



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICO ESPECIALISTA EN REUMATOLOGIA

Asociación entre los alelos HLAII-DR B1/DQA1-B1 y el índice de daño
SLICC/ACR en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico de la
Ciudad de Chihuahua.

PRESENTA

DRA. NATALIA MINERVA SANTANA PORTILLO

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ MORENO RODRÍGUEZ

Chihuahua, Chihuahua, Agosto 2021



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.

Santana N ¹ , Moreno J ² , Pérez B³ , Monarrez J.⁴ , Granados J⁵.

Natalia Minerva Santana Portillo

Lago de Bustillos 3010

Colonia Lomas del Santuario

Chihuahua, Chih.

México

CP 31204

Teléfono 6144274436

Correo nataliasantana15@yahoo.com

Tutor: Dr. José Moreno.

Asesor: Dr. Joel Monarrez

¹ Natalia Minerva Santana, Reumatóloga, Hospital General Regional # 1, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Chihuahua, Chih. México.

² José Moreno, MC, Jefe de la UIM en Enfermedades Autoinmunes, Centro Médico Nacional Siglo XXI, México, D.F.

³ Martha Pérez, UIM en Inmunología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, México, D.F.

⁴ Dr. Joel Monarrez, Hospital Regional # 1, Chihuahua, Chihuahua.

⁵ Dr. Julio Granados INNSZ

Índice de contenido

Portada

Glosario

Capítulo 1.- Glosario

Capítulo 2.- Resumen

Capítulo 3.- Antecedentes

3.1.- Introducción

3.2.- Epidemiología

3.3 Etiología

3.4.- Cuadro Clínico

3.5.- Pronóstico

3.6.- Índice de daño SLICC/ACR DS

3.7.- Efecto de la morbilidad y la mortalidad en el LES

3.8.- Daño tisular ocasionado por formación de auto anticuerpos, activación del sistema de complemento y activación de otros sistemas proinflamatorios.

3.9.- Activación de linfocitos T en el LES

3.10.- Generalidades del Antígeno Leucocitario Humano (HLA o CMH)

3.11.- HLA Y LES

3.12.- Desequilibrio de Enlace

3.13.- Enfermedades Genéticas como él LES

Capítulo 4.- Justificación

Capítulo 5.- Pregunta de Investigación

Capítulo 6.- Objetivos

Capítulo 7.- Hipótesis

Capítulo 8.- Metodología

8.1.- Diseño de estudio

8.2.- Población de estudio

8.3.- Criterios de Inclusión/exclusión

8.4.- Muestreo

8.5.- Variables de estudio

8.5.1.- Dependiente

8.5.2.- Independiente

8.5.3.- Otras variables

8.6.- Recursos Humanos

8.7.- Descripción general de recopilación de datos

8.8.- Visita 1

8.9.- Visita 2

8.10.- Consideraciones éticas

8.11.- Criterios de Clasificación para LES/ACR

8.12.- Consentimiento Informado

8.13.- Número de registro

8.14.- Participación

8.15.- Confidencialidad

8.16.- Riesgos, beneficios e inconvenientes

CAPÍTULO 9.- Procedimientos para el análisis y tipificación del HLAI

9.1.- Metodología de extracción de ADN

9.2.- Preparación de soluciones

9.3.- Dilución de ADN

9.4.- Electroforesis y Espectrofotometría

9.5.- Técnica de PCR para tipificación de moléculas HLA-DQA1 y DQB1

9.6.- Técnica de oligotyping para tipificación de DRB1

Capítulo 10.- Resultados y Análisis de Datos

Resultados de la Tipificación de HLAI DQA1, DQB1 Y DRB1

en pacientes y controles (144n)

10-1.- Resultado de frecuencias alélicas de HLAI DR1, DQA1 y DQB1 y

SLICC

10.2.- Análisis de Datos, Cuadros, Tablas, Figuras

Capítulo 11.- Discusión

Capítulo 12.- Bibliografía

CAPÍTULO 1.-GLOSARIO

ADN: Acido Desoxi-ribonucleico

Alelo: Variante de un gen dado polimórfico en un locus genético

Alotipo: Variante de los alelos de un antígeno que no existe en todos los individuos, por lo anterior puede ser Inmunogenico en miembros de la misma especie que poseen diferentes versiones del alelo.

Bp: Bases pùricas

Complejo inmune: Complejo que se forma por la unión de antígeno-anticuerpo y

Complemento: Grupo de proteínas séricas, algunas de las cuales actúan en cascada e intervienen en procesos inflamatorios.

CPA: Célula presentadora de antígenos. Presentan un péptido antigénico procesado y HLA clase II al receptor de células T sobre las CD4 (macrófagos, células dendríticas, células B.)

Desequilibrio de enlace: aparición de dos alelos heredados juntos con mayor frecuencia de lo esperado, dé acuerdo con el producto de sus frecuencias individuales

Haplotipos: Conjunto de variantes alelicas presentes en determinada región genética

HLA: Antígeno Leucocitario Humano. Región génica codificadora de las moléculas que intervienen en la presentación de antígenos a las células T

Interleucina: Algunas citocinas secretadas por los leucocitos

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

Mb: megabase

PHW o LHW: Prueba o ley de Hardy Weinberg

RCP: Reacción en cadena de la polimerasa

RcT: Receptor de células T

Restricción de HLA: Necesidad de que las células T solo reconozcan el antígeno procesado, cuando es presentado por moléculas HLA del haplotipo original asociado con la programación de las células T.

Secuencia señal de recombinación (RSS): Secuencia conservada heptamérica (7 nucleótidos) – nonaméricas (de 9 nucleótidos) separadas por un espaciador de 12 a 23 pares que aparecen en posición 3' de los segmentos génicos variables, 5' y 3' de los segmentos génicos de unión, tanto en los genes de receptores de inmunoglobulinas como en los de células T. Actúan como secuencias de reconocimiento para las enzimas recombinasas que median el proceso de reordenamiento génico relacionado con la generación de diversidad de receptor de antígeno linfocitario

SLEDAI: Instrumento de medición para evaluar el índice de actividad de la enfermedad avalada por Colegio Americano de Reumatología

SLICC/ACR DS: Instrumento de medición creado por la Colaboración, Clínica Internacional de Lupus Eritematoso Sistémico avalada por el Colegio Americano de Reumatología, midiendo la severidad de la enfermedad

SNPs: Polimorfismo de nucleótido único

*Definiciones tomadas del libro de Inmunología Fundamentos de Roitt. 10ª Edición

(2003) Editorial Médica Panamericana*

CAPÍTULO 2.- RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Se ha postulado que algunos rasgos clínicos y fisiopatológicos del lupus eritematoso sistémico (LES) pueden ser determinados genéticamente, pero los marcadores de riesgo son diferentes en cada etnia. **OBJETIVO:** Determinar si existe asociación entre el índice de daño SLICC/ACR ID y los genotipos y alelos HLA-DRB1, DQA1 Y DQB1 en pacientes con lupus eritematoso sistémico, comparados con controles.

MATERIAL Y MÉTODOS: Integración del índice de daño mediante evaluación clínica y paraclínica, con determinación de los genotipos y alelos de HLA-DRB1 y DQA1 Y DQB1 mediante tipificación por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en 77 pacientes con LES.

Capítulo 3.- ANTECEDENTES

3.1.- INTRODUCCIÓN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida, definida por un amplio espectro de manifestaciones clínicas y por la presencia en la sangre de anticuerpos dirigidos contra uno o varios componentes intracelulares (Mills, 1994).

3.2.- EPIDEMIOLOGÍA

La distribución geográfica de esta enfermedad varía en las diversas regiones del mundo; en América del Norte y algunas regiones de Europa su prevalencia es de aproximadamente 40 por 100 mil habitantes. Por otra parte, la frecuencia reportada (por 100 mil habitantes) en países latinoamericanos es de 22 en Guatemala (Orellana, 2001), 25 en Colombia (Alvarado, 2001) y 40 en Cuba (Mills, 1999), aunque estos datos podrían subestimar la verdadera prevalencia (Alarcón, 2004; Uribe, 2003; Alarcón-Segovia, 2007; Dubois, 2001), como lo sugiere la mayor ocurrencia documentada entre hispanos de los Estados Unidos de Norteamérica (Pons, 2004), incluyendo Puerto Rico con 213 por 100 mil personas (Vidal, 1999).

La prevalencia en México se desconoce, pero se piensa que es similar a la documentada en Norteamérica; Sauza estimó una frecuencia cercana a los 50 por 100 mil habitantes (Sauza, 2005).

La incidencia anual reportada por 100 mil habitantes varía considerablemente entre países: Suiza con 61 (Nived, 1982), Inglaterra con 33 (Hopkins, 1993), Islandia con 76 (Gudmundsoon, 1990) y en Japón con 566 (Iseki, 1992). Estimaciones más finas incluyen la extraída de la base de datos del proyecto epidemiológico de residentes de Rochester, Minnesota, con 7.3 para 1992 (Urakamoto, 1999).

Como otras enfermedades autoinmunes, el LES afecta principalmente a mujeres en edad fértil con una razón entre mujeres y hombres de 10:1. (Dubois, 2001); de hecho, se estima que 1 de mil mujeres jóvenes cursa con LES (Mills, 1994).

3.3.- ETIOLOGÍA

Las enfermedades autoinmunes se han asociado a una serie de condiciones ambientales; así como una relación con un complejo trimolecular en el que participa un (1) antígeno aún desconocido que se expresa unido al (2) antígeno leucocitario humano (HLA) en las células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendrítica, células B), que se unen a moléculas expresadas en las células T como (3) receptores de células T (RcT, CD3, etc), esto ocasiona lo que se denomina mimetismo molecular(Moreno , 2003) parecen actuar en forma epistática sobre algunos factores genéticos. Varios factores han sido vistos como condicionantes del estrés celular que se asocia a la aparición del LES, entre ellos, radiaciones ultravioletas, hormonas, virus y algunos fármacos (Alarcón, 2002; Alarcón, 1999; Bastian, 2002; Hyldebrand, 2004).

Factores genéticos: Los factores genéticos juegan también un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. Así lo sugiere la agregación familiar (mayor de 5%), la concordancia entre gemelos monocigotos (3-10 veces mayor que entre dicigotos), y el riesgo de la enfermedad entre los familiares en primer grado (8-9 veces mayor que en la población general) (Jonsen, 2003; Jonsson, 1994; Kyttaris, 2003; Liu, 2001).

Los estudios genéticos han identificado cerca de 60 áreas cromosómicas o loci de susceptibilidad para el lupus los loci con asociación significativa son 1q22-23, 1q41, 2q37, 4p16, 6p21-11, 16q13 y 17p13 (Kelly JA, Moser KL, et al; 2002). La asociación más importante es con alelos nulos de componentes C2 y C4 del sistema del complemento, seguidos de ciertos alelos clase II del complejo principal de histocompatibilidad humano (HLA), además de polimorfismos de los genes del receptor Fc gamma RIIA, la molécula reguladora PD-1, y algunos genes de citocinas, aunque en estas últimas la asociación es débil (Enyedy, 2001). Otras asociaciones, como la del Sle-1, se conocen por estudios genéticos, pero se desconoce el gen específico afectado (Calvo-Allen, 2003; Mevorach, 2003).

3.4.- CUADRO CLÍNICO

Las manifestaciones clínicas del LES son muy variables y todavía no existe una explicación clara para esto (Pons, 2004; Urakamoto, 1999; Alarcón-Segovia D, 2007). Los signos más frecuentes incluyen fiebre, pérdida de peso, alopecia, fotosensibilidad, artritis, pleuritis, exantema y anemia, pero también pueden afectarse los sistemas esquelético, cutáneo, vascular, renal, nervioso, hematológico, respiratorio, cardiológico y gastrointestinal. (Pons, 2004; Costenbader, 2002; Namjou, 2002; Kawasaki, 2002; Dubois, 2002).

3.5.- PRONÓSTICO

El LES tiene un curso y pronóstico muy variable. Los principales factores relacionados con un mal pronóstico incluyen el inicio de la enfermedad a una edad temprana (Alarcón, 1999; Mills, 2004; O' Sullivan, 2002), el sexo masculino (Pons B Battagiotti; 2007) y la presencia de nefritis o hipertensión sistólica (Bastian, 2002; Croker, 2005; Cooper, 2002). Otros factores incluyen la etnicidad (mas grave en negros y en mestizos hispánicos) (Katie, 2009), el tiempo en el que se tarde en realizar el diagnóstico de la enfermedad, la duración de la misma, la respuesta del paciente al tratamiento, y el inicio de la medicación adecuada.

Antes de 1950 los enfermos con LES morían antes de cumplir 5 años de evolución (Merrel, 2005). Sin embargo, desde entonces ha ido aumentando considerablemente la sobrevivencia debido a la existencia de mejores opciones terapéuticas y a la fecha más del 90% sobrepasan los 10 años (Bernatzky, 2006; Uramoto 2006). De hecho, hace 2 décadas, la sobrevivencia a 10 años con tratamiento alcanzaba el 90% a partir del momento del diagnóstico, mientras que en la fecha actual esta

alcanza el 98% con el uso de esteroides, inmunosupresores y anticuerpos monoclonales (Mc Cune, 1998; Bastian, 2002).

Un estudio realizado en México documentó una supervivencia de 96% y 92% a 5 y 10 años de evolución, respectivamente, a partir del primer síntoma (Drenkard, 1994).

El estudio GLADEL, llevado a cabo en los Estados Unidos de Norteamérica, en el que también tomaron parte pacientes latinoamericanos (Pons 2002), encontró una supervivencia a 5 años del 95%, después del inicio de la enfermedad. Esta supervivencia es similar a la que se alcanza en centros hospitalarios de Norteamérica, Europa y Asia (Pistiner, 1991; Abu-Shakra M, 1995; Stahl-Hallengren, 2000).

El aumento en la esperanza de vida a partir de la segunda mitad del siglo XX, es debido a diversas causas, entre las que se encuentran: que se sabe más sobre el LES (se aplican más tempranamente los criterios diagnósticos), se utiliza cada vez con más frecuencia por los médicos el conocimiento sobre las características de presentación de la enfermedad y por ende determinar si el paciente cursa con una forma leve, moderada o severa ; y de esta manera tomar la decisión más acertada de indicar el tratamiento idóneo de manera individual.

El recurso de mejores medicamentos en instituciones de salud pública y privada.

La detección temprana de condiciones mórbidas concomitantes como: infecciones, dislipidemias, estados de hipercoagulabilidad, detección de pacientes que requieren diálisis, hemodiálisis y trasplante renal. (Drenkard, 1994)

En la mayoría de los estudios que se han analizado a la fecha donde se determina el índice SLICC/ACR ID, han sido en pacientes captados de la

Consulta Externa de Hospitales que tienen servicio de Reumatología, en los cuales han sido tratados y seguidos a lo largo del tiempo de su enfermedad por especialistas capacitados para ello; quizá esta sea la causa de que se encuentren puntajes bajos de SLICC siendo el promedio 2.1.

Esto a pesar de haberse realizado estudios de cohortes donde participan grupos de diversos países del mundo, el sesgo de selección sigue siendo el mismo (en Hospitales que tienen servicios de Reumatología y/o Inmunología) como ejemplo el grupo GLADEL Multinacional Latino Americano prospectivo, donde se analizaron 1,214 pacientes con LES, aportados por: Argentina, Brasil, Colombia, Cuba, Chile, Guatemala, México, Perú y Venezuela (Pons 2004).

3.6.- INDICE DE DAÑO SLICC/ACR

Para evaluar el daño acumulado causado por el LES se emplea el puntaje del índice SLICC. Este índice de daño SLICC/ACR (Colaboración Internacional Clínica de Lupus Sistémico del Colegio Americano de Reumatología), en adelante IDS, consta de 24 ítems (Hepbrun, 2004), y mide el daño acumulado que ha ocurrido desde el inicio del LES, resultando tanto del proceso patológico como de sus secuelas.

El daño es definido como un cambio irreversible en un órgano o sistema que ha estado presente por al menos 6 meses. Las definiciones y determinantes del índice se basan principalmente en criterios clínicos o en exámenes de laboratorio y gabinete ampliamente disponibles, por lo que este puntaje puede ser evaluado en instituciones convencionales.

El IDS documenta el daño ocurrido a 12 órganos o sistemas corporales desde el inicio del LES. Cualquier afección puede ser la consecuencia de la actividad del LES, de la terapia, de un proceso comórbido, o de cualquier combinación entre estas. El IDS ha mostrado ser un índice válido, confiable y reproducible; la variabilidad interobservador en estudios con diferentes médicos y en varios países es poca. (Dayal 2002, Gladman 1997).

El daño puede presentarse tanto en pacientes con enfermedad activa como en los que se encuentran en remisión, ya que la evolución puede ser silenciosa, principalmente en daño ocular (cataratas), cardiovascular (hipertensión arterial sistémica), esquelético (osteoporosis con fracturas vertebrales), (Doria, 2006).

3.7.- EFECTO DE LA MORBILIDAD Y LA MORTALIDAD EN EL LES

Los procesos infecciosos constituyen la principal causa de muerte, seguidos de complicaciones por actividad (medidos por SLEDAI), especialmente a nivel renal, pero también pulmonar, cardiaca, entre otros (Barr, 1992, Pistiner, 1991, Moser, 2004, Gladman 2003).

La principal característica inmunológica del LES es la hiperactividad de los linfocitos B con producción de múltiples autoanticuerpos, la cual resulta de interacciones complejas entre factores genéticos, hormonales y ambientales (Dubois, 2001, Alarcón-Segovia, 2007). Sin embargo, el antígeno que produce dicha hiperactividad no es bien conocido (Dubois, 2001, Bujan, 2003, Mevorach, 2003). Aparentemente diversos defectos en genes que codifican proteínas que regulan la activación celular o que son necesarias para el desarrollo de linfocitos T reguladores podrían ser responsables del origen de la autoinmunidad en el LES (Hochberg, 1997, Takeuchi, 2003, Lee, 2003, Morel, 2003).

Los pacientes con LES se caracterizan por desarrollar una gran variedad de autoanticuerpos, la mayoría dirigidos contra moléculas intracelulares, tanto nucleares como citoplasmáticas. Los autoanticuerpos más característicos son los anti-DNA de doble cadena o nativo (DNAn), que son los que más se han asociado al daño tisular, especialmente a la nefropatía lúpica (Andrade, 2000, Yang, 2004, Nambiar, 2001, Queiroz, 2001, Swaak, 2001). De hecho, en las lesiones glomerulares de pacientes con nefropatía lúpica activa, se han encontrado anticuerpos anti-DNAn con anticuerpos anti-histona y anti-nucleosoma depositados en la membrana basal glomerular (Dubois, 2001, Theofilopoulos A, 2001, Formica, 2003, Drenkard, 1994).

Algunos autores han observado que alteraciones en genes reguladores de la actividad celular podrían resultar en manifestaciones clínicas características del LES (Vyse and Todd, 1996; Gaffney *et al*, 1998)

3.8.- DAÑO TISULAR OCASIONADO POR LA FORMACIÓN DE AUTOANTICUERPOS, LA ACTIVACIÓN DE EL COMPLEMENTO Y ACTIVACIÓN DE OTROS SISTEMAS PROINFLAMATORIOS.

Las proteínas del complemento activadas provocan daño directo en los tejidos afectados, además de que algunas de ellas son quimiotácticas para leucocitos polimorfonucleares, que acuden al sitio de activación del complemento, fagocitan los complejos inmunes, regurgitan su contenido lisosómico y radicales libres, amplificando el daño local (Hildebrand, 2004, Khoa, 2003, Crow, 2003, Reefman, 2003). El daño se amplifica aún más al liberarse diversos mediadores inflamatorios, inducidos por proteínas intracelulares, como la interleucina (IL)-1, el HGMB y algunas proteínas de choque térmico, como HSP70, que se unen a sus receptores o a receptores tipo toll (TLR), como la HSP70, induciendo liberación por fagocitos mononucleares locales la síntesis y secreción de factor de necrosis tumoral (TNF), amplificando el daño tisular (Queiroz, 2001, Pineau, 2007, Sullivan, 2008)

La misma cascada de eventos fisiopatológicos es responsable de las manifestaciones en otros órganos o sistemas, en los que la lesión predominante es la vasculitis en vasos de calibre pequeño, generalmente vénulas, como la vasculitis leucocitoclástica en la piel y otros epitelios (Calvo, 2003, Kelleher, 2004, Koskenmies, 2004, Yang, 2004). Una excepción a esto parecen ser las lesiones que afectan al sistema nervioso central y al pulmón, en donde la vasculitis es la excepción y el sustrato patológico es esencialmente desconocido (Mevorach, 2003, Swaak, 2001, Hernandez-Cruz, 2001).

Otros autoanticuerpos contra proteínas intracelulares en el LES, incluyen anti-ribonucleoproteínas, como anti-Sm y antiRNP nuclear; anti-RNA pequeños citoplásmicos, como anti-Ro/SSA y anti La/SSB, anticuerpos contra el aparato mitótico, como los anticuerpos dirigidos contra el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA); anticuerpos contra antígenos nucleolares, contra ribosomas, anti-Ku70, etc.. (Kotzin, 1996). De los autoanticuerpos mencionados, los anti-Sm son los más exclusivos del LES, ya que no se presentan en otras patologías, aunque son poco frecuentes. Así, cuando están presentes, en presencia de un cuadro clínico compatible, son prácticamente diagnósticos, pero no puede dependerse de ellos para el diagnóstico de certeza en casos dudosos (Mevorach, 2003, Nath, 2004, Kalsi, 1999, Shmerling, 2003, Priori, 2003).

El único otro grupo de anticuerpos dirigido contra moléculas intracelulares con posible implicación patogénica en el LES, es el grupo de anticuerpos anti-Ro/SSA, que está presente en el subgrupo del LES conocido como lupus cutáneo subagudo (Calvo, 2003, Dorner2001, Segasothy, 2001, Ahmed, 2001, Magnusson, 2001), así como en algunos pacientes con síndrome de Sjogren primario (Hepbrun, 2004). Los anticuerpos anti-Ro/SSA transferidos por vía placentaria producen en el recién nacido (y en el feto) el cuadro conocido como lupus neonatal, el cual se caracteriza por lesiones cutáneas que son transitorias mientras persistan los anticuerpos maternos en la circulación (Kelleher, 2004) . Sin embargo, algunos bebés con lupus neonatal presentan bloqueo cardiaco congénito, el cual es permanente; la patogenia del daño al tejido de conducción en estos pacientes es también desconocida (Vila, 1999, Pineau, 2007, Sullivan, 2008, Nichol, 2004).

Otros anticuerpos dirigidos contra moléculas intracelulares son marcadores de la enfermedad, pero aparentemente no son patogénicos,

su ocurrencia es variable y se ha sugerido que algunos de ellos podrían ser marcadores de subgrupos clínicos y de formas graves del padecimiento, aunque es poco probable que haya una relación causa-efecto en ello (Brooks,2002,Sullivan,2008,Nichol,2004,Katie,2009).

En la práctica clínica el diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos antinucleares (ANA) en suero, que ocurren en aproximadamente 85% de los pacientes con LES (Brooks, 2002, Priori, 2003, Kalsi, 1999, Shmerling, 2003). Sin embargo, la sensibilidad de esta prueba es limitada ya que también se producen en otras enfermedades del tejido conjuntivo (Dubois, 2001, Koskenmies, 2003, Kelleher, 2004, Yang, 2004, Katie, 2009,). Del mismo modo, su ausencia no descarta el diagnóstico de LES, ya que algunos ANA sólo se detectan con líneas celulares (en especial la línea tumoral HEp2) como sustrato para inmunofluorescencia, o bien muchos laboratorios clínicos no cuentan con toda la gama de antígenos nucleares o citoplásmicos requeridos para detectar algunos autoanticuerpos (Kimberly, 2001; Talken *et al*, 2001).

3.9.- DAÑO OCASIONADO POR ACTIVACION DE LINFOCITOS T EN LES

Aunque el daño tisular en el LES es mediado predominantemente por la respuesta autoinmune humoral y se ha asumido que los linfocitos T no tienen un papel directo en el daño tisular, evidencias indirectas sugieren fuertemente la participación de los linfocitos T colaboradores en la activación de los linfocitos B productores de auto anticuerpos, principalmente cuando son de la clase IgG, ya que el cambio de isotipo a IgG depende de la participación de linfocitos T colaboradores (Kotzin, 1996; Abbas and Lichtman, 2003). Así, se ha demostrado en modelos animales que la administración de anticuerpos anti-CD4 o de moléculas como CTLA-4 soluble, que interfieren con la interacción de linfocitos B-T, disminuyen la severidad de la enfermedad. Además, otros estudios más recientes sugieren que el daño intersticial en pacientes con la forma más grave de nefropatía lúpica (la glomerulonefritis proliferativa difusa tipo IV) es mediado por linfocitos T efectores infiltrantes (Thompson and Allison, 1997; Lee *et al*, 1998, Kattie, 2009).

Otra participación de los linfocitos T es en la producción y liberación de interleucina, que amplifican la respuesta autoinmune (IL-2,IL-4,5,6),actuando sobre los linfocitos B que al recibir el estímulo, tanto por contacto, con receptor de célulasT(TcR),HLAII(DP,DQ,DR) y activación por interleucinas antes descritas, al recibir el estímulo ,existe una diferenciación ha células plasmáticas, para posteriormente producir autoanticuerpos contra el antígeno que fue el inicio de la respuesta inmune (Nambiar,2001,Queiroz,2001,Nath,2008,Suarez,2009)

Aquí podemos analizar que la diferencia en reconocer lo propio y lo que no es propio (antígeno), es la respuesta por mecanismos extremadamente complejos que

se activa a través de moléculas de reconocimiento específicas que están presentes en la superficie de todas las células eucarióticas, principalmente en las células presentadoras de antígenos profesionales y no profesionales (macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, epiteliales, células NK, leucocitos polimorfonucleares y otros mediadores que incluyen complemento y citocinas

La mayoría de los signos clínicos del LES reflejan la lesión tisular producida por el daño vascular mediado por complejos inmunes, mientras que otros se deben al efecto directo de los auto anticuerpos contra moléculas de superficie celular o sobre ciertos componentes séricos (Thompson and Allison, 1997; Lee *et al*, 1998). La especificidad antigénica de los anticuerpos, los complejos inmunes que éstos forman con el complemento, el tamaño y función de dichos complejos y los mecanismos del paciente para eliminarlos, parecen ser los factores que determinan la magnitud del daño a los tejidos (Thompson and Allison, 1997).

3.10.- GENERALIDADES DE EL ANTÍGENO LEUCOCITARIO HUMANO (HLA)

Dentro de las enfermedades autoinmunes generalizadas, el prototipo es precisamente el LES (Watson, 2004, Mills, 2006, Altshuler, 2008).

Estas enfermedades tan complejas, involucran factores genéticos ambientales, étnicos, en todas ellas el problema fundamental es una reactividad inmune inapropiada contra auto antígenos., también llamado "el rompimiento de la tolerancia". Cuando la reacción autoinmune a antígenos es encontrada únicamente a un cierto tejido u órgano, ocasiona un proceso patológico localizado (Enfermedad de Graves, Tiroiditis de Hashimoto, Diabetes tipoI, Esclerosis Múltiple), En contraste el Sjogren, Artritis Reumatoide y LES son ejemplo de enfermedades no órgano-específicas (Dubois, 2001, Alarcon-Segovia, 2007).

Por alguna razón que no es muy clara, las enfermedades autoinmunes han ido en

aumento (Van, 2001). Son frecuentemente la tercera causa de patología en el mundo Industrial, después de las neoplasias y daño cardiovascular.

Aproximadamente de 3 a 5 personas en 100 sufren desordenes de reconocimiento autoinmune (Jacobson, 1997, Cooper, 2003, Donelly, 2008, Hap Map 2003)

Es común que pacientes que padecen de una enfermedad autoinmune pueden presentar otra enfermedad, autoinmune y miembros de la misma familia sufren de diferentes enfermedades autoinmunes, esto puede ser ocasionado por diferentes motivos: Genes compartidos o involucro de las vías celulares comunes.(Tsao,2003,Dubois,2001)Esto puede ser explicado por genes que se encuentran en locus del HLA, aunque genes que se encuentran fuera de este complejo, en otros loci; también pueden predisponer a esto

Más de 300 genes aparte de los que se encuentran en el HLA pueden predisponer a alteraciones autoinmunes (Plenge, 2007).

El sistema genético más importante en la regulación de las reacciones inmunes es el Antígeno Leucocitario Humano (HLA por sus siglas en inglés), también llamado Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH).

“Histocompatibilidad “traduce en reconocimiento de los propios tejidos por tanto su función es participar en la tolerancia, rechazo de los tejidos o agentes con los que entra en contacto el organismo (Textbook of Rheumatology, Kelly, 1988)

Se trata de un sistema de genes ligados, altamente polimórfico, que se han conservado filogenéticamente y se ha podido demostrar en todos los vertebrados estudiados (Paris, 1989, Dubois, 2001, Schur, 1982, Hartung, 1989, Katie, 2007). El principal papel del HLA es el control de la expresión de moléculas en la superficie celular que actúan como marcadores de lo propio en el desarrollo de la respuesta inmune. Su polimorfismo, así como su papel en la respuesta inmune han hecho del HLA sea el sistema genético mejor conocido y su estudio se ha aplicado a diferentes áreas como la inmunobiología, los trasplantes de órganos, la genética de poblaciones y los estudios de paternidad .

El HLA, es una región que ocupa el 0.1% del genoma en humanos, se ubica en el brazo corto el cromosoma número 6 (p21.31) y corresponde a cerca de 3 cM (centimorgans) o el equivalente a 3.6 millones pares de bases (pb) , conteniendo por lo menos 50 genes, 224 loci identificados(Paris,1989).Es la región que tiene más genes del genoma humano(Dubois,2001)

Sus productos se expresan como caracteres autosómicos codominantes y se heredan en forma mendeliana (Marsh, 2005, Alarcón-Segovia, 2007, Dubois 2001,). Las regiones, genes y productos del HLA están definidos como clase I(telomerica), ciase II(centromerica) o clase III(telomerica)

de acuerdo con las propiedades de sus productos génicos, los cuales difieren en su estructura química, su distribución tisular, su función y la forma de detectarlos (Marsh, 2005, Sullivan, 2008, Alarcon-Segovia, 2007, Gungor, 2003, Dubois, 2001).

El HLA-I, II y III, comparten ciertas características importantes (su polimorfismo, presentan péptidos a los linfocitos T; su estructura es peculiar para cada uno de los tres tipos, dependiendo de su función) (Systemic Lupus Erythematosus, Dubois, 2001, Sullivan, 2008)

La nomenclatura del sistema HLA está determinada por el Comité de Nomenclatura de los Talleres Internacionales de Histocompatibilidad (Brooks 2002). La región recibe el nombre de los genes y los antígenos codificados dentro de esta región (p. ej. A, B, C, DR, DQ, DP, etc.), quedando como HLA-I (A, B, HLA-C, E, F, G, H, J), cada persona puede expresar al menos 3 diferentes proteínas diferentes clase I, sintetizadas por los alelos de las regiones HLA-A, B y C. en combinación con una proteína no polimórfica (β_2 microglobulina). (Moreno. 2003, Roitt, 2003)

El gen para la síntesis de la β_2 microglobulina es localizado en el cromosoma 15. Las moléculas HLA-A, B y C, son expresadas en la superficie de las membranas celulares de todas las células nucleadas y se identifican en varias poblaciones, las cuales a medida que pasa el tiempo se encuentra con mas frecuencias en diversas partes del mundo (Dubois, 2002, Tratado de Reumatología, 2007, Sullivan, 2008). Los genes adicionales de la región HLA-I (E, F, G, H y J), se sabe hasta la actualidad que funcionan en la inmunidad inata, mediando el reconocimiento de antígenos por las células NK (natural killer)

HLA-II (HLA-DR HLA-DQ, HLA-DP, DN, DO, Dw, proteasas grandes multifuncionales conocidas por sus siglas (LMP-2) y 7 genes cuya función es codificar subunidades de proteosomas, las cuales son necesarias para

generar fragmentos de péptidos de proteínas endógenas para unir moléculas de clase I.(Dubois,2002)

La molécula DM, actúa como acompañante y cataliza péptidos antigénicos que se unen a DR, DP, DQ. La molécula DO sirve como un regulador negativo de DM. También en esa región (HLA-II), están presentes genes que codifican para la formación de moléculas denominadas transportadoras de antígenos procesados, conocidas por sus siglas (TAP)-1 y 2 genes (que codifican la unión de TAP heterodimerico para transportar péptidos del citosol a el retículo endoplásmico, también se encuentran en la región II (Roitt, 2003, Tratado Hispanoamericano de Reumatología, 2003, Dubois, 2002, Brooks 2002).

Actualmente se conocen 239 alelos de D_{RB1} , 20 para $DQ\alpha$, 35 para $DQ\beta$, 12 $DP\alpha$ y 80 alelos $DP\beta$. (Roitt, 2003, Tratado Hispanoamericano de Reumatología, 2003, Dubois, 2002, Brooks 2002). Una persona normalmente utiliza los alelos DR,DP,DQ para presentar antígenos a células T CD4 que son reconocidos por los receptores de células T; de esta forma se inicia la respuesta inmune específica (Yang,2004)

La denominación de todos los genes y productos clase II está precedida por la letra D seguida por la letra N, O, P, Q o R correspondiente a la subregión. Los genes de las cadenas polipeptídicas α o β se identifican con estas letras griegas, seguidas por un número cuando hay más de un gen para la cadena α o β en la subregión; ejemplo HLA-DQA1 β 1. La letra "W" (Workshops) entre la denominación del locus y el número que indica el alelo es una identificación provisional que se utiliza cuando la especificidad no ha sido totalmente definida y desaparece cuando se logra la identificación definitiva aceptada por el Comité de Nomenclatura de los Talleres Internacionales de Histocompatibilidad(Plenge,2007,Libro Latinoamericano de Reumatologia,2007)

Para cada una de las especificidades individuales correspondientes a cada locus se escribe un número después de la letra que identifica el locus (p. ej. HLA-A1). Las especificidades de los loci HLA-A y HLA-B definidas serológicamente, se numeran en conjunto en una secuencia que no se repite (Brooks 2002).

En HLA-II, es poco lo que se conoce de los loci HLA-DN, DO Y Dw, pero los demás genes y productos han sido estudiados en mayor detalle (DP, DQ, DR). Los antígenos clase II tienen una distribución tisular más limitada pues sólo se expresan en los linfocitos B, los monocitos/macrófagos, las células de la serie dendrítica reticular, los linfocitos T activados y algunas células epiteliales; sin embargo, su expresión puede ser inducida en otros tipos de células por ciertas sustancias como el interferón gama. Las moléculas clase II modulan el reconocimiento de los antígenos extraños por parte de los linfocitos CD4+ cuando son presentados a éstos en la membrana de las células presentadoras de antígeno (Katie, 2009, Plenge, 2007)

Están formados por un dímero compuesto por un polipéptido α de 34 Kd asociado en forma no covalente con un polipéptido β de 28 Kd, ambos están presentes en la membrana celular y poseen un pequeño dominio intracitoplasmático (Katie, 2009).

Normalmente se encuentran las cadenas β asociadas a las α de la familia correspondiente: DR, DQ y DP. Las cadenas α y β poseen diferente secuencia de aminoácidos (aa) pero conservan características estructurales semejantes pues cada una tiene dos dominios de aproximadamente 90 aa, una región intermembrana y otra intracitoplasmática (Barret, 2008).

Los HLA-DR están formados por un gen no polimórfico cuyo producto se asocia en la membrana con uno de los genes polimórficos HLA-DR B. La asociación con los alelos β -1 da origen a los antígenos HLA-DR1 al HLA-

DRW18. Los HLA-DQ incluyen cuatro genes: DQA-1, DOβ-1, DOα-2y DO, los HLA-DP comprenden los genes para DPA-1. DPB-1 y los pseudo genes DP α-1 y DPβ-2, TAO1, TAP2-LMP2 y-LMP7. Los genes en si pueden ser Identificados, como secuencias únicas de ADN, por análisis de fragmentos de restricción altamente polimórficos (Barret, 2008).

La nomenclatura de los HLA tanto tipo I, II, III frecuentemente se actualiza, siendo la ultima en un "Workshops" en 2000 (Marsh, 2001).

En HLAII-DQA1 son los alelos:

*0101,*0102,*0103,*0104,*0105,*0106,*0201,*0301,*0302,*0303,*0304,*0401,

*0402,*0501,*05011,*05012,*0502,**0503,*0504,*0505 y *6011. En el locus HLADB1 son:

*0201,*0301,*0302,*0303,*0304,*0401,*0402,*0501,*0502,*0602,*0603,*0604,

*0605,*0606.*0607 y *0608

La región HLA-III, contienen genes que codifican proteínas del complemento C4 (genes C4A y C4B), factor B, factor de necrosis tumoral α (FNTα), linfoxinas (genes LTA y LTB) y proteínas de choque térmico (HSP-70). Cerca de los dos genes de C4, se encuentran genes que codifican la 21-hidroxilasa, una enzima cuya función es útil para la síntesis de esteroides. C4A y C4B son los genes mas polimórficos, incluyendo al menos 14 alelos para C4A y 17 alelos para C4B (Yang, 2004, Roitt, 2003)

3.11.- HLA y LES

En el Lupus Eritematoso Sistémico la relación genética más importante es la que se ha visto con los haplotipos y genotipos del HLAII (Kelly 2002) .

Los alelos HLA-II son los que más se asocian con el lupus; se ha reportado un RR de 3 para LES en habitantes de Europa del norte para HLA-DR2 (DRB1-1502) y HLA-DR3 (DRB-0301) (Paissansisup, 2001). También hay asociación con el HLA-DQ (DQB1-0501, 0503, 0601) (Azizah, 2001). En general, la asociación de LES con los distintos alelos de HLA-DRB1 (1, 2, 3, 13, 14, 15, 16) depende del grupo étnico) es con el tipo de anticuerpos antinucleares (ANA) presentes, por lo que también deben contribuir a definir el inicio y daño de la enfermedad. Al parecer, las características clínicas e inmunológicas se regulan por separado en diferentes loci y los factores promotores de la enfermedad pueden no ser los mismos que los que influyen en su severidad o progresión.

Como en otras enfermedades complejas con factores de susceptibilidad multigénicos, algunas dificultades para identificar con precisión los genes y loci relacionados con la enfermedad son que la predisposición en múltiples sitios parece tener un efecto aditivo y que los genes de susceptibilidad pueden interactuar con los genes de protección Por otra parte, las asociaciones varían de acuerdo con la etnia, lo que sugiere que el componente genético asociado será diferente de acuerdo al grupo étnico en estudio

Hay un sin número de estudios que relacionan con HLA-II específicos con enfermedades autoinmunes como se expresan en la siguiente tabla:

EFERMEDAD	ALELO HLA	RIESGO RELATIVO
Enfermedad Hashimoto	DR11	3,2
Mixedema Primario	DR17(*3)	5,7
Tirotoxicosis	DR17(*3)	3,7
Diabetes insulinodependiente	DQ8/ DQ2/8/ DQ6	14 20 0,2
Enfermedad de Addison	DR17(*3)	6,3
Síndrome de Goodpasteur	*DR2	13,1
Artritis Reumatoide	*DR4	5,8
Artritis Reumatoide Juvenil	*DR8	8,1
Síndrome Sjögren	DR17(*3)	9,7
Hepatitis crónica activa	DR17(*3)	13,9
Esclerosis Múltiple	*DR2,DQ6	12
Narcolepsia	*DQ6	38
Dermatitis Herpetiforme	DR17(*3)	56,4
Enfermedad Celiaca	DQ2	250

En el Lupus Eritematoso Sistémico la relación genética más importante es la que se ha visto con los haplotipos y genotipos del HLAI (Kelly 2002).

Los genes del HLA I, II y III son heredados en forma codominante.

Durante la gametogénesis o de ligamiento existe un desequilibrio, esto es característico del HLA y es la combinación preferencial de antígenos de los diversos loci, en un mismo cromosoma, habiendo una frecuencia que es observada en forma diferente de lo esperado al azar (Desequilibrio de la "Ley de Hardy-Weinberg") (Levy, 2007)

De alguna manera puede ser posible que los haplotipos del HLAI en desequilibrio observen ventajas, si fueron seleccionados a través de la evolución (Lee, 2007). Aunque puede ser lo contrario e inducir una respuesta inmune humoral o celular contra antígenos extracelulares y ellos, ser marcadores de susceptibilidad y ocasionar Enfermedades Autoinmunes como el LES (Plenge, 2007)

3.12.- DESEQUILIBRIO DE ENLACE

Existe mayor frecuencia de enfermedades asociadas al HLA-D específico y cada vez se estima que van a descubrirse mayores asociaciones a medida que se ha descubierto mayor complejidad en esta reacción ya que es el más polimórfico (Gurdon, 1999).

El desequilibrio de enlace o de unión, se ocasiona cuando los genes en estrecha unión en un cromosoma permanecen unidos o asociados en vez de sufrir aleatorización genética en una

población, por lo que la frecuencia de aparición en conjunto de un par de alelos será mayor que el producto de las frecuencias de cada uno de los genes. En otras palabras, esto ocasiona que la selección natural favorezca un haplotipo particular o que no haya transcurrido un tiempo suficiente desde la aparición de alelos ubicados muy cerca para permitir una distribución aleatoria en la población en general (Fundamentos de Inmunología, Roit, 2003)

De cualquier manera, una asociación significativa entre un proceso de enfermedad y determinada especificidad de HLA no significa que se haya encontrado el gen de susceptibilidad para la enfermedad, porque quizá se podría encontrar una relación más estrecha y significativa con otro gen HLA en desequilibrio de enlace con el primero

Los alelos HLA-II son los que más se asocian con el lupus; se ha reportado un RR de 3 para LES en habitantes de Europa del norte para HLA-DR2 (DRB1-1502) y HLA-DR3 (DRB-0301) (Paissansisup, 2001). También hay asociación con el HLA-DQ (DQB1-0501, 0503, 0601)

(Azizah, 2001). En general, la asociación de LES con los distintos alelos de HLA-DRB1 (1, 2, 3, 13, 14, 15, 16) depende del grupo étnico) es con el tipo de anticuerpos antinucleares (ANA) presentes, por lo que también deben contribuir a definir el inicio y daño de la enfermedad. Al parecer, las características clínicas e inmunológicas se regulan por separado en diferentes loci y los factores promotores de la enfermedad pueden no ser los mismos que los que influyen en su severidad o progresión (Purrello, 1984).

Como en otras enfermedades complejas con factores de susceptibilidad multigénicos, algunas dificultades para identificar con precisión los genes y loci relacionados con la enfermedad son que la predisposición en múltiples sitios parece tener un efecto aditivo y que los genes de susceptibilidad pueden interactuar con los genes de protección. Por otra parte, las asociaciones varían de acuerdo con la etnia, lo que sugiere que el componente genético asociado

será diferente de acuerdo al grupo étnico en estudio (Rioux, 2001) .

3.13.- ENFERMEDADES GENÉTICAS COMO EL LES

Las alteraciones inherentes a los humanos, llamadas genéticas, se clasifican en 4 categorías, basándonos en su complejidad genética:

1.- Monogénicas: Son causadas por un cambio en un gen único. La e

nfermedad es autosómica o ligada al cromosoma X, localizado sobre un cromosoma, puede ser recesiva o dominante (expresada en una persona quien tiene únicamente una copia del alelo, causante de la enfermedad, siendo heterocigoto) ejemplo de esto la Neurofibromatosis. Recesiva, en donde tiene que tener en las dos copias alélicas, el gen para expresar la enfermedad (homocigoto). Ejemplo de esta alteración es la Fibrosis Quística (Ng PC, 2008, Bhangale, 2005, Hinds, 2006)

2.- Enfermedad Mitocondrial: Es causada por genes que se localizan en el genoma mitocondrial. Es solamente transmitido por la madre. Ejemplo de ello es la Neuropatía óptica de Leber. (Altshuler, 2008)

3.- Enfermedades complejas: No son dependientes únicamente del patrón Mendeliano. Involucran factores genéticos, ambientales, factores de riesgo por estilo de vida. La proporción de el peso de cada uno de los predisponentes varía y

Hasta la fecha no son del todo aun descifrados con exactitud (Purrello, 1984)

La concordancia con la enfermedad y la participación de los alelos de manera relativa puede ser usada para separar factores genéticos y ambientales. analizado en gemelos homocigotos que se supone, que están expuestos a los mismos factores de riesgo. Hay mayor predisposición a expresar la enfermedad cuando son gemelos

homocigóticos a que si son dicigotos. Por lo tanto, se evidencia la predisposición genética.

Ejemplo de las enfermedades genéticas complejas son todas las enfermedades autoinmunes (en este caso la evidencia de predisposición genética de Lupus) (Kelly, 1988, Dubois, 2001, Tratado de Enfermedades Reumáticas, 2007, etc).

Durante los últimos años, se han identificado numerosas variantes que contribuyen a la manifestación de enfermedades complejas (Ng PC, 2008).

La genética moderna empezó con los trabajos de un monje Austriaco llamado Gregor Mendel a mediados del siglo 19 El encontró que los organismos heredan los genes siguiendo diversas leyes, qué posteriormente se le llamo "Leyes de Mendel". Las bases biológicas, permanecieron más o menos desconocidas hasta 1944, cuando fue descubierto que la información genética se encontraba contenida en el ADN. En los últimos años, la estructura y caracterización de la doble hélice y como contiene y trasmite la información por James Watson and Francis Crick (Watson, 1953) La secuencia del genoma humano fue leído en el 2003 y publicado, cuando el Consorcio de estudio de Secuenciación Internacional del Genoma Humano, anunció que había determinado en forma completa, dicho genoma. En Septiembre del 2007, después de 4 años la secuenciación del genoma fue publicado, reportando alrededor de 6 billones de bases, este fue el genoma de Craig Venter, presidente fundador del Celera Genomics (Levy, 2007).

Variación genética

Se demostró con el Proyecto del Genoma Humano que dos personas que no estén relacionadas, familiarmente tienen alrededor de 99% de los mismos nucleótidos (“Ley de Hardy Weinberg”)

La mayoría de las diferencias genéticas no tienen ningún efecto en los individuos, aunque estas pequeñas diferencias pueden explicar la susceptibilidad a diversas enfermedades y la respuesta al medio ambiente. El esfuerzo por encontrar y entender, estas diferencias genéticas, es importante para encontrar respuestas y posibles tratamientos de enfermedades autoinmunes que tienen que ver con la predisposición genética.

Debido al descubrimiento de la secuenciación del genoma completo y al desarrollo de técnicas de tipificación molecular se ha podido encontrar asociación con diversos polimorfismos para la expresión de diversas enfermedades (Levy, 2007)

El polimorfismo genético incluye Polimorfismo de nucleótido único (SNPs), inserción-delección, variaciones, repeticiones, copias polimórficas (“Desequilibrio de Unión”), (Nature, 2007, Gudlaug, 2009)

LEY DE HARDY WEINBERG

Recibe su nombre del matemático inglés Hardy y del físico alemán Weinberg, quienes ayudaron a la biología molecular utilizando su fórmula aplicada de forma muy simple, plasmándolo en un manuscrito en 1908 (Crow, 1999)

Es la más importante teoría en la genética de poblaciones, estableciendo que la composición genética de una población permanece en equilibrio,

siempre y cuando no actúe la selección natural ni algún factor externo o no se produzca alguna mutación.

Después de una generación de apareamiento al azar los genotipos mantendrán una frecuencia de un locus individual y se fijarán en un valor de equilibrio particular genético. Esto se puede representar como una función sencilla de las frecuencias alélicas en el locus.

Ejemplo:

Dos alelos A y a, siendo su frecuencia p y q respectivamente el PHW expresa que la frecuencia genotípica para el homocigoto dominante AA es p^2 , así como la del heterocigoto es $Aa = 2pq$, además la del homocigoto recesivo es $aa = q^2$

Esto es una población idealizada, pero normalmente no es así. De cualquier manera aun con experimentar ciertos cambios en la población (selección natural, migración o mutaciones), se puede guardar proporción del Principio de Hardy-Weinberg (PHW) y se puede utilizar la fórmula matemática

Puede haber una derivación probabilística del PHW en que los alelos de la siguiente generación para cualquier individuo es posible que de manera aleatoria sean independientes unos de otros. A considerar es igual al producto de las probabilidades de la fila y la columna

Dos alelos A y a con frecuencias en la población de p y q. Se pueden originar nuevos genotipos utilizando un cuadro llamado de Punnett.

La fracción en cada celda es igual al producto de las probabilidades de la fila y la columna

	AB	Ab	aB	ab
AB	$AABB$	$AABb$	$AaBb$	$AaBb$
Ab	$AABb$	$AAbb$	$AaBb$	$Aabb$
aB	$AaBB$	$AaBb$	$aaBB$	$aaBb$
ab	$AaBb$	$Aabb$	$aaBb$	$aabb$

Todas las posibles frecuencias genotípicas.

Las alteraciones de las suposiciones de la ley de Hardy-Weinberg, causan desviaciones de lo que se espera- Las alteraciones que podemos encontrar son:

Apareamiento aleatorio: La población tendrá las frecuencias genotípicas específicas (Proporciones de Hardy-Weinberg), esto es ocasionado después de una generación de apareamiento aleatorio dentro de la población

DESVIACION DEL EQUILIBRIO DE LA LEY DE HARDY-WEINBERG

Esta desviación origina la denomina proporción de la ley de "Hardy-Weinberg"

La proporción de la frecuencia de los genotipos pueden ser calculados por medio de pruebas de desviación que son estadísticamente significativas, (las pruebas utilizadas son: Prueba de χ^2 de Pearson's, prueba exacta de Fisher, χ^2 y más recientemente un método propuesto por Guo & Thompson llamado MCMC, para la prueba de desviación de HWP), (Guo, 2005). Las causas de las desviaciones del equilibrio ya fueron anteriormente mencionadas.

Por lo anterior, las frecuencias genotípicas y alélicas se obtuvieron por el método de contar c/u. Tomando en cuenta la proporción de Hardy-Weinberg las frecuencias en estas poblaciones, fueron comparadas mediante las pruebas exactas y χ^2 . En los genotipos de cada locus se comparan con las proporciones esperadas con pruebas similares

CAPITULO 4.- JUSTIFICACIÓN

Existe evidencia creciente para la relación entre diversos alelos del HLA-II y la ocurrencia de LES, sin embargo, a la fecha no se ha publicado ninguna asociación entre el genoma humano, medido a través de genotipos de HLA-II, y el daño causado por el LES, evaluado mediante el SLICC/ACR.

Aunque dicha asociación es difícil de documentar dado el alto polimorfismo genético de estos alelos en la población, y la relativamente baja variabilidad en los puntajes de SLICC/ACR, en parte producto de los avances terapéuticos en el tratamiento del LES, la identificación de genotipos de riesgo para daño por LES pudiera tener un alto valor diagnóstico y pronóstico de gran utilidad una vez que las pruebas de tamizaje genético estén al alcance de la práctica clínica.

De este modo, el objetivo de la presente tesis fue determinar la relación entre los alelos HLA-DRB1, DQA1 Y DQB1 en un grupo de pacientes con LES de la Ciudad de Chihuahua, México, y la severidad del daño causado por el LES evaluado mediante el puntaje de SLICC/ACR.

CAPÍTULO 5.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La presente tesis se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es la relación entre los alelos HLAII-DR B1, DQB1 y DQA1 y el puntaje del índice de daño SLICC/ACR en pacientes con LES?

CAPÍTULO 6.- OBJETIVOS

Principal

Determinar si existe relación entre los alelos HLAII-DR_{B1}/DQ_{A1-B1} y el índice de daño SLICC/ACR y en pacientes con lupus eritematoso sistémico.

Específicos

1. Comparar la frecuencia de los alelos HLAII-DR_{B1}/DQ_{A1-B1} entre el grupo de pacientes con LES y un grupo control de personas sin LES.
2. Determinar la frecuencia de haplotipos paterno y materno HLAII-DR_{B1}/DQ_{A1-B1} en el grupo de pacientes con LES.
3. Comparar el puntaje medio del índice de daño SLICC/ACR de pacientes con LES para alelos HLAII-DR_{B1}/DQ_{A1-B1} seleccionados.
4. Identificar haplotipos paternos/maternos y genotipos HLAII-DR_{B1}/DQ_{A1-B1} de riesgo y protectores para LES de acuerdo con el puntaje de daño SLICC/ACR.

CAPÍTULO 7.- HIPÓTESIS

La hipótesis general de trabajo:

H₀: Ningún haplotipos paterno/materno o genotipo HLAII-DR_{B1}/DQ_{A1-B1} se asocia con un mayor o menor puntaje en el índice de daño SLICC/ACR en pacientes con LES.

H₁: Algún haplotipos paterno/materno o genotipo HLAII-DR_{B1}/DQ_{A1-B1} se asocia con un mayor (riesgo) o menor (protección) puntaje en el índice de daño SLICC/ACR en pacientes con LES.

CAPÍTULO 8.- METODOLOGÍA

8.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO

Transversal analítico

8.2.- POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se incluyeron pacientes con LES que acudieron a la consulta externa reumatológica de la Dra. Natalia Santana Portillo (tesista) en el consultorio número 13 (11:00-14:00 hrs) del Hospital General Regional No. 1 del Instituto Mexicano del Seguro Social ubicado en la ciudad de Chihuahua, Chih., de enero a octubre e 2005. Los participantes fueron pacientes que asistieron a una cita de control periódica, lo que sucede habitualmente cada 2 meses.

Con el propósito de comparar la frecuencia de haplotipos/genotipos HLAII-DR_{B1}/DQ_{A1-B1} con la población general se incluyó un grupo control de personas sanas integrado por enfermeras y familiares de pacientes con padecimientos no autoinmunes y sin relación alguna con los pacientes con LES participantes en el estudio.

8.3.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN/EXCLUSIÓN

Se incluyeron pacientes que cumplieron con los siguientes criterios:

- Ser paciente con LES diagnosticado con al menos 4 criterios según el ACR
- Ser derechohabiente del IMSS
- Ser hombre/mujer >18 años al momento del ingreso al estudio
- Aceptar participar en el estudio (firmar consentimiento informado)
- No tener ninguna otra enfermedad autoinmune diagnosticada

8.4.- MUESTREO

La muestra incluyó a todos los pacientes con LES que acudieron a la consulta externa de la Dra. Natalia Minerva Santana Portillo (tesista) en el período de enero a octubre de 2005. Este período fue establecido de acuerdo a la factibilidad logística para cumplir el cronograma de trabajo.

8.5.- VARIABLES DE ESTUDIO

8.5.1.- DEPENDIENTE

Índice de daño SLICC/ACR: El índice de daño (ID) SLICC/ACR (Systemic Lupus International Collaborative Clinics / American College of Rheumatology) mide el daño acumulado que ha ocurrido desde el inicio del LES, resultando tanto de el proceso patológico o de sus secuelas. El daño por LES es definido como un cambio irreversible en un órgano o sistema que ha estado presente por al menos 6 meses.

Las definiciones y determinantes del índice se basan principalmente en criterios clínicos o en exámenes de laboratorio y gabinete ampliamente disponibles, por lo que este puntaje puede ser evaluado en instituciones convencionales. El IDS documenta el daño ocurrido a 12 órganos o sistemas corporales desde el inicio del LES (Cuadro 1). Cualquier afección puede ser la consecuencia de la actividad del LES, de la terapia, de una proceso co-mórbido, o de cualquier combinación entre estas. El IDS ha mostrado ser un índice válido, confiable y reproducible; la variabilidad interobservador en estudios con diferentes médicos y en varios países es poca. (Dayal 2002, Gladman 1997). El ID SLICC/ACR se comporta como una variable cuantitativa, medida en escala discreta, con un rango de 0 a 32 puntos.

Cuadro 1. Índice de daño SLICC/ACR (Systemic Lupus International Collaborative Clinics/American College of Rheumatology)

Sistema/órgano	Afección	Puntuación
Renal	Disminución de la filtración glomerular en 50%	1
	Proteinuria mayor de 3.5 gramos/litro	1
	Insuficiencia renal crónica (requiere trasplante)	1
Pulmonar	Hipertensión pulmonar	1
	Fibrosis pulmonar	1
	Fibrosis pleural	1
Cardiovascular	Bypass coronario	1
	Infarto al miocardio	1
	Cardiomiopatía dilatada	1
	Enfermedad valvular	1
	Pericarditis por más de 6 meses	1
	Pericardiectomía	1
Vascular periférico	Pérdida de tejido de dedos	1
	Pérdida significativa de tejido de dedos	1
	Claudicación por más de 6 meses	1
Gastrointestinal	Infarto o resección de intestino delgado	2
	Insuficiencia mesentérica	1
	Cirugía de tracto gastrointestinal	1
Músculo esquelético	Artritis erosiva	1
	Osteoporosis con fractura	1
	Colapso vertebral	1
	Osteonecrosis	1
	Osteomielitis	1
	Ruptura de tendón	1
Piel	Alopecia crónica	1
	Panniculitis	1
	Úlceras en piel por más de 6 meses	1
Otros	Insuficiencia gonadal prematura	1
	Diabetes secundaria al tratamiento	1
	Malignidad (no displasia)	2

8.5.2.- VARIABLE INDEPENDIENTE

Haplotipos y genotipos HLAII-DR_{B1}/DQ_{A1-B1}: Determinados mediante la técnica de Análisis de Polimorfismo Conformacional de cadena única de DNA (RSCA). Se trata de una variable nominal de acuerdo con la nomenclatura internacional vigente.

8.5.3.- OTRAS VARIABLES

Edad: En años cumplidos al ingreso al estudio. Variable cuantitativa, medida en escala continua. Indicador: años cumplidos.

Sexo: fenotipo de la persona. Variable cualitativa, medida en escala nominal. Indicadores: Masculino (M) y Femenino (F).

Grupo étnico: Raza determinada en base al fenotipo, vestimenta y lenguaje. Variable cualitativa, medida en escala nominal. Indicadores: Caucásico (C), Mestizo (M), Negro (N), Indígena (I), Otros (O).

Escolaridad: Grado máximo de estudios cursado. Variable cualitativa, medida en escala nominal. Indicadores: Primaria incompleta (PI), Primaria completa (PC), Secundaria (SE), Preparatoria o Carrera técnica (PT), Profesional (PR), Maestría (MA), Doctorado (DO).

Origen: Lugar de nacimiento. Variable cualitativa, medida en escala nominal. Indicadores: Estado de Chihuahua (EC), Otro estado de México (OE), Otro país (OP).

Lugar de residencia: Lugar donde radica la persona al momento de la entrevista. Variable cualitativa, medida en escala nominal. Indicadores: Estado de Chihuahua (EC), Otro estado de México (OE).

Edad de inicio de la sintomatología: Años cumplidos al comenzar los síntomas sugestivos de LES. Variable cuantitativa, medida en escala continua. Indicador: años cumplidos.

Edad al diagnóstico de LES: Medida en años cumplidos al efectuar el diagnóstico de la enfermedad. Variable cuantitativa, medida en escala continua. Indicador: años cumplidos.

8.6.- RECOLECCION DE DATOS Y RECURSOS HUMANOS

1 médicos especialista en Reumatología

1 médico especialista en Epidemiología Investigador CN1

1 médico especialista en Radiología

1 médico especialista en Cardiología

1 médico especialista en Angiología

8.7.- DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Fase de selección

Invitación abierta a los pacientes mediante contacto personal en la consulta de Reumatología en los hospitales participantes y a través de medios de difusión.

Confirmación diagnóstica mediante la revisión de expediente clínico previo, historia clínica, estudios de laboratorio y gabinete.

Revisión de criterios de inclusión y exclusión.

Llenado de cartas de consentimiento informado.

Entrega de solicitudes de estudios paraclínicos.

Fase de estudios paraclínicos

Tele de tórax, Rx de columna lumbar y ambas manos en posición AP y lateral.

Muestra sanguínea de 10 cc para extracción de DNA, glucemia, perfiles hormonales, química sanguínea, anticuerpos antinucleares, anti DNA, anticuerpos antifosfolípidos, anti Sm, C3 y C4.

Orina de 24 horas para determinación de la depuración de creatinina y albuminuria.

8.8.- VISITA 1

Electrocardiograma.

Ecocardiograma.

Evaluación cardiovascular.

8.9.- VISITA 2

Evaluación de exámenes de laboratorio y gabinete.

Determinación del índice de daño y de actividad

8.10.- CONSIDERACIONES ÉTICAS

El estudio descrito en este protocolo se realizará en cumplimiento con la revisión actual de la Declaración de Helsinki:

Previo al inicio, se solicita firmar una carta de consentimiento informado, en la que se explica al paciente en forma detallada en qué consistirá su participación, así como cada uno de los estudios paraclínicos a los que será sometido. Todos estos estudios forman parte del panel que ordinariamente se realizan en pacientes con LES.

Se asegura la confidencialidad de los datos personales del paciente.

No existe coerción para la participación.

El proyecto se sometió a revisión por un Comité de investigación y ética médica.

Obteniendo la aprobación y el número de registro: 08ª101062151/9 por el HGR.

Nº1, de la ciudad de Chihuahua, calle García Conde y Universidad s/n

8.11.- CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN PARA EL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICOⁱ

Para considerarse LES, deben reunirse 4 o más de los siguientes criterios:

Eritema malar	Enrojecimiento en la región malar en forma de alas de mariposa.
Eritema discoide	Lesiones dérmicas en parches rojos y elevados, con descamación.
Fotosensibilidad	Eritema cutáneo que se desarrolla por la exposición al sol.
Úlceras orales	Úlceras no dolorosas en nariz o boca.
Artritis	Inflamación y dolor que se presenta en ambos lados del cuerpo, principalmente en manos, rodillas y muñecas, sin ocasionar deformidad articular.
Serositis	Inflamación de las cubiertas de corazón, abdomen o pulmón
Nefropatía	Pérdida persistente de proteínas en orina, mayor de 0.5gr/l/día o de +++.
Trastorno neurológico	Crisis convulsivas o trastorno psiquiátrico primario que suceden sin otra posible explicación.
Trastorno hematológico	Disminución en la cuenta de uno o varios componentes sanguíneos: anemia hemolítica, leucopenia menor de 4,000, linfopenia menor de 1500, trombocitopenia menor de 100,000.
Trastorno inmunológico	Marcadores específicos de la enfermedad como células LE, Anti DNA nativo, anti Sm, anti cardiolipinas (IgG e IgM), anticoagulante lúcido, VDRL falso positivo durante al menos 6 meses.
Anticuerpos antinucleares	títulos positivos en sangre.

8.12.- CONSENTIMIENTO INFORMADO

_____ a _____ de _____ de _____.

Nombre del proyecto: Asociación entre índice de daño SLICC/ACR y alelos HLAII-DR_{B1}/DQ_{A1-B1} en pacientes con lupus eritematoso sistémico y en controles.

8.13.-NÚMERO DE REGISTRO : 08A101062151/599

Objetivo: Establecer si existe asociación entre el daño que ocasiona el lupus eritematoso sistémico y los marcadores genéticos de la enfermedad en pacientes de la ciudad de Chihuahua, Chih., México.

8.14.-PARTICIPACIÓN

- Mostrar la historia clínica y los resultados de estudios de laboratorio o radiografías con las que se pueda corroborar el diagnóstico.
- Someterse a punción venosa para obtener una muestra de sangre con la que se realizarán el estudio genético, medición de glucosa, creatinina y perfil hormonal.
- Recolección de orina de 24 horas para medir la depuración de creatinina y la excreción de albúmina.

- Realizarse estudios radiológicos de columna lumbar y ambas manos.
- Evaluación cardiovascular con electrocardiograma y ecocardiograma.
- Evaluación reumatológica para establecer el grado de daño crónico.
-

8.15.- CONFIDENCIALIDAD

Toda la información obtenida por el Médico respecto a sus antecedentes, condiciones de salud o resultados de laboratorio y gabinete, se manejarán en forma absolutamente confidencial, incluso al publicar los resultados de la investigación.

8.16.- RIESGOS, INCONVENIENTES Y MOLESTIAS

Participar en el estudio no implica ningún riesgo agregado a los que requiere la vigilancia de su enfermedad.

Usted podrá abandonar el estudio en cualquier momento sin que ello tenga consecuencia alguna.

8.16.- BENEFICIOS

Con su participación, usted recibirá consultas médicas, estudios de laboratorio y gabinete, sin costo

CAPÍTULO 9.- PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS PARA LA TIPIFICACIÓN DE EL HLAII

9.1.- METODOLOGÍA Y EXTRACCIÓN DEL ADN

El ADN de los pacientes y controles se extrajo a partir de una muestra de sangre periférica, por medio de una aguja y jeringa estéril puncionándose la vena cubital del brazo derecho en extensión, obtuve aproximadamente 5 ml.

Este procedimiento lo efectué en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Chihuahua en el área de laboratorio de postgrado, con apoyo de la Dra. Irene Leal Solís y tres médicos internos del HGR No 1 del IMSS de la ciudad de Chihuahua.

- 1.-Pasamos el contenido del tubo de sangre colectado en el tubo de ensaye a un tubo cónico de 50 ml .Seguimos el procedimiento descrita por el Kit Wisard para extracción de ADN.
- 2.- Adicionamos dos volúmenes de buffer para lisar los eritrocitos en razón de 10:1
- 3.- Agitamos el tubo cónico por varios segundos por medio de inversión para favorecer la lisis de los eritrocitos y se incluyen los tubos cónicos (aproximadamente 8 tubos) en una centrifuga a 4,500 rpm durante 20 minutos a 4^o C
- 4.-Se decanto y se lavo el botón con solución amortiguadora de lisis de eritrocitos.
- 5.- Se centrifugaron, 3 veces más los botones con los eritrocitos lisados a 4,500 rpm (en total 60 minutos más en tres tiempos) 4 °C
- 6.- A los botones limpios de eritrocitos, se le agregan 3 µl a cada uno de solución amortiguadora y lo agitamos ligeramente.
- 7.- Le agregamos 200 µl de CDS al 10% y 500 ml de una enzima llamada proteinasa K para asegurar la destrucción completa de leucocitos.
- 8.- Posteriormente se agito en el vortex hasta que se disolvió el botón que contiene las muestras.
- 9.- Incubamos a 37°C, por un tiempo de 24 horas.
- 10.-Adicionamos 1 µl de solución salina (6M)
- 11.- En seguida agitamos vigorosamente por 15 segundos el vortex que contiene la muestra en cuestión.
- 12.- Inmediatamente centrifugamos el vortex a 5000 rpm durante 15 minutos
- 13.- Transferimos el sobrenadante ya conteniendo el ADN), a un tubo falcón de 15 ml , estéril.
- 14.- El etanol se agrego frio 2 volúmenes
- 15.- Se trasfirieron las hebras de ADN a un microtubo después de tirar el sobrenadante restante a un estéril Eppendor, ayudándonos con una micropipeta.

- 16.- Lavamos el contenido del tubo Eppendor con etanol al 70%.
 - 17.- Dejamos el tubo abierto Eppendor por 24 horas hasta que se seco el contenido (ADN).
 - 18.- Diluimos el ADN con 200 μ l de solución amortiguadora TE.
 - 19.- Agitamos los tubos que contenían las diversas tiras de ADN con el fin de homogenizar las muestras.
 - 20.-Colocamos el microtubo a 37°C, hasta que totalmente se disolvió el ADN en un lapso de un día.
- Posteriormente utilizamos el micro método referido en el Kit Wizard para la continuación del manejo de ADN.
- 1.- Incubamos 300 μ l de sangre en un microtubo de 1.5 ml con 600 μ l de buffer de lisis a 68°C por un tiempo de 5 minutos. Mezclamos por inversión
 - 2.- Se agregaron 900 μ l de cloroformo, agitando fuertemente durante 5 minutos con la mano para centrifugar 14000 rpm por 10 min.
 - 3.- Extrajimos el sobrenadante y lo pasamos a otro tubo, adicionando 900 μ l de solución fisiológica y 100 μ l de solución de CTAB, durante un lapso de 2 a 3 minutos de mezclo y nuevamente se centrifugo a 10,000 rpm.
- En esta etapa el ADN se precipita y se recupera e3n forma de una pastilla. El sobrenadante, lo desechamos decantándolo y recuperando la pastilla con una micropipeta.
- 4.- La pastilla se suspendió en 100 μ l de sal 1.2 M y agregamos 750 μ l del alcohol en este caso etanol que es más volátil, nuevamente se agita y lo centrifugamos a 14000 rpm por unos minutos.
 - 5.- Se tiro el sobrenadante cuidadosamente para no perder la pastilla.
 - 6.- Lavamos la pastilla con 1 μ l de etanol al 70% y lo volvimos a centrifugar a 10000rpm por un espacio de 5 minutos.
 - 7.- Se decanto nuevamente el sobrenadante y se lavó nuevamente con etanol al 70%.
 - 8.- Secamos la pastilla a temperatura ambiente y se re suspendió en 50 μ l de TE.
 - 9.- Incubamos a 37 °C, hasta la disolución total de ADN.
 10. Con esta técnica idóneamente se recuperan 100 μ g de ADN.

9.2.- PREPARACION DE SOLUCIONES

Para lograr el objetivo de obtener el ADN necesario, preparamos las siguientes soluciones:

Solución de NaCl 6M	17.532 gramos
Solución Amortiguadora TE (Tris mM)	0.06055 gramos
EDTA 2mM(PH ajustado a 2.5 con HCl	0.00372 gramos

Se aforo la solución
amortiguadora para lisis de
leucocitos

**SOLUCION AMORTIGUADORA
PARA LISIS DE**

Tris mM	0.1211g
NaCl 400 mM	2.3376g
EDTA 0.002M	0.0744g
Se ajusto el PH final con Cl ₂ OH (Ph 8.2)	
DIODECIL Na ₂ SO ₄ (CDS) al 10 CDS	10 g

LEUCOCITOS

Solución de la enzima degradante (proteínasa K)	25mg
CDS	0.25 g
EDTA 2Mm	0.0186g
CTAB	
NaCl 0.4 M	1.17 g
CTAB o HDTAB 5%	2.5g
DTAB	
Trizma base 0.1M	3.0275g
NaCl 1.2 M	17.5g
EDTA 0.05 M	4.653g
DTAB 8%	20g
NaCl 1.2 M	
NaCl 1.2 M	7.02g

9.3.- DILUCIÓN DEL ADN

Para poder conocer la concentración del ADN que extrajimos, así como comprobar la pureza de los nucleótidos, realizamos las pruebas cuantitativas (Espectrofotometría) y cualitativas (electroforesis). Solo se realizaron las pruebas a unas cuantas alícuotas al azar

Método de electroforesis (prueba cualitativa) Analizado en unas cuantas alícuotas por la Doctora Irene Leal Solís.

- 1.- Colocamos el gel de agarosa en la solución de trabajo de bromuro de etilo recién preparado por espacio de 10 minutos.
- 2.- Retiramos el exceso de bromuro de etilo en un recipiente con agua desionizada.
- 3.- Observamos por medio de un transiluminador ultravioleta.
- 4.- Se tomaron fotos y se interpretaron los resultados.

Realizamos alícuotas de ADN a una concentración 100ng/ μ l.

La electroforesis es útil para estimar de manera cualitativa de la pureza, también sirve para la concentración del ADN.

El procedimiento es el siguiente:

- 1.- Se prepara un gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora TB0.5X
- 2.- Se depositan 5 μ l del ADN que esta en la solución con 3 μ l de jugo azul.
- 3.- Se corre el gel a 120 luz UV por algunas horas.
- 4.- El gel es teñido con bromuro de etidio y se visualiza el ADN en un transiluminador de luz UV.

Una banda nítida significa en el gel una pureza e integridad adecuadas para la amplificación por RCP. Si encontramos un barrido se traduce en una contaminación por sales, mientras que la aparición de múltiples bandas es señal de una degradación del ADN.

Al no encontrarse banda alguna esto significa que no se extrajo ADN y es un error.

La espectrofotometría es un método que sirve cuantitativamente para analizar la cantidad de genoma y de proteínas (concentración y pureza). Para realizarlo se ajusta el espectrofotómetro a la longitud de onda deseada (26 y 280 nm). Se ajusto a 0 (agua), se coloco 1.0 ml de agua desmineralizada y se deposito en una celdilla de cuarzo, se adicionaron 5 ml de muestra de ADN y se mezclo, se coloco la celdilla con la mezcla en el espectrofotómetro y se obtuvo la densidad óptica (DO), a 260 nm para determinar la concentración de ADN y a 280 nm para la determinación de dichos aminoácidos. Se calculo la concentración y la pureza del ADN, a partir de los datos obtenidos. Se calcula la concentración de ADN tomando en cuenta el coeficiente de extinción molar de 50 ng/ml de ADN, con esto consigue la máxima absorbancia de 1.0 unidad de DO a

260 nm lo cual tiene un valor de 50 y también tiene importancia la dilución usada.

Para esto es necesario la siguiente fórmula: $\text{conc. ADN ng/}\mu\text{l} = \text{D.O. 260 nm} * \text{factor de dilución (1005mfeaV5 mfea1)} * 50$ (valor constante).

La determinación de la pureza del ADN, es posible con una fórmula:

$\text{Pureza del ADN} = \text{D.O. 260nm/D.O. 280 nm}$.

Es importante al menos tener el mínimo de pureza el cual es de menor a 1.4 para reacciones estándar de RCP. El valor de 1.8 o más es el mejor.

9.4.- ELECTROFORESIS Y ESPECTOFOTOMETRÍA

La electroforesis y la espectrofotometría de las muestras totales fueron realizadas en dos centros que me apoyaron:

1.-. CMNSXX1 Unidad de Investigación biomolecular por la Dra. Martha Pérez

2.- INNSZ.- Departamento de Inmunología y Reumatología por el Dr. Julio Granados Arriola.

9.5.- TÉCNICA DE PCR PARA LA TIPIFICACION DEL HLAII-DQA1 Y DQB1

Para determinar el HLAII, se utilizo el exon2 de las cadenas $\alpha 1$ y $\beta 1$ de los genes, DRBI, DQAI Y DQBI, por ser los más polimórficos, La tipificación molecular se realizo con la técnica PCR- primer secuencia-especifica (SSP-PCR), de acuerdo con (Olerub y cols, 1993)- Esta técnica se basa en la utilización de iniciadores para la identificación de uno o más alelos y así como de un par de iniciadores adicionales, como control de amplificación.

En esta técnica la presencia o ausencia del amplificado de los alelos específicos definió la asignación de alelos particulares. Las condiciones de tipificación por PCR son:

Reacción estándar de PCR para la tipificación del HLA con la técnica PCR-SSP

Reactivos	Concentración final
Buffer PCR 1	X
MGCL2	1.5 mM
dNTP's	200 μ M
Iniciador 5'	15pmol
Iniciador3'	15pmol
Control C3'	3.75pmol
Control C5	3.75pmol
Taq Polimerasa	0,25 U
ADN genómico	100 ng/ μ l

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	96°C	5 minutos
Desnaturalización	94°C	1 minuto
Alineación	55°C	50 segundos
Extensión	72°C	2 minutos
Del 2 al 4 30 ciclo		
Extensión final	72°C	10 minutos
Enfriamiento	4°C	5 minutos

9.5.1.- REACCION PCR-SSP INICIADORES

MEZCLA DE REACCION	INICIADOR		TAMAÑO PRODUCTO	ALELOS
	5'	3'		
DQA1				
*0101/4	A-5`01 3`01	A-	149 pb	*0101,*0104
*0102/4	A-5`02 3`01	A-	172 pb	*0101,*0102,*01014
*0102/3	A-5`03 3`01	A-	149 pb	*0102,*0103
*0103	A-5`04 A`3`01		172 pb	*0103
*0201	A-5`04 3`02	A-	170 pb	*0201
*0301	A-5`05 3`03	A-	183 pb	*301
*0302	A-5`06 3`03	A-	183 pb	*0302
*0401	A-5`07 3`04	A-	190 pb	*0401
*0501	A-5`02 3`05	A-	186 pb	*0501
*0601	A-5`04 3`06	A-	117 pb	*0601
"A"	A-5`08 3`07	A-	196 pb	Todos menos *0104
*0104	A-5`09 3`07	A-	195 pb	*0104

MEZCLA DE REACCION	INICIADOR		TAMAÑO PRODUCTO	ALELOS
	5'	3'		
DQB1				
*0501	B-5'01	B-3'01	128 pb	*0501
*0502	B-5'02	B-3'02	117 pb	*0502
*0503	B-5'02	B-3'03	87 pb	*0503
*0601	B-5'03	B-3'04	198 pb	*0601
*0602	B-5'04	B-3'05	121 pb	*0602
*0603/8	B-5'05	B-3'05	254 pb	*0603,*0608
*0604	B-5'06	B-3'06	205 pb	*0604
*0201/*03 02	B-5'08	B-3'08	129 pb	*0201,*0302
*0301/4	B-5'09	B-3'09	122 pb	*0301
*0302/3	B-5'08	B-3'08	129 pb	*0201,*0302
*0602	B-5'04	B-3'05	121 pb	*0602
*0603/8	B-5'05	B-3'05	127 pb	*0603,*0608
*0604	B-5'06	B-3'06	254 pb	*0604
*0201	B-5'07	B-3'07	129 pb	*0201
*0201/*03 02	B-5'08	B-3'08	122 pb	*0201,*0302
*0301/4	B-5'09	B-3'09	122 pb	*0301,*0304
*0302/3	B-5'08	B-3'09	129 pb	*0302,*0303
*0303	B-5'08	13-3'10	200 pb	*0303
*0401	B-5'10	13-3'11	200 pb	*0401
*0402	B-5'11	13-3'11	118 pb	*0402
*0504	B-5'12	B-3'02	254 pb	*0504
*0605	B-5'13	B-3'06	176 pb	*0606
*0606	B-5'05	B-3'12	165 pb	*0602,*0603,*0607
*0604/5/6/ 7	B-5'05	B-3'10	127 pb	*0604,*0605,*0606,*06 07
*0604/5/6/ 8	B-5'09	13-3'10	163 pb	*0604,*0605,*0606,*06 08
*0601/*03 01	B-5'09	B-3'10	129 pb	*0601,*0301
*0304	B-5'09	B-3'08	129 pb	*0304

Secuencia de los iniciadores usados en la PCR-SSP Y PCR-RFLP

LOCUS	NOMBRE	SEQ5A3	pb	MET
DQB1	B-3'01	5gCT GTT CCA GTA CTCgG AA3'	20	PSS
DQB1	B-302	5'TgT TCC agT ACT gg CgC T3'	19	PSS
DQB1	B-3'03	5'gCgCgCg TCA CCg CCCgA3'	17	PSS
DQB1	B-3'04	5'CACCgTgTCCAA CTC Ga3'	19	PSS
DQB1	B-3'05	5Gct Gtt cca Gta ctc Gc AT3'	20	PSS
DQB1	B-3'06	5'gCA ggA TCC CgC ggT ACC3'	18	PSS
DQB1	B-30'7	5'g CA Agg TCg TgC ggA Gct3'	18	PSS
DQB1	B-3'08	5CTg TTC CAg TAC TCg gCg g3'	19	PSS
DQB1	B-3'09	5'AgT ACT Cgg CgT CAg gC3'	18	PSS
DQB1	B-3'10	5CTg TTC CAg TAC TCg gCg T3'	19	PSS
DQB1	B-3'11	5'ggT AgT TgT gTC TgC ATA Cg3'	20	PSS
DQB1	B-3'12	5'TgC ACA CCC TgT CCA CCg3'	18	PSS
DQB1	B-3'13	5'AAC TCC gCC Cgg gTC CC3'	17	PSS
DQB1	B-3'14	5'CAA CTC CgC CCg ggT CCT3'	18	PSS
DQB1	B-3'15	5'CTg CAC ACC gTg TCC AACT3'	19	PSS
DQB1	B-5'01	5'Cgg AgC gCg TgC gg g3'	16	PSS
DQB1	B-5'02	5'Tgc ggg gTg TgA CCA Gac3'	18	PSS
DQB1	B-5'03	5gCC aTg TgC TAC TTC AAC AAT3'	21	PSS
DQB1	B-5'04	5'CgT gCg TCT TgT gAC Cag AT3'	20	PSS
DQB1	B-5'05	5'ggA gCg CgT gCg TCT TgT A3'	19	PSS
DQB1	B-5'06	5CgT gTA CCA gTT TAA gggCA3'	20	PSS
DQB1	B-5'07	5gTg CgT CTT gTg AgC AgA Ag3'	20	PSS
DQB1	B-5'08	5'gAC ggA gCg CgT gCg TCT3'	18	PSS
DQB1	B-5'09	5'gAC ggA gCg CgT gCg TTA3'	18	PSS
DQB1	B-5'10	5'CAC CCA Cgg gAC CgA gCt3'	18	PSS
DQB1	B-5'11	5'CAC CAA Cgg gAC CgA gCg3'	18	PSS
DQB1	B-5'12	5'gTg Cgg ggT gTg ACC AgAT3'	19	PSS
DQB1	B-5'13	5'CgT Gta CCA Gtt TAA ggg CC3'	20	PSS
DQB1	B-5'14	5'gTg CTA CTT CAC CAA Cgg gA	20	PSS
DQA1	A-5'01	5'CAT gAA TTT gAT ggA gAT gAg g3'	22	PSS
DQA1	A-5'02	5'ACg gTC CCT CTg gCC Agt A3'	19	PSS
DQA1	A-5'03	5'CAT GAA TTT ggA Gat Gat gAg C3'	22	PSS
DQA1	A-5'04	5'ACg gTC CCT CTg Gcc agT T3'	19	PSS
DQA1	A-5'05	5'TTC ACT CgT CAg CTg AAC AT3'	20	PSS
DQA1	A-5'06	5'TTC ACT CgT CAg CTg ACC AC3'	20	PSS
DQA1	A-5'07	5'CC CAT GAA TTT gAT ggA Gac3'	21	PSS
DQA1	A-5'08	5'AgC CCT TgT ggA ggT gAA GA3'	20	PSS
DQA1	A-5'09	5'gCC CTT gTg gAggTg AA g3'	19	PSS
DQA1	A-3'01	5'ATg ATg TTC AAg TgT TTT gC3'	23	PSS
DQA1	A-3'02	5'CAg gAT gTT CAA gTT ATg TTT TAg3'	24	PSS
DQA1	A-3'03	5'CAA ATT CCA TTG gTA gCA Gca3'	22	PSS
DQA1	A-3'04	5' AgT Tgg AgC gTT TAA TCA gAC3'	21	PSS
DQA1	A-3'05	5'AgT Tgg AgC gTT TAA TCA gAC3'	21	PSS
DQA1	A-3'06	5ggT CAA ATC TAA ATT gTC TgA gA3'	23	PSS
DQA1	A-3'07	5'AgT ggT Tgg ggC TCT ggT TT3'	20	PSS

9.6 TÉCNICA DE OLIGOTYPING

Para la determinación de HLADRB1 se utilizó la técnica de OLIGOTYPING de baja resolución a nivel del DNA, se amplificaron los genes HLA-DRB1 por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los genotipos se revelaron mediante quimioluminiscencia utilizando oligonucleótidos específicos de secuencia (Allele specific oligotyping "ASO"). Se determinaron los siguientes: DRB1:01,03,04,07,08,09,10,11,12,13,14,15,16

CAPÍTULO 10.- RESULTADOS DE FRECUENCIAS GÉNICAS DE LOS ALELOS HLAII DQAI,DQBI y DRB1 EN PACIENTES Y CONTROLES

Frecuencias génicas del alelo DQ

HLA-DQ	Alelo B1 N=282		Alelo A1 N=282	
	n	f.g.	n	f.g.
050101	34	0.120	65	0.230
030101	49	0.173	55	0.195
040101			47	0.166
0101			39	0.138
0201	59	0.209	37	0.131
0102			25	0.088
0103			14	0.049
0604	10	0.030		
0402	24	0.080		
0302	52	0.184		
602	28	0.090		
502	2	0.007		
603	18	0.060		
030302	1	0.003		
060101	1	0.003		

Frecuencias génicas alelos HLA-DQ B1

HLA-DRB1	N=282	
	n	f.g.
0201	59	0.209
0302	52	0.184
030101	49	0.173
050101	34	0.120
0602	28	0.090
0402	24	0.080
0603	18	0.060
0604	10	0.030
0502	2	0.007
030302	1	0.003
060101	1	0.003

Frecuencias génicas alelos HLA-DQ A1

N=282

HLA-DRB1	n	f.g.
050101	65	0.230
030101	55	0.195
040101	47	0.166
0101	39	0.138
0201	37	0.131
0102	25	0.088
0103	14	0.049

Frecuencias génicas alelos HLA-DR B1

N=282

HLA-DRB1	n	f.g.
04	55	0.195
13	38	0.134
03	30	0.106
07	29	0.102
14	27	0.095
01	26	0.092
08	24	0.085
11	22	0.078
15	12	0.042
16	11	0.039
09	4	0.014
12	2	0.007
10	2	0.007

10.1.- RESULTADO DE HLAII DQB1,DQA1

1.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR4 DQA 0301 DQB 0301
2.
DR11 DQA 0501 DQB 0301
DR4 DQA 0301 DQB 0302
3.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR15 DQA 0102 DQB 0602
4.
DR7 DQA 0201 DQB 201
DR16 DQA 0401 DQB 0602
5.
DR3 DQA 0501 DQB 0201
DR3 DQA 0301 DQB 0201
6.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR14 DQA 0501 DQB 0301
7.
DR8 DQA 0401 DQB 0402
DR13 DQA 0101 DQB 0302
8.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR1 DQA 0101 DQB 0501
9.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR1 DQA 0101 DQB 0501
10.
DR16 DQA 0401 DQB 0602
DR15 DQA 0102 DQB 0602
11.
DR11 DQA 0501 DQB 0301

Y DRB1 DE PACIENTES Y CONTROLES (144 SUJETOS)

- DR13 DQA 0103 DQB 0603
- Y DQB1 DE PACIENTES Y
CONTROLES
12.
DR14 DQA 0501 DQB 0301
DR3 DQA 0501 DQB 0201
 13.
DR11 DQA 0501 DQB 0602
DR13 DQA 0103 DQB 0602
 14.
DR1 DQA 0101 DQB 0501
DR8 DQA 0401 DQB 0402
 15.
DR14 DQA 0501 DQB 0301
DR1 DQA 0101 DQB 0501
 16.
DR14 DQA 0501 DQB 0301
DR13 DQA 0103 DQB 0603
 17.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR13 DQA 0301 DQB 0604
 18.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR8 DQA 0401 DQB 0402
 19.
DR11 DQA 0501 DQB 0301
DR4 DQA 0301 DQB 0302
 20.
DR11 DQA 0501 DQB 0301
DR1 DQA 0101 DQB 0501

21.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR14 DQA 0501 DQB 0301

22.
DR16 DQA 0501 DQB 0602
DR15 DQA 0103 DQB 0602

23.
DR11 DQA 0501 DQB 0301
DR14 DQA 0501 DQB 0301

24.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR11 DQA 0501 DQB 0301

25.
DR3 DQA 0501 DQB 0201
DR8 DQA 0401 DQB 0402

26.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR1 DQA 0101 DQB 0501

27.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR8 DQA 0401 DQB 0402

28.
DR11 DQA 0501 DQB 0301
DR15 DQA 0102 DQB 0602

29.
DR4 DQA 0301 DQB 0301
DR7 DQA 0201 DQB 0201

30.
DR14 DQA 0101 DQB 0503
DR1 DQA 0101 DQB 0501

31.
DR4 DQA 0101 DQB 0302
DR8 DQA 0401 DQB 0402

32.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR7 DQA 0201 DQB 0201

33.
DR10 DQA 0101 DQB 0501
DR16 DQA 0102 DQB 0502

34.
DR13 DQA 0103 DQB 0603
DR13 DQA 0401 DQB 0603

35.
DR4 DQA 0301 DQB 0303
DR1 DQA 0101 DQB 0501

36.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR13 DQA 0101 DQB 0501

37.
DR1 DQA 0101 DQB 0501
DR8 DQA 0401 DQB 0402

38.
DR14 DQA 0501 DQB 0301
DR8 DQA 0401 DQB 0402

39.
DR4 DQA 0101 DQB 0302
DR1 DQA 0101 DQB 0501

40.
DR4 DQA 0102 DQB 0302
DR16 DQA 0102 DQB 0602

41.
DR3 DQA 0501 DQB 0201
DR13 DQA 0501 DQB 0302

42.
DR3 DQA 0501 DQB 0201
DR13 DQA 0501 DQB 0302

43.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR12 DQA 0201 DQB 0301

44.
DR4 DQA 0401 DQB 0301
DR8 DQA 0401 DQB 0402

45.
DR4 DQA 0401 DQB 0302
DR13 DQA 0401 DQB 0603

46.
DR14 DQA 0501 DQB 0301
DR14 DQA 0501 DQB 0302

47.
DR13 DQA 0103 DQB 0603
DR8 DQA 0401 DQB 0402

48.
DR3 DQA 0501 DQB 0201
DR11 DQA 0501 DQB 0301

49.
DR11 DQA 0401 DQB 0603
DR13 DQA 0103 DQB 0603

50.
DR15 DQA 0102 DQB 0602
DR16 DQA 0401 DQB 0602

51.
DR4 DQA 0401 DQB 0302
DR8 DQA 0401 DQB 0402

52.
DR14 DQA 0101 DQB 0503
DR16 DQA 0102 DQB 0602

53.
DR11 DQA 0501 DQB 0301
DR8 DQA 0401 DQB 0402

54.
DR11 DQA 0501 DQB 0604
DR11 DQA 0501 DQB 0604

55.
DR4 DQA 0501 DQB 0302
DR3 DQA 0501 DQB 0201

56.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR8 DQA 0201 DQB 0402

57.
DR4 DQA 0201 DQB 0302
DR14 DQA 0101 DQB 0503

58.
DR4 DQA 0103 DQB 0302
DR13 DQA 0103 DQB 0603

59.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR4 DQA 0301 DQB 0302

60.
DR4 DQA 0201 DQB 0302
DR7 DQA 0201 DQB 0201

61.
DR9 DQA 0201 DQB 0302
DR8 DQA 0401 DQB 0402

62.
DR14 DQA 0501 DQB 0301
DR11 DQA 0501 DQB 0302

63.
DR13 DQA 0102 DQB 0603
DR13 DQA 0102 DQB 0604

64.
DR11 DQA 0501 DQB 0301
DR8 DQA 0501 DQB 0402

65.
DR11 DQA 0501 DQB 0301
DR4 DQA 0501 DQB 0302

66.
DR13 DQA 0103 DQB 0603
DR13 DQA 0401 DQB 0603

67.
DR1 DQA 0101 DQB 0501
DR1 DQA 0101 DQB 0501

68.
DR3 DQA 0101 DQB 0201
DR3 DQA 0401 DQB 0201

69.
DR3 DQA 0401 DQB 0201
DR8 DQA 0401 DQB 0402

70.
DR3 DQA 0401 DQB 0301
DR8 DQA 0401 DQB 0402

71.
DR3 DQA 0501 DQB 0201
DR11 DQA 0501 DQB 0301

72.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR13 DQA 0301 DQB 0603

73.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR16 DQA 0301 DQB 0602

74.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR11 DQA 0301 DQB 0501

75.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR3 DQA 0501 DQB 0201

76.
DR15 DQA 0102 DQB 0602
DR15 DQA 0102 DQB 0602

77.
DR3 DQA 0501 DQB 0201
DR14 DQA 0301 DQB 0301

78.
DR15 DQA 0102 DQB 0602
DR15 DQA 0401 DQB 0602

79.
DR1 DQA 0101 DQB 0501
DR1 DQA 0101 DQB 0503

80.
DR14 DQA 0501 DQB 0301
DR14 DQA 0103 DQB 0301

81.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR3 DQA 0501 DQB 0301

82.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR14 DQA 0301 DQB 0501

83.
DR3 DQA 0401 DQB 0201
DR7 DQA 0401 DQB 0201

84.
DR3 DQA 0501 DQB 0201
DR3 DQA 0103 DQB 0201

85.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR4 DQA 0301 DQB 0302

86.
DR3 DQA 0501 DQB 0201
DR15 DQA 0102 DQB 0602

87.
DR1 DQA 0101 DQB 0501
DR15 DQA 0102 DQB 0602

88.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR14 DQA 0501 DQB 0301

89.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR3 DQA 0501 DQB 0201

90.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR13 DQA 0301 DQB 0601

91.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR7 DQA 0201 DQB 0201

92.
DR4 DQA 0401 DQB 0301
DR8 DQA 0401 DQB 0402

93.
DR1 DQA 0101 DQB 0501
DR1 DQA 0101 DQB 0501

94.
DR3 DQA 0501 DQB 0201
DR14 DQA 0301 DQB 0302

95.
DR3 DQA 0501 DQB 0201
DR9 DQA 0201 DQB 0301

96.
DR12 DQA 0401 DQB 0301
DR1 DQA 0101 DQB 0501

97.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR13 QA 0102 DQB 0602

98.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR1 DQA 0101 DQB 0501

99.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR7 DQA 0201 DQB 0201

100.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR13 DQA 0102 DQB 0602

101.
DR14 DQA 0301 DQB 0501
DR14 DQA 0301 DQB 0501

102.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR7 DQA 0201 DQB 0201

103.
DR16 DQA 0102 DQB 0602
DR16 DQA 0501 DQB 0602

104.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR1 DQA 0301 DQB 0501

105.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR3 DQA 0501 DQB 0201

106.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR13 DQA 0201 DQB 0603

107.
DR14 DQA 0501 DQB 0301
DR13 DQA 0501 DQB 0501

108.
DR4 DQA 0301 DQB 0602
DR13 DQA 0301 DQB 0301

109.
DR13 DQA 0101 DQB 0501
DR16 DQA 0102 DQB 0602

110.
DR13 DQA 0101 DQB 0604
DR13 DQA 0102 DQB 0604

111.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR13 DQA 0301 DQB 0604

112.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR11 DQA 0201 DQB 0301

113.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR8 DQA 0201 DQB 0402

114.
DR14 DQA 0501 DQB 0301
DR15 DQA 0103 DQB 0502

115.
DR9 DQA 0401 DQB 0301
DR8 DQA 0401 DQB 0402

116.
DR13 DQA 0102 DQB 0603
DR13 DQA 0102 DQB 0603

117.
DR4 DQA 0301 DQB 0301
DR3 DQA 0301 DQB 0201

118.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR4 DQA 0301 DQB 0301

119.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR4 DQA 0301 DQB 0301

120.
DR14 DQA 0501 DQB 0301
DR8 DQA 0401 DQB 0402

121.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR11 DQA 0201 DQB 0301

122.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR7 DQA 0301 DQB 0201

123.
DR10 DQA 0101 DQB 0501
DR8 DQA 0401 DQB 0402

124.
Coagulo

125.
DR4 DQA 0501 DQB 0302
DR14 DQA 0501 DQB 0301

126.
DR1 DQA 0101 DQB 0501
DR13 DQA 0101 DQB 0604

127.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR3 DQA 0501 DQB 0201

128.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR8 DQA 0401 DQB 0402

129.
DR7 DQA 0201 DQB 0201
DR7 DQA 0201 DQB 0201

130.
DR13 DQA 0401 DQB 0604
DR13 DQA 0401 DQB 0604

131.
DR13 DQA 0102 DQB 0201
DR11 DQA 0401 DQB 0602

142.
DR1 DQA 0101 DQB 0501
DR1 DQA 0101 DQB 0501

132.
DR4 DQA 0301 DQB 0302
DR4 DQA 0301 DQB 0301

133.
DR1 DQA 0101 DQB 0501
DR1 DQA 0401 DQB 0501

134.
DR9 DQA 0101 DQB 0302
DR8 DQA 0401 DQB 0402

135.
DR4 DQA 0401 DQB 0301
DR1 DQA 0101 DQB 0501

136.
DR4 DQA 0101 DQB 0302
DR3 DQA 0501 DQB 0301

137.
DR13 DQA 0103 DQB 0603
DR13 DQA 0401 DQB 0603

138.
DR3 DQA 0401 DQB 0201
DR13 DQA 0102 DQB 0602

139.
DR3 DQA 0501 DQB 0201
DR3 DQA 0102 DQB 0201

140.
DR3 DQA 0501 DQB 0201
DR14 DQA 0501 DQB 0301

141.
DR4 DQA 0501 DQB 0302
DR11 DQA 0501 DQB 0201

10.2 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE DATOS:

FRECUENCIAS ALÉLICAS Y SLICC Y HLADR1, DQA1

Y DQB1

DR4:
55 (0.197)

*0301	*0302.	45(0.161)
	*0301	9 (0.030)
	*0303	1 (0.003)

DR13:
38 (0.136)

*0103	*0603	17 (0.061)
	*0604	8 (0.028)
	*0602	4 (0.014)
	*0302	3 (0.010)
	*0501	2 (0.007)
	Otros	4 (0.014)

DR3:
29 (0.104)

*0501	*0201	28 (0.100)
	Otros	1 (0.003)

DR7:
29 (0.104)

*0201	*0201.	29 (0.104)
-------	--------	------------

DR1:
26 (0.093)

*0101	*0501.	26 (0.093)
-------	--------	------------

DR14
26 (0.093)

*0501	*0301	16 (0.057)
-------	-------	------------

	*0101	*0503	3 (0.010)
	*0301	*0501	3 (0.010)
		Otros	4 (0.014)
DR8: 24 (0.086)	*0401	*0402	24 (0.086)
DR11: 20 (0.071)	*0501	*0301	17 (0.061)
		Otros	3 (0.010)
DR15: 12 (0.043)	*0102	*0602.	11 (0.039)
	*0103	*0502	1 (0.003)
DR16: 11 (0.039)	*0102	*0602.	11(0.039)
DR9: 4 (0.014)	*0201	*0302.	4 (0.014)
DR12: 2 (0.007)	*0201	*0301	2 (0.007)
DR10: 2 (0.007)	*0101	*0501	2 (0.007)

La base de datos y el análisis se con el análisis se efectuó en el programa estadístico SPSS17 por el Dr. Joel Monàrrez Espino y Dra. Natalia Minerva Santana Portillo

Se realizo estadística descriptiva y análisis bivariado para buscar asociación entre el índice de daño, de actividad y los alelos HLA-DR y HLA-DQ.

El Cuadro 1 presenta características sociodemográficas seleccionadas y el puntaje medio de criterios para participantes con y sin LES. Se observó una menor proporción de hombres en el grupo de pacientes con LES en comparación con el grupo control (7.8 vs. 18.8; p 0.05), sin embargo, la edad promedio fue similar entre ambos grupos (41.1 vs. 40.2; p 0.69

Cuadro 1. Características sociodemográficas y puntaje de criterios para de los individuos con y sin Lupus Eritematoso Sistémico (LES)

Característica		Lupus Eritematoso Sistémico, n (%)		p ^a
		Positivo (caso)	Negativo (control)	
Sexo, n (%)	Hombre	6 (7.8)	12 (18.8)	0.05
	Mujer	71 (92.2)	52 (81.3)	
Edad en años cumplidos, media±d.e		41.1±13.2	40.2±11.9	0.69
Lugar de nacimiento	Chihuahua	68 (88.3)	54 (84.4)	0.49
	Otro estado/país	9 (11.7)	10 (15.6)	
Estado civil	Casado/unión libre	57 (74.0)	45 (70.3)	0.62
	Soltero/divorciado	20 (26.0)	19 (29.7)	
Puntaje de criterios para LES*, media±d.e		7.2±1.7	0±0	0.00
Total		77	64	

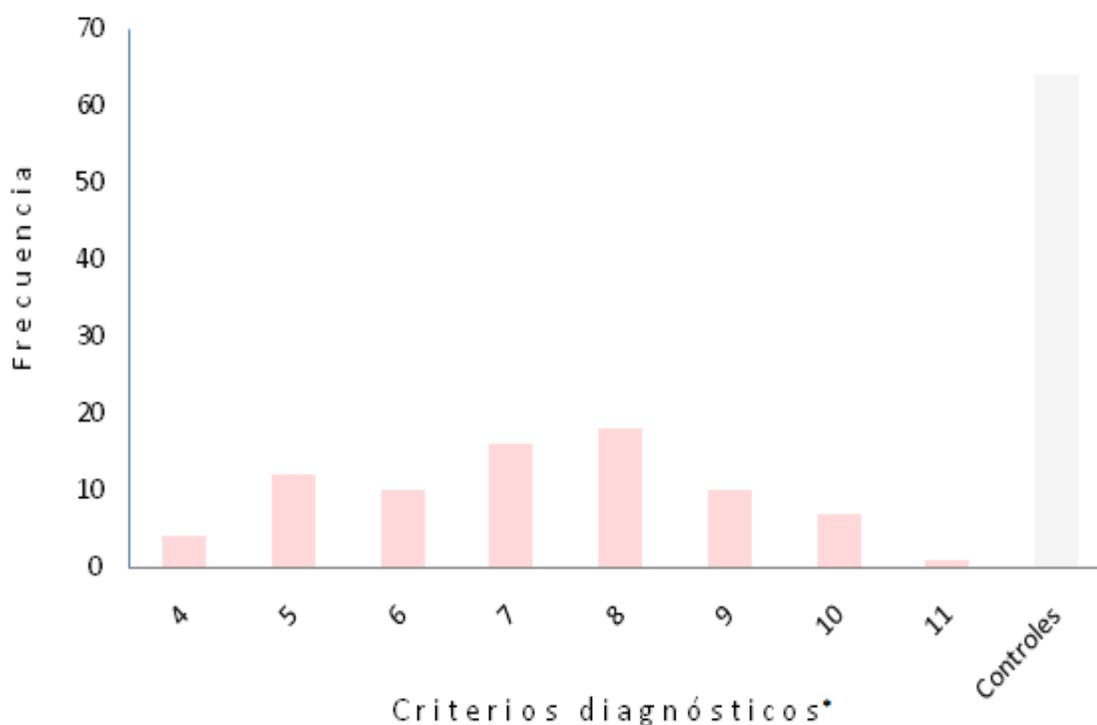
* Incluye 11 criterios que suman 1 punto cada uno: Eritema malar, eritema discoide, fotosensibilidad, úlceras orales, artritis, serositis, nefropatía, trastorno neurológico, trastorno hematológico, trastorno inmunológico, anticuerpos antinucleares (se requieren al menos 4 criterios para diagnosticar LES)

^a Se emplearon pruebas de Chi² de Pearson y de t de student para identificar diferencias entre proporciones y medias, respectivamente.

Tampoco se identificaron diferencias por lugar de nacimiento o estado civil. El puntaje medio de criterios para diagnóstico de LES fue de 7.2 en el grupo de casos comparado con 0 en el grupo control.

La Figura 1 presenta la distribución de criterios para establecer el diagnóstico de LES. El rango de criterios fluctuó entre 4 y 11. La mayor proporción de pacientes con LES presentaron entre 7 y 8 criterios. Ningún paciente del grupo control presentó algún criterio positivo.

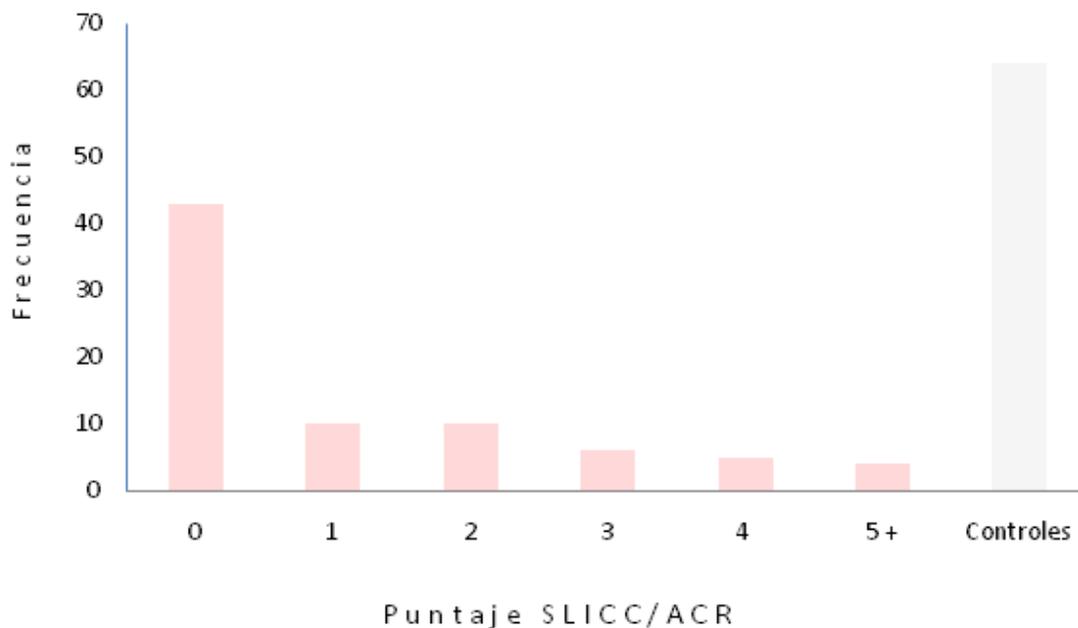
Figura 1. Número de criterios para el diagnóstico de LES, Chihuahua 2005



* Incluye 11 criterios que suman 1 punto cada uno: Eritema malar, eritema discoide, fotosensibilidad, úlceras orales, artritis, serositis, nefropatía, trastorno neurológico, trastorno hematológico, trastorno inmunológico, anticuerpos antinucleares (se requieren al menos 4 criterios para diagnosticar LES)

La Figura 2 presenta la distribución del puntaje de IDS para los participantes en el estudio. Los puntajes de IDS fueron bajos en la mayoría de los pacientes. Cerca del 45% de los pacientes con LES presentó un puntaje de 0, mientras que la mayor parte los demás pacientes con LES tuvo entre 1 y 4 puntos. Sólo 4 pacientes presentaron un puntaje de 5 o más.

Figura 2. Puntaje de SLICC/ACR en los participantes del estudio, Chihuahua 2005



El cuadro 2 presenta la frecuencia de haplotipos HLAII-DR_{B1}, DQ_{A1} y DQ_{B1} paternos y maternos en individuos con y sin LES cuando la razón entre ambas proporciones fue igual o mayor a 2.5:1 (asociadas a riesgo) o menor de 0.5:1 (asociadas a protección) y con tamaño de muestra total (suma entre ambos grupos) de 5 observaciones o más.

Para el alelo DR_{B1} se identificaron 3 haplotipos paternos de riesgo (1-3.5:1, 3-2.6:1, 7-3:1); para el materno se observó uno protector (3; 0.3:1). Para el alelo DQ_{A1} solo se observó un alelo materno de riesgo (301-2.8:1), y para el haplotipo DQ_{B1} solo 2 paternos (201-2.9:1, 501-3.6:1).

Cuadro 2. Haplotipos HLAII-DR_{B1}, DQ_{A1} y DQ_{B1} paternos y maternos en individuos con y sin Lupus Eritematoso Sistémico (LES)

HLA II	Lupus Eritematoso Sistémico		Razón*
	Positivo (caso)	Negativo (control)	
DR _{B1}			
Paterno			
1	7	2	3.5:1
3	13	5	2.6:1
7	15	5	3:1
Materno			
3	3	10	0.3:1
DQ _{A1}			

Materno			
301	17	6	2.8:1
DQ _{B1}			
Paterno			
201	29	10	2.9:1
501	11	3	3.6:1

* Incluye solo aquellas que alcanzan una razón mayor o igual a 2.5:1 con tamaños de muestra total ≥ 5

En el Cuadro 3 se presentan los genotipos HLAII-DR_{B1}, DQ_{A1} y DQ_{B1} para las personas del grupo con LES y el control. En total se identificaron nueve genotipos de riesgo.

Los genotipos con las mayores razones de riesgo entre pacientes con LES y los controles fue el DQ_{B1} 201-201 (9:1), el DQ_{A1} 301-301 (6.5:1), el DQ_{B1} 201-602 (5:1), y el DRB1 1-1 (5:0).

Cuadro 3. Genotipos HLAII-DR_{B1}, DQ_{A1} y DQ_{B1} en individuos con y sin Lupus Eritematoso Sistémico (LES)

HLA II	Lupus Eritematoso Sistémico		Razón*
	Positivo (caso)	Negativo (control)	
DRB1			
1-1	5	0	5:0
4-3	4	1	4:1
7-13	4	1	4:1

DQA1			
101-101	5	2	2.5:1
301-301	13	2	6.5:1
DQB1			
201-201	9	1	9:1
201-301	9	2	4.5:1
201-602	5	1	5:1
501-501	5	5	5:0

* Incluye solo aquellas que alcanzan una razón mayor o igual a 2.5:1 con tamaños de muestra total ≥ 5

El puntaje promedio del IDS por alelos paternos/maternos y genotipos de riesgo de mayor frecuencia, en relación a los controles, para el HLAI DRB1, DQA1 y DQB1, en los pacientes con LES, se presenta en el Cuadro 4.

Los alelos paternos de riesgo 1, 3 y 7 para el HLAI-DRB1 mostraron un puntaje medio mayor en conjunto en comparación con el resto de los haplotipos del grupo de comparación (los alelos restantes), pero sin alcanzar significancia estadística (1.44 vs. 1.05; p 0.42); para el alelo materno 3 (posiblemente protector) tampoco se identificó diferencia en las medias del IDS en comparación con el resto de los haplotipos del grupo (1.10 vs. 1.30; p 0.78); y para los genotipos 1-1, 4-3, y 7-13 hubo un puntaje mayor (1.36) en relación al resto de los alelos (0.54), sin alcanzar significancia estadística (p 0.17).

Para el HLAI DQA1 alelo materno 301 no se identificaron diferencias en los puntajes medios entre ambos grupos (p 0.55), ni para los genotipos 101-101, 301-301 (p 0.81).

Finalmente, para el HLAI DQB1 alelos paternos 201 y 501 se observó un puntaje medio superior (1.43 vs. 1.11), pero sin alcanzar significancia estadística (p 0.52). De igual modo, los genotipos 201-201, 201-301, 201-602, 501-501 tampoco mostraron medias estadísticamente superiores en comparación con el resto de los genotipos (1.54 vs. 1.12; p 0.41).

El Cuadro 5 presenta la comparación entre las proporciones de alelos paternos/maternos y genotipos de riesgo de acuerdo al IDS para el HLAI DRB1, DQA1, y DQB1 en los pacientes con LES.

El IDS fue codificado en dos categorías para los pacientes con LES: positivo cuando el IDS fue de 1 punto o mayor, y negativo cuando fue de 0. La proporción de personas con IDS positivo y negativo fue calculada para

cada uno de los alelos y genotipos de riesgo identificados según su frecuencia de presentación. Se usaron pruebas de Chi² de Pearson para valorar diferencias estadísticas entre las proporciones.

No se observaron diferencias entre las proporciones con IDS positivo para los haplotipos y genotipos estudiados ($p > 0.05$). Las proporciones fueron muy similares entre los grupos de comparación.

Cuadro 4. Puntaje medio y desviación estándar del índice de daño SLICC/ACR (IDS) por alelos paternos/maternos y genotipos de riesgo (por frecuencia en relación a los controles) para el HLAII DRB1-DQA1-DQB1 en los pacientes con LES, Chihuahua 2005

Riesgo ^a	IDS ^b			
	n	Media±d.e.	95% IC	min- máx
HLAII_{DRB1}				
Alelos paternos 1, 3, 7				
Sí	35	1.49±2.69	0.56-2.41	0-14
No	42	1.10±1.49	0.63-1.56	0-5
Alelos maternos 3				
Sí	10	1.10±1.91	-0.27-2.47	0-6
No	67	1.30±2.16	0.77-1.83	0-14
Genotipos 1-1, 4-3, 7-13				
Sí	13	0.54±1.19	-0.19-1.26	0-4
No	64	1.36±2.20	0.82-1.90	0-14
HLAII_{DQA1}				
Alelos maternos 301				
Sí	17	1.00±1.58	0.19-1.81	0-5
No	60	1.35±2.25	0.77-1.93	0-14
Genotipos 101-101, 301-301				
Sí	18	1.17±1.68	0.33-2.01	0-5
No	59	1.31±2.24	0.72-1.89	0-14
HLAII_{DQB1}				
Alelos paternos 201, 501				
Sí	40	1.43±2.52	0.62-2.23	0-14
No	37	1.11±1.59	0.58-1.64	0-5
Genotipos 201-201, 201-301, 201-602, 501-501				
Sí	28	1.54±2.86	0.43-2.64	0-14
No	49	1.12±1.56	0.67-1.57	0-5

^a Se consideraron alelos/genotipos de riesgo a aquellos con una frecuencia mayor en pacientes con LES que en controles sin LES

^b Diferentes superíndices reflejan diferencias significativas entre las medias ($p < 0.05$) entre los grupos de comparación

Cuadro 5. Proporciones de alelos paternos/maternos y genotipos de riesgo (por frecuencia en relación a los controles) de acuerdo al IDS para el HLAII DRB1-DQA1-DQB1 en los pacientes con LES, Chihuahua 2005

Riesgo ^a	IDS ^b n(%)		
	Positivo	p ^c	Negativo
HLAII_{DRB1}			
Alelos paternos 1, 3, 7			
Sí	16 (45.7)	0.91	20 (44.4)
No	19 (54.3)		25 (55.6)
Alelos maternos 3			
Sí	4 (11.4)	0.79	6 (13.3)
No	31 (88.6)		39 (86.7)
Genotipos 1-1, 4-3, 7-13			
Sí	3 (8.6)	0.10	10 (22.2)
No	32 (91.4)		35 (77.8)
HLAII_{DQA1}			
Alelos maternos 301			
Sí	7 (20.0)	0.48	12 (26.7)
No	28 (80.0)		33 (73.3)
Genotipos 101-101, 301-301			
Sí	8 (22.9)	0.86	11 (24.4)
No	27 (77.1)		34 (75.6)
HLAII_{DQB1}			
Alelos paternos 201, 501			
Sí	19 (54.3)	0.63	22 (48.9)
No	16 (45.7)		23 (51.1)
Genotipos 201-201, 201-301, 201-602, 501-501			
Sí	13 (37.1)	0.88	16 (35.6)
No	22 (62.9)		29 (64.4)

^a Se consideraron alelos/genotipos de riesgo a aquellos con una frecuencia mayor en pacientes con LES que en controles sin LES

^b Se considera positivo cuando el puntaje de IDS es ≥ 1 y negativo cuando es igual a 0

^c Prueba de χ^2 de Pearson (>5 en todas las celdas) o exacta de Fisher (≤ 5 en alguna celda)

El Cuadro 6 presenta la comparación para los puntajes medios de IDS para los alelos y genotipos HLAII DRB1, DQA1, and DQB1 según la mayor frecuencia de estos en pacientes con LES y con puntajes iguales o mayores a 5.

HOJA SIGUIENTE

Cuadro 6. Puntaje medio y desviación estándar del índice de daño SLICC/ACR (IDS) por alelos paternos/maternos y genotipos de riesgo (los de mayor frecuencia entre pacientes con LES con puntajes ≥ 1.5) para el HLAII DRB1-DQA1-DQB1, Chihuahua 2005

Riesgo ^a	IDS ^b			min- máx
	n	Media \pm d.e.	p	
HLAII_{DRB1}				
Alelos paternos 3, 14				
Sí	11	3.09 \pm 4.25	0.002	0-14
No	66	0.97 \pm 1.34		0-5
Alelos maternos 1, 7, 8, 14				
Sí	32	1.88 \pm 2.76*	0.035	0-14
No	45	0.84 \pm 1.38*		0-6
HLAII_{DQA1}				
Alelos paternos 401				
Sí	9	3.89 \pm 4.16	0.000	0-14
No	68	0.93 \pm 1.40		0-6
Alelos maternos 401				
Sí	16	2.63 \pm 3.63	0.003	0-14
No	61	0.92 \pm 1.33		0-5
Genotipos 101-401, 401-401				
Sí	10	3.60 \pm 4.27	0.000	0-14
No	67	0.93 \pm 1.31		0-5
HLAII_{DQB1}				
Alelos paternos 301, 501				
Sí	20	1.80 \pm 1.67	0.19	0-5
No	57	1.09 \pm 2.23		0-14
Alelos maternos 201, 402, 501, 604				
Sí	40	1.73 \pm 2.63	0.05	0-14
No	37	0.78 \pm 1.22		0-4
Genotipos 201-201, 301-402				
Sí	13	2.69 \pm 4.00	0.007	0-14
No	64	0.98 \pm 1.36		0-5

^a Se consideraron alelos/genotipos de riesgo a aquellos pacientes con LES con puntajes de IDS mayores 1.5 y con ≥ 5 observaciones por alelo o ≥ 4 por genotipo

^b Diferentes superíndices reflejan diferencias significativas entre las medias ($p < 0.05$) entre los grupos de comparación; se usó la prueba de t de student

Cuadro 7. Proporciones de alelos paternos/maternos y genotipos de riesgo de acuerdo al IDS (los de mayor frecuencia entre pacientes con LES con puntajes ≥ 1.5) para el HLAII DRB1-DQA1-DQB1, Chihuahua 2005

Riesgo ^a	IDS ^b n(%)		
	Positivo	p ^c	Negativo
HLAII_{DRB1}			
Alelos paternos 3, 14			
Sí	6 (17.1)	0.53	5 (11.9)
No	29 (82.9)		37 (88.1)
Alelos maternos 1, 7, 8, 14			
Sí	18 (51.4)	0.10	14 (33.3)
No	17 (48.6)		28 (66.7)
HLAII_{DQA1}			
Alelos paternos 401			
Sí	7 (20.0)	0.07	2 (4.8)
No	28 (80.0)		40 (95.2)
Alelos maternos 401			
Sí	10 (28.6)	0.12	6 (14.3)
No	25 (71.4)		36 (85.7)
Genotipos 101-401, 401-401			
Sí	7 (20.0)	0.17	3 (7.1)
No	28 (80.0)		39 (92.9)
HLAII_{DQB1}			
Alelos paternos 301, 501			
Sí	13 (37.1)	0.04	7 (16.7)
No	22 (62.9)		35 (83.3)
Alelos maternos 201, 402, 501, 604			
Sí	21 (60.0)	0.19	19 (45.2)
No	14 (40.0)		23 (54.8)
Genotipos 201-201, 301-402			
Sí	7 (20.0)	0.50	6 (14.3)
No	28 (80.0)		36 (85.7)

-
- ^a Se consideraron alelos/genotipos de riesgo a aquellos pacientes con LES con puntajes de IDS mayores 1.5 y con ≥ 5 observaciones por alelo o ≥ 4 por genotipo
- ^b Se considera positivo cuando el puntaje de IDS es ≥ 1 y negativo cuando es igual a 0
- ^c Prueba de χ^2 de Pearson (>5 en todas las celdas) o exacta de Fisher (≤ 5 en alguna celda)

En la mayor parte de los alelos y genotipos evaluados se observó un puntaje de IDS promedio estadísticamente mayor que en el resto de los pacientes sin dichos alelos/genotipos. Entre ellos se incluyen los haplotipos HLADRB1 3 y 14 paterno, el 1, 7, 8 y 14 maternos, para HLAI-DQA1 el 401 paterno y materno, y para DQB1 los 301 y 501 paternos, los 201, 402, 501 y 604 materno. Los genotipos con mayor riesgo incluyen el 101-401, 401-401 para el HLAI-DQA1 y el 201-201 y 301-402 para el HLAI-DQB1.

Cuando la información se presenta como proporciones, se observaron varias diferencias significativas, incluyendo los alelos paternos 401 para el HLAI-DQA1, y los haplotipos paternos 301 y 501 para el HLAI-DQB1. Finalmente, el Cuadro 8 presenta un modelo de regresión lineal con el puntaje de IDS como variable dependiente y dos alelos y la suma de criterios para LES como variables independientes significativas en el modelo final. Estas tres variables explicaron cerca del 30% de la variabilidad del IDS. Los alelos seleccionados fueron el HLAI-DRB1 paterno 3 y 14, y el HLAI-DRA1 paterno 401.

Cuadro 8. Modelo de regresión lineal con puntaje de IDS como variable dependiente y alelos seleccionados como variables independientes^a, Chihuahua 2005

Modelo	Coefficiente	p (prueba de wald)
HLAII-DRB1 paterno 3 y 14	1.51	0.014
HLAII-DQA1 paterno 401	2.45	0.000
Suma de criterios para LES	0.24	0.05

$R^2 = 0.31$; R^2 ajustada = 0.28

^a El modelo inicial incluyó edad, sexo, estado civil, lugar de nacimiento y el resto de los alelos paternos y maternos identificados de riesgo, pero ninguna de estas variables fue significativa en el modelo final; no se incluyeron genotipos para evitar colinealidad con los alelos.

11.- DISCUSION

Índice de daño SLICC/ACR

El índice de daño SLICC/ACR (IDS) mide el daño acumulado que ha ocurrido desde el inicio del LES, resultando tanto de el proceso patológico o de sus secuelas. El daño por LES es definido como un cambio irreversible en un órgano o sistema que ha estado presente por al menos 6 meses. Las definiciones y determinantes del índice se basan principalmente en criterios clínicos o en exámenes de laboratorio y gabinete ampliamente disponibles, por lo que este puntaje puede ser evaluado en instituciones convencionales. El IDS documenta el daño ocurrido a 12 órganos o sistemas corporales desde el inicio del LES. Cualquier afección puede ser la consecuencia de la actividad del LES, de la terapia, de una proceso co-mórbido, o de cualquier combinación entre estas. El IDS ha mostrado ser un índice válido, confiable y reproducible; la variabilidad interobservador en estudios con diferentes médicos y en varios países es poca. (Dayal 2002, Gladman 1997)

El daño puede presentarse tanto en pacientes con enfermedad activa como en los que se encuentran en remisión ya que la evolución puede ser silenciosa, principalmente en daño ocular (cataratas), cardiovascular (hipertensión arterial sistémica), esquelético (osteoporosis con fracturas vertebrales)

El LES tiene un curso y pronóstico muy variable, depende principalmente de varios factores, entre los que destacan: el sexo (femenino), la edad de inicio (entre 20 a 40 años de edad), la etnicidad (mas grave en negros y en mestizos hispánicos) (Katie, 2009), el tiempo en el que se tarde en realizar el diagnostico de la enfermedad, la duración de la misma, el inicio , la respuesta del paciente al tratamiento, así como al inicio de la medicación adecuada.

Afortunadamente a partir de 1950, se encuentra mejoría progresiva, ya que la mitad de los enfermos morían antes de cumplir 5 años de

evolución (Merrel, 2005) y hasta la fecha ido aumentando la supervivencia debido a la existencia de mejores opciones terapéuticas, según se evidencia en varios estudios en los que se utilizan curvas de supervivencia (Bernatzky ,2006).a la fecha alrededor del 93% alcanzan una sobrevivencia arriba de 10 años. (Uramoto 2006).

En México , en un estudio realizado el 96% alcanzaron una supervivencia en 667 pacientes a 5 años, una vez que cursaron con el primer síntoma y solo el 8% fallecieron después de 10 años de evolución de la enfermedad(Drenkard, 1994) .

En el estudio GLADEL, en el que se estudiaron 1,214 pacientes de diversos países de Latinoamérica (Pons 2002), se encontró una sobrevida a los 5 años, después del inicio de la enfermedad hasta de un 95%. Dichos pacientes fueron en su mayoría afroamericanos e hispanos que vivían en Alabama y en diversas ciudades de Texas

La sobrevida es similar a la que se alcanza en centros hospitalarios de Norteamérica, Europa y Asia (Pistiner, 1991; Abu-Shakra M, 1995; Stahl-Hallengren, 2000).

El aumento en la esperanza de vida a partir de la segunda mitad del siglo XX, es debido probablemente a diversas causas entre las que se encuentran: que se sabe más sobre él LES(se aplican mas tempranamente los criterios diagnósticos),se utiliza cada vez con más frecuencia por los médicos el conocimiento sobre las características de presentación de la enfermedad y por ende determinar si el paciente cursa con una forma leve, moderada o severa ; y de esta manera tomar la decisión más acertada de indicar el tratamiento idóneo de manera individual

El recurso de mejores medicamentos en instituciones de salud pública y privada.

La detección temprana de condiciones mórbidas concomitantes como: infecciones, dislipidemias, estados de hipercoagulabilidad, detección de

pacientes que requieren diálisis, hemodiálisis y trasplante renal.

(Drenkard, 1994)

En la mayoría de los estudios que se han analizado a la fecha donde se determina el índice SLICC/ACR ID, han sido en pacientes captados de la Consulta Externa de Hospitales que tienen servicio de Reumatología, en los cuales han sido tratados y seguidos a lo largo del tiempo de su enfermedad por especialistas capacitados para ello; quizá esta sea la causa de que se encuentren puntajes bajos de SLICC siendo el promedio 2.1.

Esto a pesar de haberse realizado estudios de cohortes donde participan grupos de diversos países del mundo, el sesgo de selección sigue siendo el mismo (en Hospitales que tienen servicios de Reumatología y/o Inmunología) como ejemplo el grupo GLADEL Multinacional Latino Americano prospectivo, donde se analizaron 1,214 pacientes con LES, aportados por:

Argentina, Brasil, Colombia, Cuba, Chile, Guatemala, México, Perú y Venezuela (Pons 2004).

En la tesis por eso encontramos bajos índices de daño SLICC/ACR DS porque presenta el mismo sesgo de selección que los estudios reportados encontrados a la fecha.

Este grupo de pacientes analizados están relativamente bien tratados ya que a pesar de que muchos de ellos tienen una evolución mayor de 10 años tienen poco o nulo daño secundario al LES, al tratamiento, a comorbilidad o a la idiosincrasia.

Otra posible causa de bajos índices de daño SLICC/ACR DS encontrados en nuestro estudio pudiera ser subestimada ya que algunas evaluaciones pueden interferir el criterio del observador como la alopecia crónica, la claudicación por más de 6 meses, atrofia muscular; sin embargo, en varios estudios está demostrado que la variación inter observador es prácticamente nula, es por esto que es un instrumento de medición

idóneo para determinar daño en LES por ese motivo continua vigente (Doria 2006)

Elegí esta problemática porque en él LES, el diagnóstico de la enfermedad es cada vez más temprano, en aquellos pacientes que pueden acceder a un servicio médico con servicio de Reumatología y por ende a exámenes de laboratorio y gabinete que puedan confirmar el diagnóstico e inicio de tratamiento. Con esto ha mejorado la supervivencia y en parte la calidad de vida.

Sin embargo, la población de pacientes estudiados en esta tesis precisamente reúne las características de peor pronóstico de comorbilidad estudiados en diversas partes del mundo (Pons, 2004); a pesar de el sesgo de selección ya anteriormente mencionado (grupo de pacientes provenientes de la consulta externa de Reumatología) como son: el sexo el 87.2% son mujeres, el 93.6% inicio su enfermedad antes de los 40 años es precisamente en este rango de edad el intervalo de mayor frecuencia (Wallace 2002); es un grupo hispánico mestizo, con nivel socio-económico bajo, nivel de escolaridad la mayoría de 6 años, automedicación, acceso esporádico a la consulta reumatológica (Paula, 2009); características ambientales propicias para influir en actividad y daño de la enfermedad (exposición al sol, ya que Chihuahua es una zona semidesértica con clima extremoso, que en época de primavera y verano se puede llegar a los 45 grados, esto puede ocasionar desnaturalización de las proteínas epidérmicas y expresar neo antígenos que pueden expresar formación de autoanticuerpos contra células de la piel y ocasionar manifestaciones mucocutáneas severas como son panniculitis, alopecia crónica, lupus cutáneo subagudo, y en época de otoño-invierno la temperatura puede disminuir hasta -5 grados centígrados y puede ocasionar fenómeno de Raynaud severo, de este modo evolucionar ha necrosis de dedos con pérdida importante de dedos) (Brooks, 2002, Wallace, 2001, Paula, 2009)

Por todo lo anterior, esperaba alcanzar un puntaje alto de SLICC/ACR ID con puntajes arriba de 6 en la mayoría de los pacientes.

Sin embargo, el puntaje de SLICC/ACR ID, afortunadamente fue menor a lo supuesto ya que únicamente el 22% curso con índice de SLICC/ACR ID de 0

La población que creo que pudiera ser ideal para encontrar mayor índice de daño, son aquellas regiones rurales, suburbanas, o indígenas donde el nivel socioeconómico es extremadamente bajo en nuestro país o en nuestro estado de Chihuahua.

En esas poblaciones donde aun no se ha detectado la enfermedad y ha seguido la evolución natural de la misma, qué no han recibido tratamiento o que han llevado un tratamiento inadecuado. Poblaciones de riesgo; que sean mujeres que inicien la enfermedad entre los 20 y los 40 años, con un nivel socioeconómico ya mencionado, con baja escolaridad o nula.

En la tesis por eso encontramos bajos índices de daño SLICC/ACR DS porque presenta el mismo sesgo de selección que los estudios reportados encontrados a la fecha.

Este grupo de pacientes analizados están relativamente bien tratados ya que a pesar de que muchos de ellos tienen una evolución mayor de 10 años tienen poco daño secundario al LES, al tratamiento, a co-morbilidad o a la idiosincrasia.

Otra posible causa de bajos índices de daño SLICC/ACR DS encontrados en nuestro estudio pudiera ser el puntaje subestimado ya que algunas evaluaciones puede interferir el criterio del observador como la alopecia crónica, la claudicación por más de 6 meses, atrofia muscular; sin embargo en varios estudios está demostrado que la variación inter observador es prácticamente nula, es por esto que es un instrumento de medición idóneo para determinar daño en LES por este motivo continua vigente (Doria 2006)

El 22% tuvo un puntaje de 1 y el 78% fue de 0 (sin daño).

Para mí era importante definir en este grupo de pacientes el daño irreversible encontrado, para así de esta manera, en la medida de lo posible prevenir en otros pacientes posteriores que estén a mi cargo y poder ofrecerles un mejor futuro, mejorando su calidad de vida disminuyendo el impacto de la misma.

Se me ocurre que creando nuevos instrumentos de medición específicos reuniendo de manera global el entorno físico, genético, mental, social, laboral, emocional, que puedan ser aplicados en la consulta diaria reumatológica.

En esta tesis falto realizar un estudio piloto para evaluar los resultados en un grupo pequeño para así haberlos analizado y darme cuenta del bajo puntaje SLICC/ACR DS, que hay en este grupo de pacientes para así tener la posibilidad de modificar la pregunta de investigación

12.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Abu-Shakra M, Urowitz MB, Gladman DD, Gough J. Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center –II Predictor variables for mortality. *J Rheumatol* 1995; **22**: 1265-1270
- 2.-Alarcon-Segovia D, Molina J, et al. Tratado Hispanoamericano de Reumatología. Editorial Nomos. S.A. Bogota, 2007; 2: 755-779
- 3.-Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease. *Science* 2008 322; 881-888
- 4.-Brooks WH. Systemic lupus erythematosus and related autoimmune diseases a re antigen-driven, epigenetic diseases. *Med Hypotheses* 2002; 59: 736-41
- 5.-C Dayal NA, Gordon C, Tucker L, Isenberg DA. The SLICC Damage Index: past, present and future. *Lupus* 2002; **11**:261-265
- 6.-Bujan S, Ordi-Ros J, Paredes J, Mauri M, Matas L, Cortes J et al. Contribution of the initial features of systemic lupus erythematosus to the clinical evolution and survival of a cohort of Mediterranean patients. *Ann Rheum Dis* 2003; 62 (9): 859-865.
- 7.-Calvo-Allen J, Reveille JD, Rodríguez-Valverde G, McGwin G, Jr., Baethge BA, Friedman AW et al. Clinical, Immunogenetic and outcome features of Hispanic systemic lupus erythematosus patients of different ethnic ancestry. *Lupus* 2003; 12(5):377-385
- 8.-Celada A, Barras C, Benzonana G, Jeannet M. Increased frequency of HLADRw3 in SLE. *Tissue Antigens* 1980; 15: 283-288
- 9.-Cohen A, Reynolds W, Franklin E. Preliminary criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Bull Rheum Dis* 1971; **21**:643-648
- 10.-Cooper GS, Dooley MA, Treadwell, et al. Risk factors for development of systemic lupus erythematosus: allergies, infections, and family history. *J Clin Epidemiol* 2002; **55**:982-9
- 11.-Crow MK. Interferon-alpha: a new target for therapy in systemic lupus erythematosus? *Arthritis Rheum* 2003; **48** (9): 2396-2401
- 12.-Donnelly P. Progress and challenge in genome-wide Association studies in humans. *Nature* **456**: 728-731
- 13.-Doria A, Laccarino L, Chirardello A, Zamperi S, Annetti S, et al. Long-Term survival of southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus. A prospective study of all age groups. *Medicine (Baltimore)* 2005; **84**:218-224
- 14.-Dooley MA, Hogan SL. Environmental epidemiology and risk factors for autoimmune disease. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15: 99-103

- 15.-Drenkard C, Villa A, Alarcon-Segovia D,Perez-Vazquez M. Influence of the antiphospholipid syndrome in the survival of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1994; **21**:1067-1072
- 16.-Gladman DD, Urowitz MB, Goldsmith CH, Fortin P, Ginzler E, Gordon C, Hanly JG, Isenberg DA, Kalunian K, Nived O, Petri M, Sanchez-Guerrero J, Snaith M, Sturfelt G. The reliability of the Systemic Lupus International Collaborative Clinics/American College of Rheumatology Disease Index in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; **40**: 809-13
- 17,- Kelly JA, Moser KL, Harley JB. The genetics of systemic lupus erythematosus: putting the pieces together. *Genes Immun* 2002; 3 Suppl 1: S71-85.
- 18,. Kyttaris V, Tsokos G. Uncovering the genetics of systemic lupus erythematosus: implications for therapy. *Am J Pharmacogenomics*. 2003; **3**: 193-202.
- 19.-Li CF, He XH, Teng Q, Jiang ZF. Association of HLA-A, B, and DR haplotypes with genotype in Chinese children with systemic lupus erythematosus. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2003; 41: 422-5.
- 20,.Merrel M, Shulman L. Determination of prognosis in chronic diseases,illustrated by systemic lupus erythematosus. *J Chron Dis* 1955;1:12-32
- 21.-Moser KL, Gaffney P, Peterson E, Behrens T. Keys to unlocking the mysteries of rheumatic autoimmune disease. *Minn Med* 2004; **87**: 46-51.
- 22.-Mills JA. Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal of Medicine* 1994;330:1871-1879.
- 23.-Moser KL, Gaffney P, Peterson E, Behrens T. Keys to unlocking the mysteries of rheumatic autoimmune disease. *Minn Med* 2004; 87: 46-51.
- 24.-Moser KL, Gaffney P, Peterson E, Behrens T. Keys to unlocking the mysteries of rheumatic autoimmune disease. *Minn Med* 2004; 87: 46-51.
- 25.-Nambiar MP, Enyedy EJ, Warke VG, Krishnan S, Dennis G, Kammer et al.Polymorphism/mutations of TCR zeta-Chain mRNA promoter and 3' untranslated region. *J Autoimmun* 2001; 16 (2):133-142
- 26.-Ng PC, Levy S,Huang J, Stockwell TB,Wallenz BP,Li K.Axelrod N,et al.The diploid genome sequence of an individual human.*Plos Biol* 2008;4: e 1000160
- 27.-Petri M. Male lupus differs from female lupus in presentation and outcome. *Arthritis Rheum* 1997; 40(suppl): S162
- 28.-Pineau C, Lee C, Ramsey-Goldman R, Clarke A, Bernatzky S. The second hit; comorbidities in systemic lupus erythematosus. *Future Rheumatology*. 2007; 2: 497-506
- 29.-Pistiner M, Wallace DJ, Nessim S. et al. Lupus Erythematosus in the 1980s: a survey of 570 patients.*Semin Arthritis Rheumatism* 1991; **21**:55-64.

- 30.-Plenge RM,Cotsapas C, Davies L, aPrice AL,de Baker PI,Maller J, Pe'er I,et al. Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis.Nat Genet 2007; 39:1477-1482
- 31.-Pons-Estel B, Catoggio L, Cardiel M, Soriano E, Gentiletti S, Villa A, et al. The GLADEL Multinational Latin American prospective inspection cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus: Ethnic and disease heterogeneity among "Hispanics". Medicine 2004; **83**: 1-17.
- 32.-Gudlaug T , Kristiansdotii R.Genetic Variation and expression of the IRF5 gene in Autoimmune diseases. Acta Universitatis Upsaliensis Uppsala 2009 1-59
- 33.-Priori R, Medda E, Conti F, Cassara EA, Danieli MG, Gerli R et al. Familial autoimmunity as a risk factor for systemic lupus erythematosus and viceversa:a case-control study. Lupus 2003; **12**(10): 735-744.
- 34.-Reefman E, Dijstelbloem HM,Limburg PC,Kallenberg CG,Bijl M. Fcgamma receptors in the initiation and progression of systemic lupus erythematosus. Immunol Cell Biol 2003; **81**(5):382-389
- 35.-The International HapMap Project 2003; Nature **426**: 789-796
- 36.-Queiroz, RG,Tamia-Ferreira MC,Carvalho IF,Petean FC,Passos GA. Association between Eco Ri fragment-length polymorphism of the immunoglobulin lambda variable 8 (IGL V8)gene family with rheumatoid Arthritis and systemic lupus erythematosus. Braz J Med Biol Res 2001; 34 (4): 525-528
- 37.-Schur Ph,Meyer E, Garovoy M, Carpenter Cb. Association between SLE and the major Histocompatibility complex; clinical and immunological considerations. Clin Immunopathol 1982:1031-1040
- 38.-Stahl-Hallengren C, Jonsen A,Nived O,Sturfelt G. Incidence studies of systemic lupus erythematosus in Southern Sweden: increasing age,decreasing frequency of renal Manifestation and good prognosis. J Rheumatol 2000; **27**: 1884-1891.
- 39.-Shmerling RH,. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus-there before you Know it. N Engl J Med 2003; **349**(16): 936-940
- 40.-Sullivan K. The complex genetic basis of systemic lupus erythematosus. Genetic basis Htlm. January 15,2008.
- 41.-Swaak AJ,van den Brink,Smeenk RJ,Manger K,Kalden JR,Tosi S et al.Systemic lupus erythematosus.Disease outcome in patients with Disease duration of at least 10 years: second evaluation. Lupus 2001; 10 (1): 51-58.
- 42.-Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rotfiel NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982; 25: 1271-7

- 43.-Theofilopoulos AN, Koundouris S, Kono DH, Lawson BR. The role of IFN-gamma in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. *Arthritis Res* 2001; 3(3):136-141.
- 44.-Tsao BP. An update on genetic studies of systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 2002; 4: 359-67.
- 45.-Uramoto KM, Michet CJJ, Thumboo J, et al. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis Rheum* 1999, 42 46-50
- 46.-Uribe AG, Alarcon GS. Ethnic disparities in patients with systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 2003; 5 (5):364-369.
- Wallace Daniel. ***Textbook DuBois's Lupus Erythematosus***. Philadelphia.PA 1906
- Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953, 171: 737-738
- 47.-Van Loveren H, Vos JG, et al. Epidemiologic associations between occupational and environmental exposures and autoimmune disease: report of a meeting to explore current evidence and identify research needs. *Int J Hyg Environ Health* 2003; **203**: 483-495
- 48.-Yang Y, Chung EK, Zhou B, Lhotta K, Hebert LA, Birmingham DJ et al. The intricate role of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus. *Curr Dir Autoimmun* 2004; **7** : 98-132
-