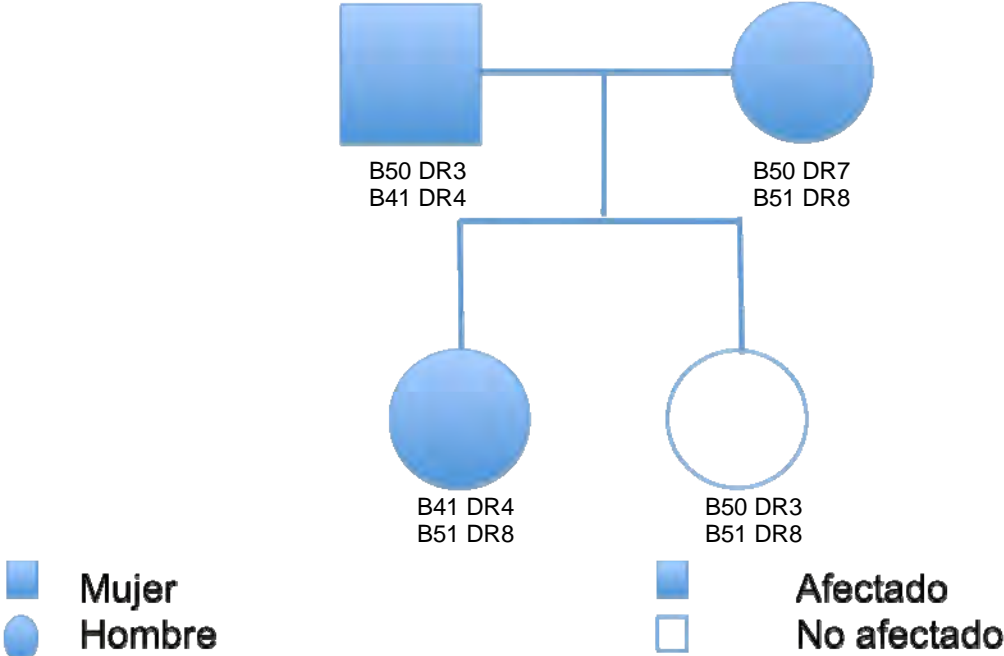
FAMILIA 8



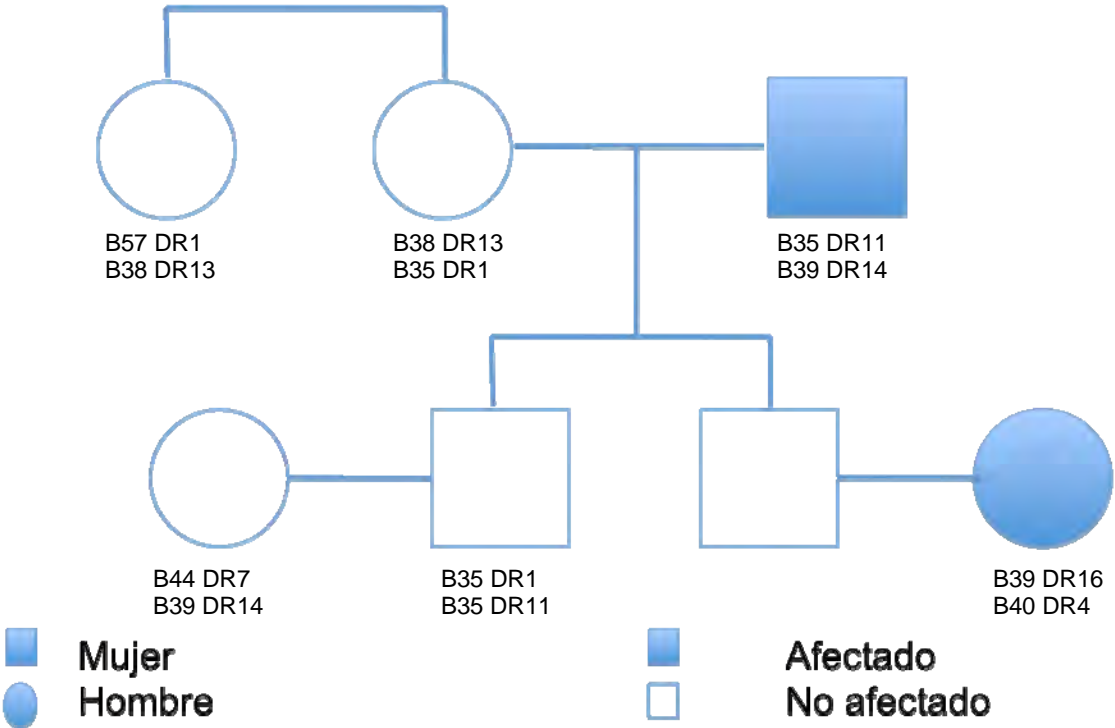
■ Mujer
● Hombre

■ Afectado
□ No afectado

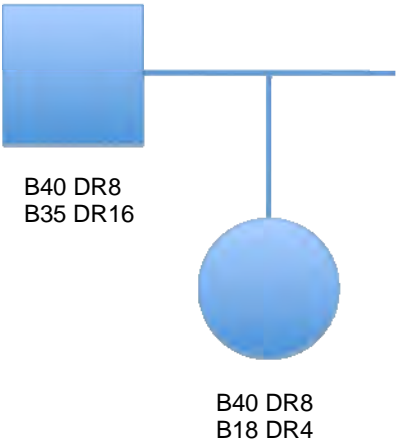
FAMILIA 11



FAMILIA 12



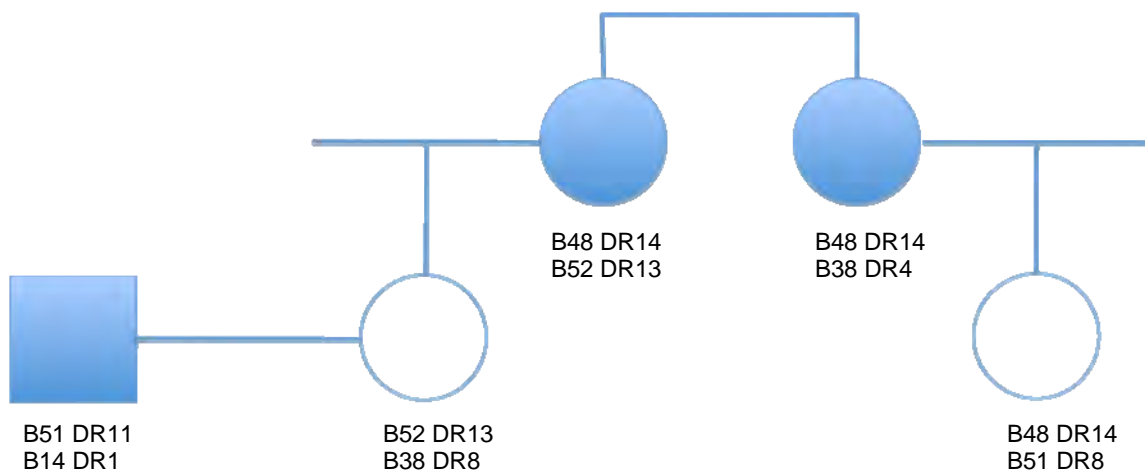
FAMILIA 14



■ Mujer
● Hombre

■ Afectado
□ No afectado

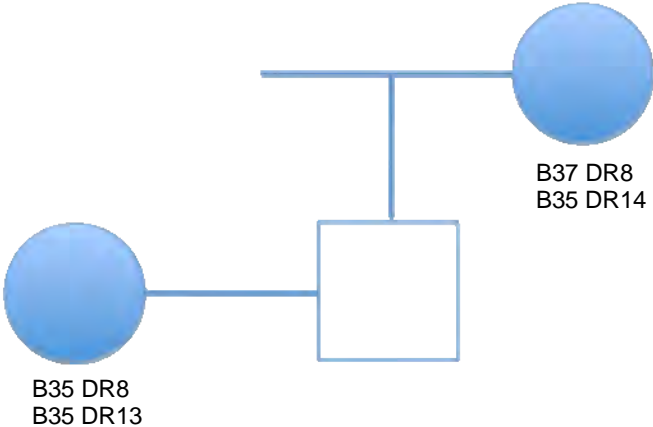
FAMILIA 15



■ Mujer
● Hombre

■ Afectado
□ No afectado

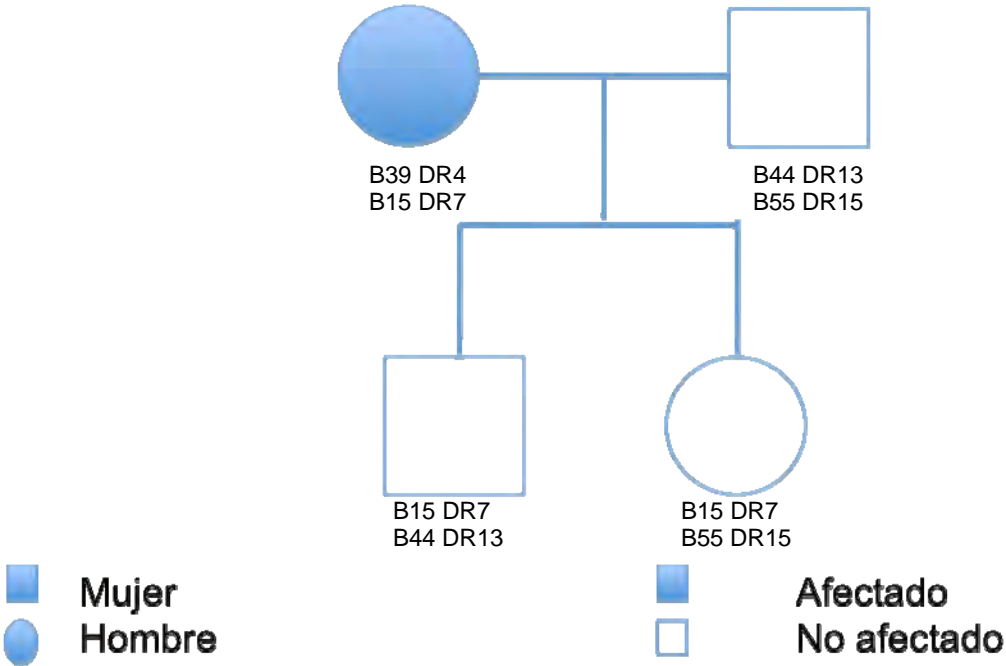
FAMILIA 17



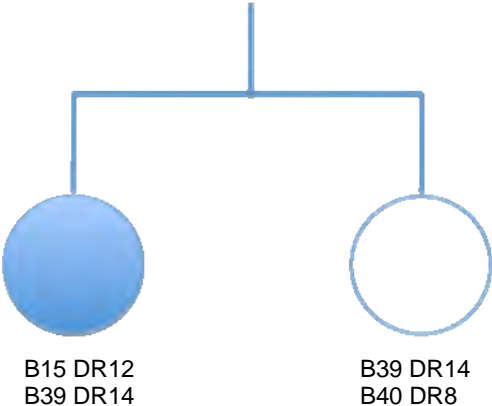
■ Mujer
● Hombre

■ Afectado
□ No afectado

FAMILIA 19



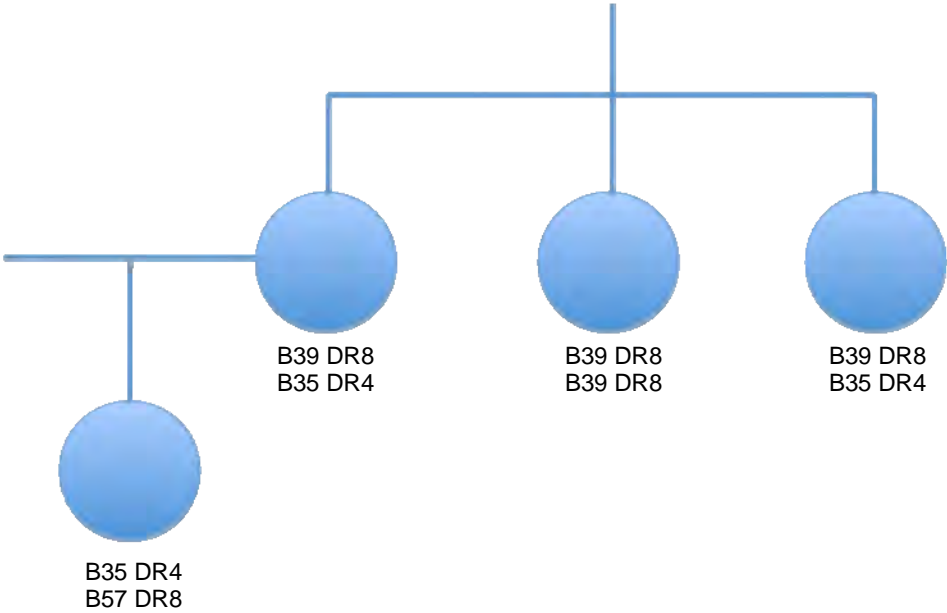
FAMILIA 23



■ Mujer
● Hombre

■ Afectado
□ No afectado

FAMILIA 24



■ Mujer
● Hombre

■ Afectado
□ No afectado

Anexo 2. Carta de consentimiento informado

Secretaría de Salud. Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

De acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y con La ley General de Salud, Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos CAPITULO I Disposiciones Comunes. Artículo 13 y 14.- En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Debido a que esta investigación se consideró como riesgo mínimo o mayor de acuerdo al artículo 17 y en cumplimiento con los siguientes aspectos mencionados con el Artículo 21:

La Dra. Maria Teresa García Romero del Departamento de Dermatología me ha explicado que está trabajando en un estudio sobre la infección de las uñas por hongos y su relación con la genética. Con este estudio se beneficiará a todos los pacientes con infección de las uñas por hongos. Al ser yo familiar de primer grado (hijo o padre) de una persona que tiene hongos en las uñas, se me propone participar en el estudio para determinar si hay factores genéticos o hereditarios que faciliten a la infección.

Se me ha informado que se me hará una exploración física de mi piel y mis uñas. En caso de haber sospecha de infección por hongos en las uñas, se tomará un raspado con una cureta de mis uñas, el cual se examinará al microscopio y se sembrará en un cultivo para determinar qué especie de hongo es la causante de la infección. Además se tomará una muestra de sangre, que no necesitaría tomarse de no ser por mi participación en el estudio. Nada de esto tendrá ningún costo.

Se me explicó que la toma de sangre de 5 ml (una jeringa pequeña) puede dar como resultado moretones, sangrado e infección, y éstos se resolverán con las indicaciones del médico en 1 o 2 semanas. Esta sangre se utilizará solamente para estudiar los factores genéticos relacionados con la infección por hongos de las uñas.

Entiendo que los resultados de este estudio ayudarán a entender mejor la infección por hongos de las uñas y su relación hereditaria, y así tal vez idear mejores medidas de prevención y tratamiento para mí y los otros pacientes.

Se me ha asegurado que puedo preguntar hasta mi complacencia todo lo relacionado con el estudio y mi participación

Se me aclaró que puedo retirar mi muestra de sangre del estudio en cuanto yo lo decida.

Autorizo la publicación de los resultados de mi estudio a condición de que en todo momento se mantendrá el secreto profesional y que no se publicará mi nombre o revelará mi identidad.

Con fecha _____, habiendo comprendido lo anterior y una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi participación en el proyecto, acepto participar en el estudio titulado:
DETERMINACIÓN DE ALELOS HLA-DR EN FAMILIARES DE PRIMER GRADO AFECTADOS Y NO AFECTADOS POR ONICOMICOSIS DE PACIENTES MEXICANOS CON ONICOMICOSIS DERMATOFÍTICA

Nombre y firma del paciente o responsable legal

Nombre, y firma del testigo 1
Dirección
Relación que guarda con el paciente

Nombre, y firma del testigo 2
Dirección
Relación que guarda con el paciente

Nombre y firma del Investigador Responsable o Principal

Este documento se extiende por duplicado, quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o de su representante legal y el otro en poder del investigador.

Para preguntas o comentarios comunicarse con el Dr. Octavio Sierra Martínez, Director de Enseñanza e Investigación al (01 55) 40003000 ext. 3218.

