

***UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA***

***Determinación de HLA clase II en
Pacientes Mexicanos con Pénfigo Vulgar.***

***Tesis de Postgrado
Para obtener el título de Especialista en
Dermatología
Presenta: Dra. Elba Lucía Rangel Gamboa***

México, D. F. 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AUTORIZACIONES

Director de Enseñanza, Dr. Francisco Javier Rodríguez Suárez

Director de Investigación, Dr. Simón Kawa Karasik

Jefe del Servicio de Dermatología, Dr. Luciano Domínguez Soto

Jefa de División de Enseñanza de Posgrado: Dra. Rita Valenzuela Romero

COLABORADORES

Dra. María Elisa Vega Memije

Dr. Julio Granados

Lic. Victor Acunha

AGRADECIMIENTOS

Gracias México

A tu gente quien me recibió en esta tierra de esperanza

A tu historia que nos enorgullece como latinoamericanos

A los aromas del maíz, el chile y el huitlacoche que cubren tu tierra

*Al son del Danzón, el mariachi y el bolero con los que palpitan los corazones
mexicanos.*

DEDICATORIA

A ti

Ana Isabel Teresa

Hija, amiga y compañera de mil batallas

Gracias

INDICE

1. RESUMEN	7
2. ANTECEDENTES	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS	14
4. ANALISIS ESTADÍSTICO	18
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSION	21
7. CONCLUSIONES	23
8. FIGURAS, TABLAS, GRAFICAS Y ANEXOS	24
9. BIBLIOGRAFIA	39

RESUMEN

Introducción: El pénfigo es una enfermedad ampollosa, autoinmune adquirida, que se presenta con la formación de ampollas flácidas que se rompen y dejan áreas de piel denudadas, caracterizada por la formación de anticuerpos IgG dirigidos contra las proteínas desmosomales, de estas la desmogleína 3 es característica del pénfigo vulgar (PV) y desmogleína 1 del pénfigo foliáceo (PF). Se ha estudiado la asociación con moléculas del MHC clase II en distintos grupos étnicos, judíos, españoles, japoneses, turcos y pacientes caucásicos, encontrándose asociación con HLA-DR4, HLA-DR14 y HLA-DR1.

Objetivo: Determinar las frecuencias génicas de los alelos HLA DR y sus variantes alélicas en pacientes mexicanos con pénfigo vulgar y foliáceo.

Material y Método: se realizó un estudio prospectivo, comparativo, abierto, observacional. *Universo de estudio:* Pacientes con diagnóstico de pénfigo clínico e histológico que acudieron de forma secuencial al Departamento de Dermatología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” del 1 febrero de 2006 al 30 mayo 2006. *Tipificación de genes HLA.* Se aisló DNA genómico a partir de células mononucleares de sangre periférica mediante la técnica de “salting-out”. La tipificación genética de HLA-DRB1 se realizó por el método de reacción en cadena de la polimerasa e hibridación con sondas específicas de secuencia (PCR-SSO). La amplificación se realizó por el método de la reacción en cadena de la polimerasa.

Resultados: Se incluyeron en el estudio 43 pacientes con diagnóstico de pénfigo clínico e histológico, 41 con PV (95.3 %) y 2 con PF (4.7 %). El rango de edad fue de 16 a 84 años al momento del estudio. 35 fueron mujeres (81.4%) y 8 fueron hombres (18.6%), presentando una relación hombre/mujer 4.37 a 1. La edad media al inicio de la enfermedad fue 44.26 ± 18.27 . Se encontró aumento en la frecuencia génica (fg) de los alelos HLA-DR14 y HLA-DR1 en los pacientes con pénfigo. Para el HLA-DR14 la fg fue de 0.232 con una p de 0.09 y confirmando un riesgo relativo de 2.2; en cuanto al HLA-DR1 la frecuencia encontrada fue de 0.104 con una p de 0.08 y un riesgo relativo de 3.3. **Conclusión:** La susceptibilidad para pénfigo parece ser parte de la susceptibilidad general para presentar una enfermedad autoinmune

ANTECEDENTES

Introducción

El pénfigo vulgar (PV) es una enfermedad autoinmune adquirida, caracterizada clínicamente por la presencia de ampollas flácidas que al romperse dejan áreas de piel denudada; en las cuales anticuerpos IgG dirigidos contra las proteínas desmosomales producen ampollas intraepiteliales; desmogleína 3 (Dsg 3) es el principal antígeno (figura # 1), pero de 50 a 60 % de los pacientes tienen anticuerpos adicionales contra desmogleína 1 (Dsg 1), el antígeno del pénfigo foliáceo (PF). El pénfigo se ha observado en todas las edades excepto en lactantes; predomina de los 30 a 60 años, en todas las razas. Afecta ambos sexos con discreto predominio en mujeres en una relación 1.6:1. La frecuencia varía de 0.5 a 3.2 por 100,000 habitantes por año. La mortalidad era de 75% antes de la introducción de los corticosteroides (CS) en 1950. Estudios diferenciales, de acuerdo con el fenotipo clínico, han mostrado una baja mortalidad en pacientes con PV predominantemente de las mucosas (1 a 17%), comparado con aquellos con la forma mucocutánea (34 a 42%)¹.

En México los datos epidemiológicos son comparables a los publicados en la literatura médica, sin embargo, se ha observado mayor prevalencia en adultos jóvenes en relación a lo observado en otras series².

El diagnóstico del PV se efectúa con los datos clínicos y con el estudio histológico de piel intacta perilesional o clínicamente no comprometida. La acantólisis suprabasal (figura # 2) y la formación de ampollas son altamente sugestivas de PV pero el diagnóstico debe ser confirmado por

inmunofluorescencia directa (IFD)³ donde se observa el depósito característico de IgG en el espacio intercelular de la epidermis. La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es menos sensible que la inmunofluorescencia directa pero puede ser de ayuda para el diagnóstico; si la biopsia es difícil como en el caso de niños o adultos que no cooperan. El análisis inmunoabsorbente enzimático (ELISA) permite mediciones directas de anticuerpos contra Dsg 1 y Dsg 3 en suero, ofreciendo ventajas sobre la IFI¹.

En relación al manejo terapéutico, la mayoría de los pacientes son tratados con corticosteroides sistémicos (CS), los cuales son efectivos. Los medicamentos adyuvantes como azatioprina⁴, ciclosporina⁵, ciclofosfamida^{6,7}, micofenolato de mofetilo^{8,9} e inmunoglobulinas^{10,11} se usan en combinación, con el objetivo de aumentar la eficacia y reemplazar la acción esteroidea, reduciendo la dosis de mantenimiento de los CS y sus efectos colaterales. Además las tasas de mortalidad y de remisión completa han mejorado desde la introducción de las drogas adyuvantes, en comparación con los controles históricos¹.

El objetivo inicial del tratamiento es inducir la remisión de la enfermedad. Éste debe ser seguido por un período de tratamiento de mantenimiento usando el mínimo de la dosis requerida para controlar la enfermedad en razón de minimizar los efectos colaterales. El último objetivo del tratamiento debería ser el manejo sin medicamentos y un estudio reciente reporta tasas remisión completa de 38%, 50% y 75% a los 3, 5 y 10 años del diagnóstico.

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC).

La regulación del sistema inmune es factible gracias a la participación de moléculas codificadas por numerosos genes, algunos de ellos localizados dentro de un sistema genético denominado MHC, el cual está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 y ocupa una región de 4,000 Kb¹² (figura 3).

El producto de los genes del MHC tiene como función participar en el reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T; este proceso es en cierta manera complejo y se lleva a cabo por medio del reconocimiento de determinantes antigénicos “*epitopes*” en asociación con un antígeno propio, el cual es expresado por los genes del MHC.

Existen tres clases de genes del MHC: los clase I, clase II y clase III, los dos primeros son codificados por el sistema HLA y el último codifica para componentes del complemento¹³. Estas moléculas funcionan como elementos de restricción, esenciales para el reconocimiento de los antígenos (tumORAles o virales) por los linfocitos T citotóxicos que expresan el marcador CD8¹⁴.

Los genes clase II se localizan en el extremo centromérico del brazo corto del cromosoma 6, dicha región incluye a los loci HLA-DR, DP y DQ, cada uno de ellos está constituido por las cadenas A y B que codifican para una cadena alfa de 33 Kd y otra beta de 28 Kd que dan lugar a la expresión de una glucoproteína dimérica llamada antígeno clase II. Estos antígenos se expresan sólo en los macrófagos, linfocitos T activados, T cooperadores, linfocitos B, células dendríticas, epiteliales y endoteliales.

Cada una de estas moléculas clase II presentan 2 cadenas alfa y 2 beta. La cadena beta es la más polimórfica, especialmente la beta 1, aunque en los DQ y los DP la cadena alfa si es polimórfica. Ambas cadenas se hallan insertadas en la membrana celular mediante un dominio transmembrana y tienen también una región intracitoplásmica (figura # 4). Los loci HLA- DRA1 y DRB1 codifican para los polipéptidos alfa y beta respectivamente los cuales forman una molécula madura de HLA-DR clase II. Los productos de los loci DQA1 y DQB1 forman la molécula DQ y los loci DPA1 y DPB1 codifican para la molécula DP. Los genes clase III se encuentran ubicados en una porción de 12 Kb entre los genes clase I y II dentro del MHC que se hereda como unidad genética conocida como “complotipo o haplotipo del complemento”. Cada complotipo codifica la síntesis de los factores del complemento C2, C4A y C4B de la vía clásica y el factor B de la vía alterna; intercalados entre los genes C4A y C4B se localizan dos genes que codifican para la expresión de la enzima 21 hidroxilasa, la cual hidroxila el carbono 21 en la biosíntesis del cortisol¹⁵. El HLA es el sistema genético más polimórfico del ser humano. Hasta la fecha se han identificado claramente 158 antígenos HLA a nivel de la proteína: 27 HLA-A; 59 HLA-B; 10 HLA-C; 21 HLA-DR; 9 HLA-DQ y 6 HLA-DP. A nivel del DNA este polimorfismo es aún más elevado por ejemplo del gen HLA-A2 existen 17 variantes (A*0201-A*0217) y del HLA-B35 en México existen 16 variantes (B*3501-B*3516) a nivel de la secuencia de nucleótidos^{16,17}.

En relación a la nomenclatura un antígeno se identifica por la letra del locus y un número (p. Ej., A1, B51, Cw8, DR4, etc). Un alelo se identifica por la letra del locus un asterisco y un número (p. Ej., A*0101, B*0501, Cw*0401, DRB1*0401, etc)¹⁸.

Los genes del HLA se heredan en forma codominante, de tal forma que cada haplotipo está constituido mitad transmitido por la madre y la otra mitad por el padre. Se desconoce el mecanismo que dio lugar a este extenso polimorfismo, por lo que se han propuesto dos hipótesis que tratan de explicarlo. La primera es la de “deriva aleatoria”, la cual explica que el polimorfismo se debe a las variaciones al azar de una estructura genética básica y que dicha variación tiene una cierta frecuencia dentro de una población determinada. La segunda de “selección natural” la cual propone que existe selección de los genes polimórficos sobre los monomórficos. Es probable que ambos mecanismos participen en el desarrollo del polimorfismo que caracteriza a los genes del MHC. La trascendencia del micropolimorfismo es que le confiere a la especie un enorme repertorio de elementos de reconocimiento para la gran variedad de antígenos ambientales y, por lo tanto una gran diversidad en la capacidad para activar respuestas inmunitarias contra los patógenos que podrían acabar con la especie, dando así, una ventaja selectiva¹⁹.

HLA y pénfigo

Tempranamente en 1973 Krain y colaboradores reportaron que en judíos, el PV se encontraba asociado al antígeno leucocitario HLA-A10²⁰. La asociación con el HLA-A10 también se observó en pacientes japoneses²¹. En un estudio subsecuente en un grupo de pacientes judíos se observó aumento significativo de la frecuencia del haplotipo HLA-A26-B38²². Estudios posteriores mostraron que el haplotipo asociado en judíos con PV es HLA B38, **DRB1*0402** y DQB1*0302 o HLA B35, DRB1***0402** y DQB1*0302^{23,24}.

Pacientes con PV tanto Judíos como españoles poseen haplotipos **DRB1*0402** y **DQ*0302**. Esto se explica por la cercanía geográfica, el contacto por cientos de años y la conversión de judíos españoles al cristianismo. En ambos grupos además de los genes HLA clase II, existen probablemente genes clase I que se encuentran asociados con la patogénesis del PV²⁵.

La prevalencia de PV en hispanos en Nuevo México es aproximadamente 4 veces mayor que en no hispanos y cercana a la de judíos Asquenazí. Una explicación para esto es sugerida por estudios que revelan la existencia de población judía criptogénica; en el sudeste de Estados Unidos, cuyos ancestros huyeron de la inquisición de España y Portugal en los siglos XV y XVI. En el estudio en Nuevo México se encontró **DR4**, **DQ3** en 75% de los pacientes hispanos con PV, en 83% de pacientes hispanos con ancestros judíos conocidos o presumidos, la mayoría de estos con el subtipo **DRB1*0402**. En contraste se encontró **DRB1*0402** en 92.39% de los judíos Asquenazí con PV²⁶.

En el caso de los pacientes mexicanos, en estudio realizado en nuestro servicio, se encontró que el HLA-**DR14 (DR6)** es más común en los pacientes con pénfigo, sobre todo pénfigo vulgar, con respecto a la población sana control, en la literatura universal **DR4** ha sido encontrado con mayor frecuencia tanto en pacientes judíos como no judíos. En nuestro servicio el **DR4** se encontró en 14 pacientes de 18, ocupando el segundo lugar en frecuencia absoluta, sin embargo al comparar la frecuencia génica con la población general la p no fue significativa²⁷.

Por otra parte el **HLA-DRB1*0101** representa un riesgo relativo mayor para el desarrollo de pénfigo foliáceo en la población mexicana^{12,28}.

En cuanto a las variantes alelicas del DR y DQ para el pénfigo vulgar aun no han sido estudiadas en México.

MATERIAL Y METODOS

Tipo de estudio: casos y controles. Se diseñó este estudio considerando la baja prevalencia del pénfigo, así como para establecer la asociación entre marcadores HLA clase II y el desarrollo de la enfermedad en pacientes mexicanos.

Se estudiaron 43 pacientes con diagnóstico de pénfigo clínico e histológico, que acudieron de forma secuencial, ya fuese de primera vez o subsecuentes al Departamento de Dermatología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” del 1 febrero de 2006 al 30 mayo 2006.

Para ser elegible para su inclusión en este estudio, cada paciente debía contar con diagnóstico clínico e histopatológico de pénfigo vulgar, tener entre 16 y 85 años de edad al momento del estudio, y otorgar el consentimiento informado por escrito (anexo #1).

Por otra parte los controles pertenecen a la base de datos de HLA en personas sanas del Dr. Julio Granados adscrito al servicio de Reumatología e Inmunología del Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas Dr. Salvador Zubirán, estos controles cumplen con la condición de ser Mexicanos sin diagnóstico de pénfigo (tabla # 1).

Por otra parte el **HLA-DRB1*0101** representa un riesgo relativo mayor para el desarrollo de pénfigo foliáceo en la población mexicana^{12,28}.

En cuanto a las variantes alelicas del DR y DQ para el pénfigo vulgar aun no han sido estudiadas en México.

MATERIAL Y METODOS

Tipo de estudio: casos y controles. Se diseñó este estudio considerando la baja prevalencia del pénfigo, así como para establecer la asociación entre marcadores HLA clase II y el desarrollo de la enfermedad en pacientes mexicanos.

Se estudiaron 43 pacientes con diagnóstico de pénfigo clínico e histológico, que acudieron de forma secuencial, ya fuese de primera vez o subsecuentes al Departamento de Dermatología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” del 1 febrero de 2006 al 30 mayo 2006.

Para ser elegible para su inclusión en este estudio, cada paciente debía contar con diagnóstico clínico e histopatológico de pénfigo vulgar, tener entre 16 y 85 años de edad al momento del estudio, y otorgar el consentimiento informado por escrito (anexo #1).

Por otra parte los controles pertenecen a la base de datos de HLA en personas sanas del Dr. Julio Granados adscrito al servicio de Reumatología e Inmunología del Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Médicas Dr. Salvador Zubirán, estos controles cumplen con la condición de ser Mexicanos sin diagnóstico de pénfigo (tabla # 1).

No se excluyeron pacientes del estudio ya que todos permitieron la toma de la muestra, y accedieron a firmar la hoja de consentimiento informado.

En todas las muestras se pudo obtener el ADN necesario para realizar la tipificación de los alelos.

El tamaño de la muestra se calculó por la fórmula para cálculo de dos proporciones.

$$N = \frac{2 \bar{P} \bar{Q} (z\alpha + z\beta)^2}{\Delta^2}$$

Al sustituir con los valores adecuados y despejar la formula se obtuvo 15.07 como tamaño de muestra para que el estudio fuese significativo desde el punto de vista estadístico (anexo # 2).

Variables

Variable Independiente: genes HLA clase II.

Variable dependiente: pénfigo vulgar o foliáceo

Variables universales: sexo, edad, raza, ascendencia.

Definición conceptual de las variables

Genes del HLA clase II: Localizados en el brazo corto del cromosoma 6 hacia la posición centromérica. Se determinarán los loci DRB1. Se medirán como presente o ausente para cada DR específico.

Pénfigo vulgar: enfermedad ampollosa que afecta piel o mucosas (figura # 5 y 6) , más frecuentemente la mucosa oral, de origen autoinmune caracterizada por la presencia clínica de ampollas flácidas y erosiones, histológicamente se observan ampollas suprabasales, con patrón en panal de abejas en la inmunofluorescencia directa y presencia de inmunoglobulinas tipo IgG contra la desmogleína 3.

Pénfigo foliáceo: enfermedad ampollosa que afecta piel, nunca afecta las mucosas, de origen autoinmune, caracterizada por la presencia de erosiones con predominio en áreas seborreicas, en la histología se observan ampollas intraepidérmicas subcórneas y presencia de IgG circulante contra desmogleína 1.

Procedimientos.

El estudio se realizó en el Servicio de Dermatología del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, en donde se invitó a participar a todos los pacientes entre 16 y 60 años al momento del estudio, que cumplieran los criterios de inclusión, de quienes se consignó el nombre, sexo, edad, origen, antecedentes personales y familiares así como el tipo de pénfigo, sus hábitos dietéticos y las complicaciones sufridas durante el curso de su enfermedad (hoja de captura de datos). Se realizó examen físico completo, cuantificación del peso

y signos vitales. Se tomaron 5cc de sangre periférica que se depositaron en un tubo con anticoagulante EDTA, previa autorización por escrito.

Las muestras se procesaron en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición para la extracción del ADN y tipificación de los alelos del HLA clase II.

Tipificación de genes HLA

Se aisló DNA genómico a partir de células mononucleares de sangre periférica mediante la técnica de “salting-out”²⁹. La tipificación genética de HLA-DRB1 se realizó por el método de reacción en cadena de la polimerasa e hibridación con sondas específicas de secuencia (PCR-SSO), mediante el equipo Dynal PCR-SSO (Hoffman La-Roche). La amplificación se realizó por el método de la reacción en cadena de la polimerasa con 0.125 U/ul de Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, WI).

La información de los oligonucleótidos y de las sondas que se utilizaron se tomaron de las especificidades para DR y DQ publicadas en el 12° Taller Internacional de Histocompatibilidad.

Se asignaron a los pacientes números en el estudio en forma secuencial, al ser considerados como elegibles para su inclusión. Dicho número se incluyó en la hoja de captura de datos.

Hoja de captura de datos.

Ver anexo # 3

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó estadística descriptiva para el análisis de los datos epidemiológicos.

Se realizó el cálculo de frecuencias génicas a partir de la frecuencia de cada gen o alelo respecto al total de $2N$ (uno del padre y otro de la madre). Lo anterior se aplicó a cada locus del HLA. El análisis de asociación de la frecuencia de cada alelo del HLA se realizó mediante tablas de contingencia de 2×2 y se aplicó la prueba de χ^2 cuadrada; si existían frecuencias menores de 5, se calculaba la probabilidad con la prueba exacta de Fisher. La fuerza de asociación en las tablas 2×2 se determinó con la Razón de Momios (RM), en la cual una cifra mayor de 1 es asociación positiva o de susceptibilidad y menor de 1 es negativa o de protección. El método de regresión logística se usó para el ajuste por variables confusoras.

RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio 43 pacientes con diagnóstico de pénfigo por clínica y confirmado por el estudio histopatológico, 41 de estos con pénfigo vulgar (95.3 %) y 2 con pénfigo seborreico (4.7 %). El rango de edad fue de 16 a 85 años al momento del estudio, el media de edad fue 44.26 tomando la edad a la fecha del diagnóstico de pénfigo, con una desviación estándar de 18.27 (grafico # 1)

De estos pacientes 35 fueron mujeres (81.4%) y 8 fueron hombres (18.6%), presentando una relación hombre- mujer 4.375 a 1 . La edad media al inicio de la enfermedad fue 44.26 ± 18.27

En todos los pacientes se realizó extracción de ADN y se determinó el HLA-DR

Dos pacientes presentaron enfermedad dermatológica asociada, un paciente con psoriasis y otro con hiperqueratosis palmoplantar adquirida.

Una paciente tenía el diagnóstico de esclerosis múltiple en control.

Se interrogaron posibles factores desencadenantes sin encontrarse relación alguna entre el inicio del pénfigo vulgar o foliáceo y factores ambientales.

En cuanto al lugar de origen, la mayoría de nuestros pacientes eran oriundos del D.F, 25 (69.44%), el resto pertenecían a los estados circunvecinos:

estado de México 3, Guanajuato y Veracruz con 2 pacientes cada estado y Guerrero, Puebla, Zacatecas y Michoacán con un paciente por cada estado (grafico # 2).

Se interrogó la procedencia de padres encontrándose que el 31.14% procedían del D:F, 13.11% Guanajuato, Oaxaca 9.83%, Estado México 9.83%, Michoacán 6.56%, Puebla 8.19%, Guerrero 3.27%, y el 18.02% restante pertenecían a los estados de Morelos, Jalisco, Zacatecas, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Monterrey (grafico # 3). También se interrogó el lugar de procedencia de los abuelos con los siguientes resultados 19.38% del DF, 10.26% Estado México, 19.38% Guanajuato, 10.26% Hidalgo, 12,54% Michoacán, 13.68% Oaxaca, 12.54% Puebla, 31.92% otros estados de la república y 3 pacientes con abuelos de origen Europeo, Francia, Región de los Balcanes, (grafico # 4).

Al comparar las frecuencias génicas de HLA-DR de los pacientes con pénfigo con la población general se encontró un aumento en la frecuencia génica de los alelos HLA-DR14 y HLA-DR1 en los pacientes con pénfigo, siendo las diferencias significativas de acuerdo a los cálculos estadísticos.

Para el HLA-DR14 la frecuencia génica fue de 0.232 con una p de 0.09 y confiriendo un riesgo relativo de 2.2; en cuanto al HLA-DR1 la frecuencia encontrada fue de 0.104 con una p de 0.08 y un riesgo relativo de 3.3.

DISCUSIÓN

El estudio demuestra la asociación de pénfigo con los alelos **HLA-DRB1*14** y **HLA-DRB1*01**.

Estos resultados confirman lo reportado en estudios previos donde los alelos **HLA-DR4** (DR β *0402,*0406) y **DR14** (DR β 1*1401, *1405) confieren fuerte susceptibilidad para el desarrollo de pénfigo vulgar en diferentes grupos étnicos. En el presente estudio sólo se incluyeron 2 pacientes con pénfigo foliáceo; de acuerdo a un estudio previo en el servicio de Dermatología del Hospital Dr. Manuel Gea González se encontró asociación con el **HLA-DR1** en pacientes con pénfigo foliáceo. Por otra parte los alelos **HLA-DR β 1*04**, **DR β 1*14**, **DR β 1*01** se han asociado también al pénfigo foliáceo³⁰ y al fogo selvagem³¹ en otros estudios.

La aparición y progresión del pénfigo posiblemente depende de la interacción de varios factores, algunos conocidos otros aún por descubrir. Entre estos se encuentran factores genéticos que incluyen los alelos del HLA ya mencionados, así como otros genes en los tejidos afectados que podrían conferir mayor susceptibilidad, en el caso particular del pénfigo la expresión génica de los genes que codifican para las moléculas que regulan la expresión de las desmogleínas, como por ejemplo los receptores colinérgicos³².

Los individuos con predisposición genética para desarrollar pénfigo desarrollarán la enfermedad solo cuando uno o más factores adicionales estén presentes. La naturaleza de la mayoría de estos factores es actualmente desconocida. Sin embargo algunos medicamentos han sido identificados como

desencadenantes, penicilamina, captopril y rifampicina entre otros. Como algunos alimentos tienen una estructura química similar a los medicamentos identificados como causantes, también se han sugerido como posibles desencadenantes³³.

Inicialmente se había reportado HLA-DR4 en pacientes judíos Ashkenazi con pénfigo³⁴, sin embargo posteriormente se han reportado frecuencias génicas aumentadas en pacientes con pénfigo vulgar y foliáceo de los alelos **HLA-DR4, DR14 y DR1** en diversos grupos étnicos: caucásicos, japoneses³⁰, turcos³⁵, españoles²⁵; esto parece indicar que la asociación con estos alelos es independiente del grupo étnico.

En los últimos años se han publicado varios casos de transición de pénfigo vulgar a pénfigo foliáceo^{36,37} y viceversa, donde se documenta la transición clínica y serológica de los pacientes, de lo que hasta hoy se consideran dos entidades clínicas similares pero independientes; sin embargo, tomando en cuenta estos reportes y los estudios de HLA previamente comentados, podría tratarse de una misma enfermedad con un amplio espectro de presentaciones clínicas, yendo desde el pénfigo vulgar oral, sin afección a piel con IgG anti Dsg3, la variante mucocutánea con IgG contra Dsg3 y Dsg1, y el pénfigo foliáceo donde sólo se encuentra afección cutánea e IgG contra Dsg1.

Por otra parte estos alelos se han reportado en otras enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, esclerosis múltiple.

CONCLUSIÓN

Muchos estudios han confirmado la asociación entre artritis reumatoide y un numero restringido de alelos del locus altamente polimorfo HLA-DRB1, principalmente **DRB1*0401,*0404 y *0101**. Cada uno de estos alelos comparte secuencias homólogas en la tercera región hipervariable de la cadena β , lo que se ha denominado epítpe compartido³⁸.

Por lo anterior, planteamos la posibilidad de que exista un epítpe compartido para autoinmunidad y que la expresión de la enfermedad depende de la interacción con el medio, así como de otros determinantes genéticos aún por descubrir. Por tanto, la susceptibilidad para padecer pénfigo parece ser parte de una susceptibilidad más general para desarrollar autoinmunidad.

FIGURAS, TABLAS, GRAFICAS Y ANEXOS

Figura 1.
Uniones intercelulares “Desmogleínas” Modificada de Grant J
Anhalt, Making sense of antigens and antibodies in pemphigus.
J Am Acad Dermatol1999;40;7636

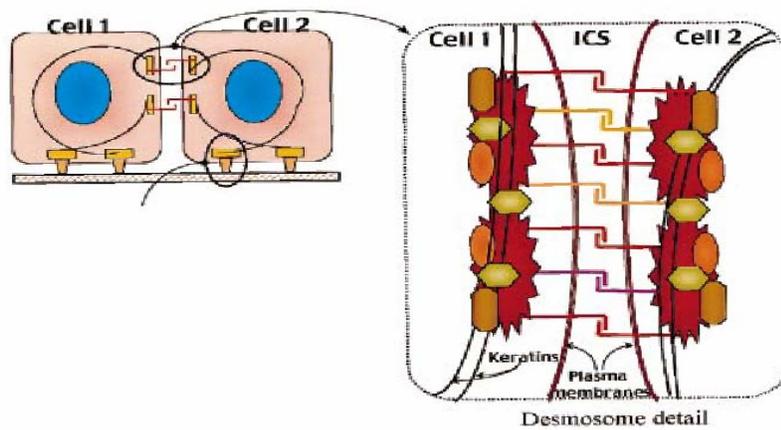


Figura 2.
Ampolla suprabasal (izquierda), Ampolla subcornea (derecha).
Fotos del archivo del Servicio de Dermatología del Hospital “Dr. Manuel Gea González”

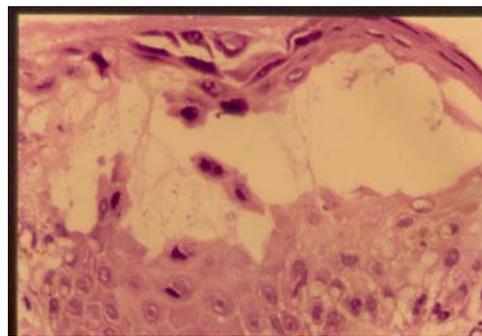


Figura. 3.
Localización y organización del complejo HLA en el cromosoma
6. Tomada de Jan Klein, Akie Sato. The HLA System. N Eng J
Med 343(10):702-9

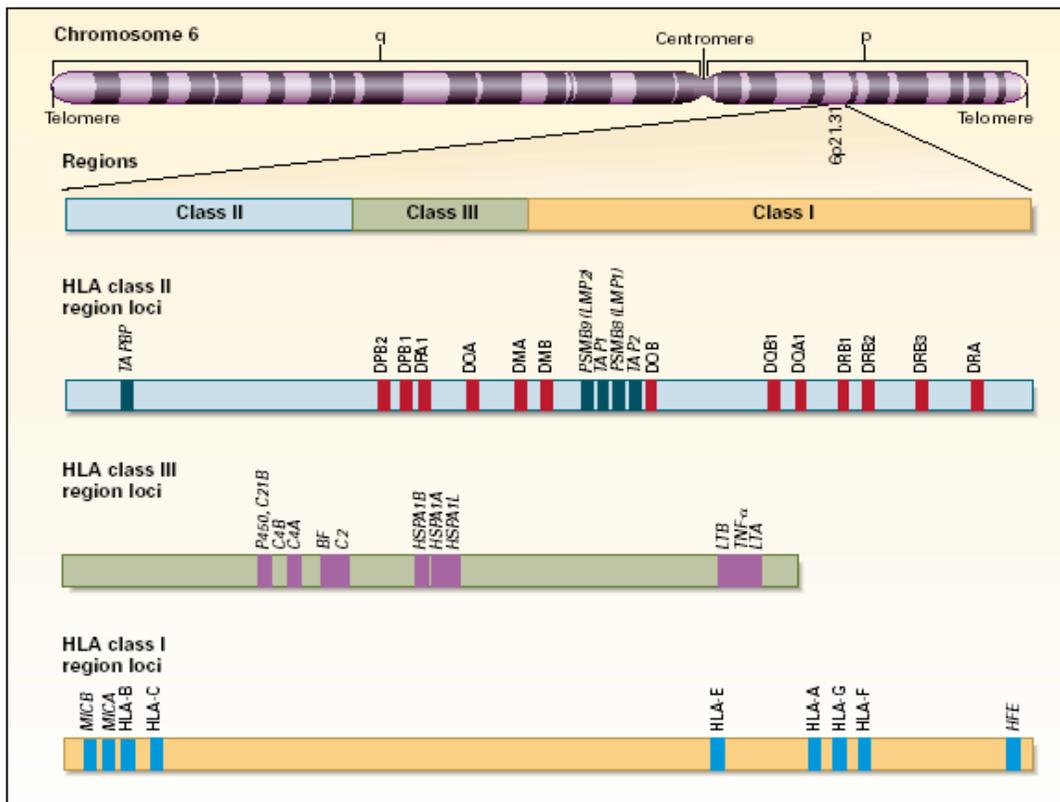


Figura 4.
Estructura de las moléculas clase I y clase II. Tomada de Jan Klein, Akie Sato. The HLA System. N Eng J Med 343(10):702-9

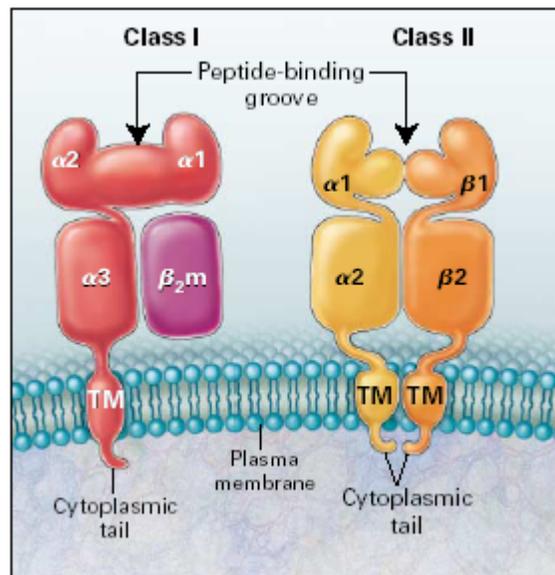


Figura 5.
Ampollas flácidas y erosiones, Paciente con PV. Fotos del
archivo del Servicio de Dermatología del Hospital “Dr. Manuel
Gea González”



Figura 6.
Afección de la mucosa oral en paciente con PV. Fotos del
archivo del Servicio de Dermatología del Hospital “Dr. Manuel
Gea González”



Tabla 1.
Distribución de las frecuencias de los alelos HLA-DRB1 en
controles mexicanos mestizos.

Especificidad subtipo DRB1	Número (%) de alelos (n=99)	fg			
*04	47 (23.7)		*03	11 (5.5)	
*0407	21 (10.6)	0.106	*03011	9 (4.5)	0.045
*0404	9 (4.5)	0.045	*0302	1 (0.5)	0.005
*0403	4 (2)	0.020	*0303	1 (0.5)	0.005
*0411	3 (1.5)	0.015	*01	10 (5)	
*0402	2 (1)	0.010	*0101	7 (3.5)	0.035
*0405	2 (1)	0.010	*0103	3 (1.5)	0.015
*0410	2 (1)	0.010	*13	10 (5)	
*0401	1 (0.5)	0.005	*1301	4 (2)	0.020
*0406	1 (0.5)	0.005	*1302	4 (2)	0.020
*0408	1 (0.5)	0.005	*1305	2 (1)	0.010
*0409	1 (1)	0.010	*16	5 (2.5)	
*08	33 (16.5)		*1602	3 (1.5)	0.015
*0802	30 (15)	0.150	*1601	2 (1)	0.010
*0804	3 (1.5)	0.015	*09	3 (1.5)	
*07	22 (11.1)		*0901	3 (1.5)	0.015
*0701	22 (11.1)	0.111	*12	2 (1)	
*14	21 (10.9)		*1201	2 (1)	0.010
*1402	7 (3.5)	0.035	*10	1 (0.5)	
*1401	6 (3)	0.030	*1001	1 (0.5)	0.005
*1406	3 (1.5)	0.015			
*1407	3 (1.5)	0.015			
*1403	2 (1)	0.010			
*11	20 (10)				
*1101	12 (6)	0.060			
*1104	4 (2)	0.020			
*1102	3 (1.5)	0.015			
*1103	1 (0.5)	0.005			
*15	13 (6.5)				
*1501	9 (4.5)	0.045			
*1502	3 (1.5)	0.015			
*1503	1 (0.5)	0.005			

Tabla 2.
La frecuencia génica de los alelos del locus HLA-DR
en pacientes con pénfigo y controles.

DRB1	CASOS	(n=86)	CONTROLES	(n=198)	p	RR
	n	fg	n	fg		
DR4	27	0.313	47	0.237	NS	-
<i>DR14</i>	<i>20</i>	<i>0.232</i>	<i>21</i>	<i>0.105</i>	<i>0.09</i>	<i>2.5</i>
DR8	10	0.116	33	0.165	NS	-
DR13	3	0.034	10	0.050	NS	-
DR11	2	0.023	20	0.100	NS	-
<i>DR1</i>	<i>13</i>	<i>0.104</i>	<i>10</i>	<i>0.050</i>	<i>0.08</i>	<i>3.3</i>
DR16	2	0.023	5	0.025	NS	-
DR7	4	0.046	22	0.111	NS	-

Fg= frecuencia génica, RR= riesgo relativo

Anexo # 1

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

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

He sido informado que padezco pénfigo vulgar que es una enfermedad en la cual la herencia puede determinar la susceptibilidad genética a la misma, y que a partir de una muestra de sangre periférica (tomada de una vena de mi brazo) se pueden estudiar los genes involucrados en el pénfigo; así como que en el Hospital General Dr. Manuel Gea González se están tomando muestras de sangre para analizar los genes más frecuentes en pacientes mexicanos con pénfigo.

Mi participación en el estudio consistirá en responder las preguntas formuladas en la hoja de captura de datos y permitir la toma de 5 ml de sangre periférica, mediante venopunción (sacar sangre con jeringa).

Se me ha informado que los riesgos del estudio son mínimos y son los relacionados con la toma de la muestra de sangre con una jeringa de 5 ml, que consisten en dolor por la venopunción, equimosis (moretones), sangrado e infección, estos se resolverán con las indicaciones del médico en término de una a 2 semanas.

Los resultados del estudio ayudaran a comprender el origen étnico del pénfigo en los pacientes mexicanos, así como la relación con el HLA aporta información desde el punto de vista inmunológico para comprender la fisiopatología de la misma.

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

Independientemente del estudio se me seguirá proporcionando atención y tratamiento en el Servicio de Dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Se aclaró que puedo abandonar el estudio en cuanto yo lo decida, sin que ello afecte mi atención de parte del médico o del hospital.

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

Los gastos derivados del estudio del HLA serán cubiertos por el laboratorio del Departamento de Genética del Instituto Nacional de Antropología, el laboratorio de Reumatología e Inmunología del INN Salvador Zubirán y El departamento de inmunología del Cáncer y SIDA del Instituto de Cáncer Dana Farber y en ningún momento se cobrarán al paciente.

Con fecha _____, habiendo comprendido lo anterior y una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi participación en el proyecto, acepto participar en el estudio titulado: Determinación de HLA clase II en pacientes mexicanos con pénfigo vulgar.

Nombre y firma del paciente o responsable legal _____

Nombre, y firma del testigo 1 _____

Dirección _____

Relación que guarda con el paciente _____

Nombre, y firma del testigo 2 _____

Dirección _____

Relación que guarda con el paciente _____

Nombre y firma del Investigador Responsable o Principal _____

Este documento se extiende por duplicado, quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o de su representante legal y el otro en poder del investigador. Para preguntas o comentarios comunicarse con el Dr. Simón Kawa, vicepresidente de las Comisiones de Ética y de Investigación al (01 55) 56 66 60 21

Anexo # 2

Calculo del tamaño de la muestra por la formula para calculo de dos proporciones.

$$N = \frac{2 \bar{P} \bar{Q} (z\alpha + z\beta)^2}{\Delta^2}$$

$$\text{En donde } \bar{P} = \frac{p^1 + p^2}{2}$$

y p^1 representa el grupo 1, que para el presente estudio se considerara la frecuencia encontrada en pacientes hispanos en Nuevo México²⁰, ya que de los grupos étnicos, judíos^{16 17 18 19 20}, japoneses¹⁵, españoles¹⁹, en los cuales se ha estudiado el HLA DR4 este representa el más cercano desde el punto de vista geográfico, histórico, cultural y por tanto probablemente genético. En este estudio el HLA-DR4 fue de 75% en pacientes hispanos sin ancestros judíos conocidos.²⁰

p^2 = grupo control, que corresponde a pacientes mexicanos sin péñfigo vulgar donde se ha encontrado que la frecuencia génica del HLA DR4 en la población general es de 24%.

$$\bar{Q} = 1 - \bar{P}$$

$z\alpha$ ajustada para que la p significativa estadística sea de 0.05 es igual a 1.96

$z\beta$ ajustada para que el poder de predicción sea de 80% es igual a 0.84

Entonces

$$\bar{P} = \frac{0.75 + 0.24}{2} = 0.495$$

$$\bar{Q} = 1 - 0.495 = 0.505$$

Δ es igual a la diferencia entre el grupo 1 y el grupo control entonces

$$\Delta = (0.75 - 0.24)^2 = 0.260$$

Sustituyendo tenemos que:

$$N = \frac{2 \times 0.495 \times 0.505 (1.96 + 0.84)^2}{0.260} = 15.07$$

Anexo # 3

Hoja de captura de datos

Expediente:

Fecha / / .

Nombre _____

Edad al Dx : Masculino Femenino Telf. _____

E-mail: _____ Residencia _____

Lugar de nacimiento _____

Lugar de nacimiento padres:

Padre: _____ Madre: _____

Lugar de nacimiento abuelos

Abuela paterna: _____ Abuelo paterno: _____

Abuela materna: _____ Abuelo materna: _____

Idiomas:

Español: _____ Indígena: _____ Otro: _____

Filiación étnica (autoidentificación)

Alfabetismo:

Educación (máximo grado de estudios):

Ocupación: _____

Ingreso por trabajo:

Monto: _____ personas que dependen: _____ Habitantes por dormitorio: _____

Vivienda:

Área: Rural Urbana

Drenaje: _____ Agua entubada: _____

Sanitario exclusivo: _____ Electricidad: _____

Conviven con animales: si no cuales: _____

Depósitos de agua cercanos como: laguna Ríos Canales _____

Presencia de: Moscas Mosquitos

otros insectos (cuales) _____

Enfermedades:

Infecciosas (VIH, TB, VPH): _____

Metabólicas (diabetes, hipercolesterolemia, hipertensión...): _____

Autoinmunes (AR, LES) _____

Cáncer Hereditarias Otras _____

Si participa familiar(es) en el estudio, señalar nombre y parentesco _____

Dieta habitual (10 principales alimentos): _____

Grafico 1. Pacientes con pénfigo vulgar y foliáceo distribuidos por edad y sexo.

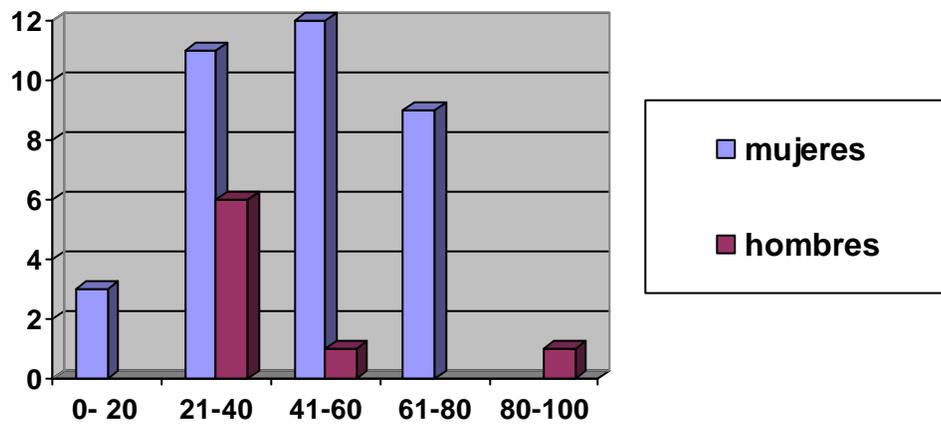


Grafico 2. Pacientes por lugar de origen

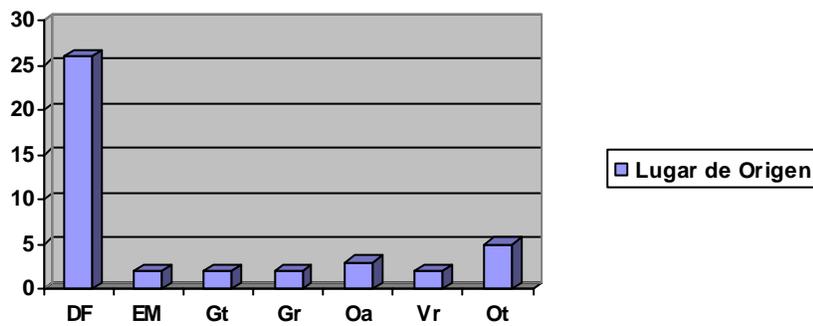


Grafico 3 lugar de origen de los padres de los pacientes.

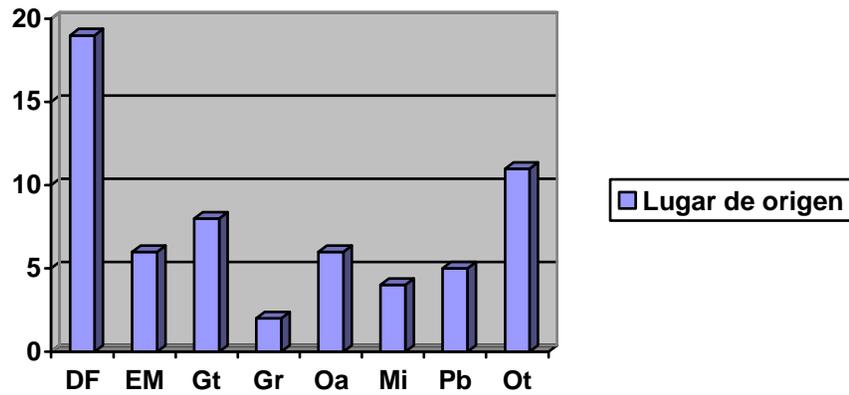
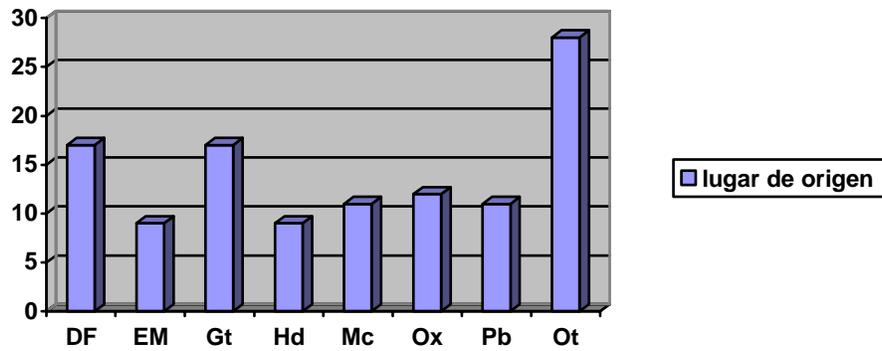


Grafico 4. Lugar de origen de los abuelos de los pacientes.



Bibliografía

- ¹ Harman K., Albert S, Black M. Guidelines for the Management of Pemphigus Vulgaris. *Br J Dermatol* 2003;149:926-37.
- ² Vega M., Villatoro V, Mosqueda A. Pénfigo vulgar: informe del manejo de 40 casos. *Rev Mex Dermatología* 1998;42(6):244-9.
- ³ Mutasin D, Adams. Immunofluorescence in dermatology. *J Am Acad Dermatology* 2001;45:803-22
- ⁴ Werner A., y col. Azathioprine in the treatment of pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 1987; 16(3):527-33.
- ⁵ Alijotas J, Pedragosa R, Bosch J, et al. Prolonged remission after cyclosporine therapy in pemphigus vulgaris: Report of two young siblings. *J Am Acad Dermatol* 1990;23(4):701-3.
- ⁶ Nousari C, Brodsky R y Grant J. Evaluating the role of immunoablative high-dose cyclophosphamide therapy in pemphigus vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 2003;49(1):148-51.
- ⁷ Cummins D, et al. Oral cyclophosphamide for treatment of pemphigus vulgaris and foliaceus. *J Am Acad Dermatol* 2003;49(2):276-80.
- ⁸ Nousari H, Sragovich A, Kinyai-Asadi A, et al. Mycophenolate mofetil in autoimmune and inflammatory skin disorders. *J Am Acad Dermatol* 1999;40(2):265-8.
- ⁹ Nousari HC, Anhalt GJ. The role of mycophenolate mofetil in the management of pemphigus *Arch Dermatol.* 1999;135(7):853-4
- ¹⁰ Bystry J, Jiao D, Natow S. Treatment of pemphigus with intravenous immunoglobulin. *J Am Acad Dermatol* 2002;47:358-63.
- ¹¹ Sami N, Bhol, Ahmed. Influence of intravenous immunoglobulin therapy on autoantibody titers to desmoglein 3 and desmoglein 1 in pemphigus vulgaris. *Eur J Dermatol* 2003; 13(4):377-81
- ¹² Trowsdale J, Ragoussis J, Campell RD. Map of the human major histocompatibility complex (MHC). *Immunology Today* 1991; 12:443-6.
- ¹³ Heinriche H, Orr HT. HLA non A, B, C class I genes: their structure and expression. *Immunol Res* 1990; 9:265-74.
- ¹⁴ HL, Orr HT, Strominger JL. Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, B, C) and murine (H2-K, H2-D) class I molecules. *Cell* 1981; 42:287-99.
- ¹⁵ White P, New M, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1986; 83:5111-5.
- ¹⁶ Browning M, Krausa P. Genetic diversity of HLA-A2: evolutionary and functional significance. *Immunology Today* 1996; 17:165-70.
- ¹⁷ Vargas-Alarcón G, Alvarez M, Martínez-Laso J, et al. A new HLA-B35 (B*3516) allele found in a Mexican of Nahua (Aztec) descent. *Immunogenetics* 1996; 43:244-5.
- ¹⁸ Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, et al.. Nomenclature for factor of HLA system. *Tissue Antigens* 1992; 39:1-13.
- ¹⁹ Klein J. Of HLA, types and selection: an assay on evolution of MHC and parasites. *Human Immunol* 1991; 30:247-58.
- ²⁰ Krain LS, Terasaki PI, Newcomer VD, Mickey MR. increase frequency of HLA-A10 in pemphigus vulgaris. *Arch Dermatol* 1973;108:803-5

-
- ²¹ Hashimoto K, Miki Y, Nishioka K, et al. HLA antigens in dermatitis herpetiformis among Japanese. *J Dermatol* 1980; 7: 289-91
- ²² David M, Zamir R, Segal R, et al. HLA antigens in Jews with pemphigus vulgaris. *Dermatologica* 1981;163:326-30.
- ²³ Mobini N, Yunis EJ, Alper CA et al. Identical MHC markers in non-Jewish Iranian and Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris: possible common central Asian ancestral origin. *Hum Immunol* 1997;57:62-7
- ²⁴ Scharf SJ, Freidmann A, Steinman L, et al.. Specific HLA DQB y HLA DRB1 alleles confer susceptibility to pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6215-9
- ²⁵ Loewenthal R, Slomov Y, Gonzalez-Escribano M.F et al. common ancestral origin of pemphigus vulgaris in jews and Spaniards: a study using microsatellite markers. *Tissue Antigens* 2004;63: 326-34
- ²⁶ Bordenave K, Griffith J, Hordes S, et al. The historical and Geomedical Immunogenetics of Pemphigus Among the Descendants of Sephardic Jews in New Mexico. *Arch Dermatol* 2001;137(6): 825-26
- ²⁷ Vega-Memije M, Sáez M, Cortés-Franco R, et al. Analisis de HLA-DR en pacientes mexicanos con pénfigo. *Gac Méd Méx* 2001;137(6):535-40
- ²⁸ Saez-de-Ocariz, Maria del Mar; Vega-Memije, Maria Elisa; Zuniga, Joaquin, et al. HLA-DRB1*0101 is associated with foliaceous pemphigus in Mexicans. *Int J Dermatol*. 2005;44(4):350
- ²⁹ Miller S, Dykes D, Polesky H: A salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215
- ³⁰ Miyagawa S. Niizeki H. Yamashina Y. Kaneshige T. Genotypin for HLA-A, B y C alleles in Japanese patients with pemphigus: prevalence of Asian alleles of the HLA-B15 family. *British Journal of Dermatology* 2002;146:52-58
- ³¹ Hans-Filho G. dos Santo V. Katayama JH et al. An active focus of high prevalence of fogo selvagem on an Amerindian reservation in Brazil. *J Invest Dermatol* 1996;107:68-75
- ³² Nguyen V. Tou Lee. Assene N. et al. The Pathophysiological Significance of nondesmoglein Targets of pemphigus Autoimmunity: development of antibodies against keratinocyte cholinergic receptor in patients with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus 1998;134(8):971-80
- ³³ Ethel T. Brenner S. Diet and Pemphigus: In pursuit of Exogenous Factors in Pemphigus and Fogo Selvagem. 1998;134 (11):1406-10
- ³⁴ Ahmed Ar, Yunis E, Khatri K et al. Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5056-60.
- ³⁵ Birol A. Yavuzer R. Turkak H. Gürgey E. HLA-class 1 and 2 antigens in Turkish patients with pemphigus. *Int J Dermatol* 2002;41:79-83
- ³⁶ Tóth G. Pas H. Jonkman M. Transition of pemphigus vulgaris into pemphigus foliaceus confirmed by antidesmoglein ELISA profile. *Int J Dermatol* 2002;41(8):525-527
- ³⁷ Tsuji Y. Kawazhima T. Yokoya K. et al. Clinical and Serological Transition From Pemphigus Vulgaris to Pemphigus Foliaceus Demonstrated by Desmoglein ELISA System. *Arch Dermatol* 2002;138:95-96
- ³⁸ Wicks I. McColl G. DÁmico A. et al. Use of monoclonal antibodies to detect disease associated HLA-DRB1 alleles and the shared epitope in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1997;52(2):135-139.