

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

Fundación Clínica Médica Sur

ANTIGENOS LEUCOCITARIOS HUMANOS EN PACIENTES NACIDOS EN MÉXICO CON
CIRROSIS BILIAR PRIMARIA

Tesis para obtener grado en:

Medicina Interna

Propone: Dr. Genaro Vázquez-Elizondo

Departamento de Medicina Interna

Tutor: Dr. Nahum Méndez-Sánchez

Investigador SNI II

Unidad de Investigación Biomédica y Unidad de Hígado

Fundación Clínica Médica Sur



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.

Dr. Misael Uribe Esquivel

Profesor Titular del Curso de Especialización

en Medicina Interna

Fundación Clínica Médica Sur

Dr. Javier Lizardi Cervera

Director Académico

Fundación Clínica Médica Sur

Dr. Nahum Méndez-Sánchez

Tutor

AGRADECIMIENTOS

A mi esposa, que con su amor, apoyo y paciencia ha sido quien ha marchado a mi lado inspirándome y dándome la fuerza con la cual seguir adelante.

A mis padres, por escucharme, aconsejarme y alentarme a seguir siempre adelante.

A mis profesores, de quienes aprendí las bases de mi práctica médica.

A mis asesores, que con cuyo conocimiento me dieron la pauta para seguir.

A mi tutor, por su amistad, ejemplo y apoyo durante todos estos años.

A Dios nuestro Señor, por permitirme llegar a este momento de mi vida.

ÍNDICE

ANTECEDENTES	4
FISIOPATOLOGÍA DE LA CBP: FACTORES AMBIENTALES Y GENÉTICOS	6
MARCO DE REFERENCIA	9
ESTUDIOS PREVIOS DE DETERMINACIÓN DE HLA CLASE II EN CBP	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
JUSTIFICACIÓN	11
OBJETIVO	11
HIPÓTESIS	11
METODOLOGÍA	12
DISEÑO DEL ESTUDIO	12
UNIVERSO DEL ESTUDIO	12
POBLACIÓN DEL ESTUDIO	12
LUGAR DE REALIZACIÓN	12
PERIODO DEL ESTUDIO	12
TAMAÑO DE LA MUESTRA	13
CRITERIOS DE SELECCIÓN	14
VARIABLES	14
DEFINICIÓN DE VARIABLES	15
PROCEDIMIENTO PARA LOS CASOS	15
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	17
CONSIDERACIONES ÉTICAS	17
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	23
ANEXOS	26
REFERENCIAS	28

ANTECEDENTES

Entidad clínica de estudio: Cirrosis Biliar Primaria

La Cirrosis Biliar Primaria (CBP) es una hepatopatía crónica colestásica de origen autoinmune¹ que se ha asociado a predisposición genética y que se presenta bajo la influencia de factores ambientales desencadenantes aún por definir. Descrita por primera vez en un ensayo clínico por Ahrens y colaboradores en la década de 1950,² se caracteriza por la destrucción inmunológica de los ductos biliares que provoca a su vez una acumulación de metabolitos tóxicos en el parénquima hepático, propiciando la aparición de inflamación, fibrosis y consecuentemente cirrosis.

La enfermedad tiene su pico de incidencia alrededor de la quinta década de la vida, afectando a mujeres aproximadamente en el 95% de los casos.³ Su aparición es infrecuente en pacientes menores de 30 años y puede presentarse en pacientes ancianos. En cuanto a grupos étnicos, se ha reportado principalmente en razas caucásicas, con incidencia de 2.7 por 100 000 años-persona.⁴ De acuerdo con estudios recientes realizados en el Reino Unido y Australia, la incidencia pareciera tener una tendencia en crescendo^{5,6} aunque este fenómeno puede ser explicado por la mejora en las técnicas de detección y mayor conocimiento de la entidad. El paciente típico de esta enfermedad será una mujer mayor a 30 años, con fatiga, pérdida de peso, prurito o ictericia y que presente elevaciones marcadas de fosfatasa alcalina.

Clínicamente, durante las fases iniciales de la enfermedad hasta el 60% de los pacientes son asintomáticos,^{7,8} sin embargo, cuando la enfermedad es sintomática se manifiesta con fatiga y prurito aproximadamente en el 20% de los casos.⁸⁻¹⁰ Estas observaciones son diferentes para población no blanca, ya que tanto hispanos como africanos suelen cursar con mayor sintomatología.¹¹ Otras manifestaciones clínicas menos frecuentes son la hiperpigmentación de la piel,¹² xantelasmas,³ artropatía inflamatoria,¹³ osteoporosis¹⁴ y una gama de enfermedades autoinmunes, entre las que se incluyen artritis reumatoide¹³, tiroiditis autoinmune,¹⁵ síndrome de

Sjögren¹⁶ escleroderma y síndrome de CREST.¹⁷ En la exploración física, se observa hepatomegalia desde el 4 hasta el 70% de los pacientes¹⁸, con una minoría de pacientes presentando ictericia conjugada, malabsorción o hipertensión portal en etapas tardías de la enfermedad.³

En cuanto a las alteraciones bioquímicas, son características las elevaciones de fosfatasa alcalina, gamaglutamil transpeptidasa y 5'-nucleotidasa,¹⁹ encontrando elevaciones modestas de transaminasas hepáticas (menor a 5 veces el valor normal superior).²⁰ Serológicamente la presencia de anticuerpos antimitocondriales (AMA) es característica de la CPB,¹⁹ encontrados en el 90 al 95% de los casos y pueden ser detectados años antes de la aparición de síntomas.³ Otros anticuerpos frecuentemente encontrados son los antinucleares, positivos en cerca del 70% de los casos.²¹ Los patrones que se presentan con mayor frecuencia son el periférico y el moteado, producidos por anticuerpos dirigidos contra la nucleoporina 62 del complejo de nucleoporos y en el sitio gp210 del cuerpo de la proteína nuclear sp100, respectivamente,^{3,22} patrones son altamente específicos de la enfermedad.²³

Histológicamente, la enfermedad puede ser dividida en 4 fases. Estas no son mutuamente excluyentes, y en una misma biopsia pueden coexistir diferentes estadios de la misma. La lesión histológica de la CBP es la destrucción asimétrica de los ductos biliares encontrado usualmente en las triadas portales.³ Las características de cada estadio se muestran a continuación:²⁴

- Estadio 0: Hígado normal.
- Estadio 1: Inflamación localizada en las triadas portales.
- Estadio 2: Disminución de la cantidad de ductos biliares, con extensión del proceso inflamatorio más allá de las triadas portales.
- Estadio 3: Aparición de septos fibrosos adyacentes a las triadas portales.
- Estadio 4: Presencia de cirrosis franca con nódulos regenerativos.

El diagnóstico de la CBP se basa en tres criterios: la presencia de AMA en suero (específicamente el subtipo M2), la elevación de enzimas hepáticas (frecuentemente fosfatasa alcalina) por más de 6 meses y la presencia de hallazgos histológicos compatibles con la enfermedad. Un diagnóstico probable requiere de la presencia de dos de estos criterios y un diagnóstico definitivo de la presencia de los tres.^{3 18} Actualmente, el único tratamiento farmacológico aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en los Estados Unidos y que ha demostrado mejora en los parámetros bioquímicos es el ácido Ursodesoxicólico en dosis de 12 a 1 mg/Kg por día.^{3,25} El trasplante hepático constituye la mejor opción terapéutica, con tasas de supervivencia de 92% y 85% a 1 y 5 años respectivamente, mientras la tasa de recurrencia es aproximadamente de 30% a 10 años.²⁶

Fisiopatología de la CBP: factores ambientales y genéticos

A pesar de que no se ha dilucidado por completo su fisiopatología, la CBP es una enfermedad autoinmune crónica en donde una variedad de factores ambientales (entre ellos, ciertos xenobióticos dirigidos contra el dominio lipóilico del componente inmunodominante del complejo E2 de la piruvato deshidrogenasa; CPD-E2^{27,28} y el tabaquismo^{29,30}) así como ciertos agentes infecciosos (retrovirus humano beta,³⁰ o bacterias Gram-negativas como *Novosphingobium aromaticivorans*³¹ o *Escherichia coli*²²) son capaces de inducir el insulto inicial para desencadenar la respuesta inmunológica y más aún, perpetuarla por medio de mecanismos de mimetismo molecular.²⁵ La presencia de un componente genético ha quedado demostrada por la frecuencia incrementada de CBP en familiares de primer grado de pacientes índice (aproximadamente el 6%)³¹; fenómeno acuñado como "CBP familiar",³² en donde diferentes estudios han demostrado tasas de prevalencia familiar desde un 1% hasta un 6.4%.³³ Más aún, con respecto a la tasa de concordancia (TC) de enfermedad en gemelos monocigóticos y

dicigóticos Selmi y colaboradores encontraron una TC en gemelos monocigóticos de 0.77, una de las más altas entre las enfermedades autoinmunes.³⁴ Como se ha mencionado previamente, los pacientes con CBP o sus familiares de primer grado están predispuestos a presentar características clínicas o serológicas de otras enfermedades autoinmunes; este fenómeno sugiere que la CBP involucra genes que regulan de manera general la respuesta inmune.³³ Es probable que los genes responsables se encuentren en el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II, una región altamente polimórfica y densa genéticamente localizada en el cromosoma 6p21 que contiene una gran cantidad de genes que influyen la función inmune. Esta región del genoma humano está asociada con una vasta mayoría de alteraciones autoinmunes.³⁵ A pesar de que los mecanismos no se han esclarecido del todo, se cree que en ciertas enfermedades autoinmunes está involucrado el receptor para células T inducido por péptidos específicos, incrementando la posibilidad de una respuesta inmunológica.³⁶ Aunque no se ha determinado la fisiopatología precisa de la CBP, existe evidencia que sugiere un papel por parte de linfocitos T CD4+ y CD8+ autorreactivos específicos contra el CPD-E2.^{37,38} Esto se ha demostrado en CBP debido a la presencia de estas células en las triadas portales infiltrando ductos biliares necróticos.³⁹ Este CPD-E2 normalmente se encuentra en la membrana interior mitocondrial, y se ha propuesto que una forma aberrante de ésta se encuentra expresada en el epitelio biliar de los pacientes con CBP, promoviendo un fenómeno de mimetismo molecular.⁴⁰ De esta forma, se monta una respuesta inmunológica con anticuerpos monoclonales en contra el dominio lipoil del CPD-E2 mitocondrial, resultando en autoinmunidad. Ante este fenómeno autoinmune y la agrupación familiar así como la concordancia en gemelos monocigóticos es factible proponer un papel relevante del CMH y sus genes inmunoreguladores, que en el humano es conocido como Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA, por sus siglas en inglés).

El HLA se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y abarca aproximadamente 4000 Kb, se dividen en Clase I (HLA-A, B y C), Clase II (HLA-DR, DP y DQ) y Clase III (TNF, HSP 70,

otros genes del complemento: C4A, C4B, C2 y FB) y regula la respuesta inmunológica discriminando lo propio de lo extraño. Los antígenos HLA de clase II están formados por dos cadenas de glicoproteínas unidas por enlaces no covalentes, ligadas a la cadena por una porción intracelular. A esta cadenas se les llama α y β ; cada una de las cadenas consta de tres regiones: una región extracelular, un segmento transmembrana y una porción intracitoplasmática. Ambas cadenas tienen dos dominios extracelulares, cada uno denominado $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$ respectivamente. La identificación de los marcadores genéticos de susceptibilidad Clase I y II permitirá conocer el mecanismo de la enfermedad desde el punto de vista de inmunidad adquirida, pues la función del producto de estos genes es la presentación de péptidos derivados de antígenos infecciosos. Los linfocitos T reconocen un antígeno sólo cuando éste es expuesto en unión con la molécula de HLA por medio de una célula presentadora de antígenos; en general las moléculas de Clase I unen péptidos de proteínas intracelulares y las de Clase II presentan péptidos de proteínas extracelulares, mientras que las moléculas de Clase I y II pueden presentar antígenos intra y extracelulares.⁴¹ En conclusión, los posibles mecanismos de asociación entre el HLA y la presencia de enfermedades se puede resumir de la siguiente manera: alteración molecular de autoantígenos, mimetismo molecular con antígenos foráneos, moléculas del HLA como receptores para agentes patógenos, alteraciones del repertorio de células T adultas, expresión inapropiada de moléculas del HLA, interacción del HLA con moléculas coestimuladoras y genes alterados de la región central del HLA.

MARCO DE REFERENCIA

Estudios previos de determinación de HLA clase II en CBP

Para un genetista, la CBP es una "enfermedad genéticamente compleja", que se caracteriza por la presencia de penetrancia incompleta, baja heredabilidad Mendeliana y de fenotipos variables.⁴² Existe evidencia de un componente genético en la fisiopatología de la CBP, aunque su papel no está bien determinado. Se piensa que dado que existe una relación mujer:hombre de 8-10:1^{31,43} y a la observación de frecuencia de monosomía X en leucocitos periféricos de mujeres con CBP,³¹ tanto el género femenino como otros genes inmunoreguladores son importantes, entre los que se incluye el cromosoma 2q; específicamente el antígeno citotóxico linfocitario 4 (CTL 4); el gen agrupador de interleucina 1, el gen de la caspasa 8, el antígeno 1 de resistencia natural asociado a macrófagos^{42,44} así como ciertos alelos específicos de HLA Clase II. De los anteriores, sólo se ha confirmado el papel la familia del alelo HLA-DR8 (DRB1*08), descrito en estudios de cohortes en Estados Unidos (14.9% vs 6.5%, RM 3.3, $p < 0.01$; 19.4% vs 8.7%, RM 2.55, $p < 0.01$),⁴⁵⁻⁴⁷ Japón (35.5% vs 7.4%, RM 6.84 $p < 0.0001$),⁴⁸ Suecia (29.3% vs 11.4%, RM 3.22 $p < 0.001$),⁴⁹ Italia y Reino Unido.(18 % vs 6%, RM 3.15, $p < 0.02$ y 12 % vs 4%, RM 3.05, $p < 0.0008$, respectivamente).⁴⁴ Sin embargo, algunos estudios han presentado evidencia discordante, por ejemplo, en Japón se han reportado asociaciones con HLA-DR2 (68% vs 30%, RM = 5.0 $p < 0.007$) y HLA-DPB1*0501^{50,51} o en China, donde se encontró susceptibilidad con los alelos HLA-DRB1*0701 (29.2% vs 13.9%, RM 2.55, $p < 0.05$) y HLA-DRB1*03 (18.4% vs 7.2%, $p < 0.05$).⁵² En Brasil, un estudio no encontró asociación con el locus del alelo HLA-DR y HLA-DQ, sugiriendo un transfondo diferente en una población mestiza (Caucasoide, Negroide y Amerindia).⁵³ Más aún, en un estudio proveniente de Italia, se encontró que los alelos *DRB1*11*(10.7 % vs 27.6%, RM 0.03 $p < 0.05$)⁵⁴ y *DRB1*13*⁵⁵ son protectores para el desarrollo de CBP, hallazgos no corroborados en el Reino Unido.⁵⁴ Por su parte, un estudio realizado en Estados Unidos sugirió que la disminución de los alelos

DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 y DRB1*1302-DQA1*0102-DQB1*0604 es factor protector en la aparición de CBP.⁴⁷

A la fecha, en México no se han realizado estudios que hayan descrito qué HLA se encuentran asociados a la aparición de CBP en población nacida en México.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Existe asociación entre alelos HLA-B/-DR en los pacientes con Cirrosis Biliar Primaria nacidos en México?

JUSTIFICACIÓN

La mortalidad por cirrosis en México es de las más altas a nivel mundial, la cual representó la tercera causa de muerte en la población general con 27 566 muertes y la segunda en el grupo de adultos jóvenes (15-64 años) con 17 872 muertes durante 2005.^{56,57} Más aún, evidencia basada en estadísticas de mortalidad hace notar que el número de casos tendrá una tendencia estable hacia la alza hasta el año 2050.⁵⁸ La CBP es la cuarta causa de cirrosis en México.⁵⁹ Al momento, no se conoce el trasfondo genético de esta enfermedad en la población mexicana, caracterizada por etnicidad mestiza.⁶⁰ La identificación de los HLA más frecuentes permitirá identificar haplotipos de riesgo así como posibles haplotipos protectores, permitiendo reconocer a poblaciones o familias de riesgo y ayudando a su identificación en fase asintomática, permitiendo incidir en la historia natural de la enfermedad.

OBJETIVO

Identificar los alelos HLA-B/-DR que se asocian a pacientes con diagnóstico de Cirrosis Biliar Primaria nacidos en México.

HIPÓTESIS

Si el alelo más frecuente en la literatura de pacientes con Cirrosis Biliar Primaria es HLA-DRB1*08 entonces los pacientes con Cirrosis Biliar Primaria nacidos en México presentarían el mismo alelo.

METODOLOGÍA

DISEÑO DEL ESTUDIO.

Casos y controles

UNIVERSO DEL ESTUDIO.

Pacientes nacidos en México con CBP sin otra etiología autoinmune.

POBLACIÓN DEL ESTUDIO.

Pacientes nacidos en México con diagnóstico probable y definitivo de CBP que acudieron a la consulta externa de la Unidad de Hígado de la Fundación Clínica Médica Sur.

LUGAR DE REALIZACIÓN.

Unidad de Hígado de la Fundación Clínica Médica Sur.

PERIODO DEL ESTUDIO.

Enero a Junio de 2008.

TAMAÑO DE LA MUESTRA.

No existe en la literatura datos sobre la frecuencia de presentación de los alelos del HLA clase II en pacientes nacidos en México con CBP, sin embargo se realizó un ejercicio de cálculo de tamaño de muestra con la siguiente fórmula⁶¹ con datos obtenidos de los estudios reportados en la literatura: ⁴⁵⁻⁴⁸

$$n \text{ (por cada grupo)} = \frac{(\rho_0 q_0 + \rho_1 q_1)(Z_1 - \alpha/2 + Z_1 - \beta)^2}{(\rho_1 - \rho_0)^2}$$

En dónde:

ρ_1 = la proporción de expuestos entre los casos

ρ_0 = la proporción de expuestos entre los controles

$q_1 = 1 - \rho_1$

$q_0 = 1 - \rho_0$

$Z_1 - \alpha/2$ = valor de la distribución normal estándar correspondiente a un nivel de significación de 1.96 para una prueba de dos colas a un nivel de significación de 0.05

$Z_1 - \beta$ = valor de la distribución normal estándar correspondiente al nivel de poder deseado; 0.84 para un poder de 80%.

Con este ejercicio se obtuvo un tamaño de muestra de 30 pacientes. Ante la baja frecuencia de esta enfermedad se incluyeron a todos los pacientes con CBP de la consulta externa de la Unidad de Hígado de la Fundación Clínica Médica Sur y se logró obtener una muestra total de 9 pacientes.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de Inclusión

Casos

- Pacientes con diagnóstico de CBP.
- Pacientes sin otra enfermedad autoinmune
- Pacientes nacidos en México independientemente de su ancestría.
- Cualquier género y edad

Controles

- Históricos del estudio de Barquera, quien reportó los resultados de 381 individuos mexicanos sanos, a quienes se les realizó análisis de HLA para donar órganos sólidos o médula ósea, obtenidos principalmente de estados del centro y norte del país.⁶⁰

Criterios de Exclusión

Casos

- Pacientes sin diagnóstico clínico, inmunológico u histológico de cirrosis biliar primaria.
- Pacientes con otras enfermedades autoinmunes.
- Pacientes que no aceptaron entrar al estudio.

VARIABLES

Independientes

Polimorfismo genético de las frecuencias alélicas del HLA en el grupo de pacientes con CBP.

Dependiente

Presencia de CBP.

Co-variables

Edad y género.

DEFINICIÓN DE VARIABLES

Cirrosis Biliar Primaria

Definición: La Cirrosis Biliar Primaria (CBP) es una enfermedad autoinmune progresiva que es diagnosticada en base a tres criterios: la presencia de anticuerpos antimitocondriales en suero, la elevación de enzimas hepáticas (fosfatasa alcalina y/o gamaglutamil transpeptidasa) por más de seis meses así como hallazgos histológicos compatibles con la enfermedad (destrucción asimétrica de los ductos biliares en las triadas portales). Los pacientes que cumplen dos criterios se les determina con diagnóstico "probable" y cuando cumplen tres como diagnóstico "definitivo".³

Nivel de medición.-

Haplotipos de HLA Clase II

Definición: Alelos del HLA que se encuentran ligados en el brazo corto del cromosoma 6.

Nivel de medición: nominal

Categoría: HLA-DR y HLA-B

PROCEDIMIENTO PARA LOS CASOS

Se acudió a la consulta externa de la Unidad de Hígado en donde se invitó a participar a los pacientes con diagnóstico confirmado de Cirrosis Biliar Primaria por clínica, panel inmunológico e histología. Una vez obtenido el consentimiento informado (anexo 1) se obtuvo de cada expediente datos demográficos (ver tabla 1). Posteriormente, se tomó una muestra de 4.5 mL de sangre periférica para la extracción del DNA.

Para el estudio del DNA, se comparó a los pacientes afectados con 381 individuos mexicanos no relacionados sanos obtenidos del estudio de Barquera.⁶⁰

Tipificación del HLA-DR. Se realizó la tipificación de los alelos de la siguiente manera:

Extracción del DNA genómico: Cada muestra de 4 a 5 mL de sangre periférica en tubo con anticoagulante EDTA se centrifugó a 1600xg a 4°C durante 30 minutos, se eliminó el plasma y se obtuvo el paquete leucocitario, a partir de estos se obtuvo el DNA mediante la técnica de expulsión salina (salting-out) que incluye la digestión de proteinasa K, precipitación de proteínas con hidróxido de sodio y etanol absoluto, terminando con un lavado con etanol al 70%.⁶²

Tipificación con sondas de oligonucleóticos secuencia específica (SSOP). Se procedió a la amplificación de los loci HLA-DRB1 mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) que incluye iniciadores o "primers" específicos para las regiones en estudio. Posteriormente se verificó que todas las muestras hubieran amplificado adecuadamente mediante la aplicación de 10 µL de cada una en gel de agarosa al 2% teñido con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio durante 40 minutos a 90 voltios, las amplificaciones positivas se observaron bajo la luz UV (312 nm) y se tomaron fotos para su registro. Por último la muestra se colocó en membranas de nitrocelulosa en un formato de Dot-blot y se hibridó con sondas secuencia-específica marcadas para cada alelo. Para la detección de la hibridización se usó el método de quimioluminiscencia y la explosión de las membranas a placas radiológicas.⁶³

ESTRATEGIA PARA LA OBTENCIÓN DE LA MUESTRA Y RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LOS CASOS

El muestreo es no probabilístico de forma consecutiva, pues se asignaron a los pacientes el número secuencial correspondiente, a medida que fueron considerados como elegibles para su inclusión. El día de su inclusión en el estudio se realizó la muestra de sangre periférica y se obtuvieron los datos del expediente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la descripción de las características de los pacientes se utilizó estadística descriptiva de acuerdo al nivel de medición de las variables utilizando media y desviación estándar. Se compararon las frecuencias de cada alelo entre los pacientes y controles mediante la aplicación de Chi-cuadrada con corrección de Yates, considerando una $p < 0.05$ como el mínimo nivel de significancia. Se estableció RM e IC para establecer asociaciones. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS versión 16.0 (Chicago, Illinois)

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, específicamente los procedimientos que se realizaron en esta investigación se clasifican en el título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección III que dice: investigación con riesgo mayor al mínimo; se anexa hoja de consentimiento informado. Se obtuvo la aprobación del Comité de ética de la Fundación Clínica Médica Sur.

RESULTADOS

Se estudiaron 9 pacientes, 7 mujeres y 2 hombres con media de edad de 57.56 ± 10.53 . Los resultados de los laboratorios bioquímicos y de inmunidad con lo que se realizó el diagnóstico se muestran en la tabla 2. La ancestría y los haplotipos encontrados en cada paciente se muestran en la tabla 3. Los haplotipos en desequilibrio genético se muestran en la tabla 4 mientras que las frecuencias de los HLA en el grupo de pacientes con CBP y en los grupos de control se muestran en la tabla 5.

Tabla 1. Datos demográficos recabados

$n = 9$	$49 - 81 (\bar{X} = 57.5)$	
Edad (años)	7:2	
Género (M:H)		
Ancestría	Mexicana	Extranjera
Padres ($n = 18$)	13	5
Abuelos Paternos ($n = 36$)	18	18

Tabla 2. Resultados de laboratorio clínico e inmunológico

Paciente	Género	Edad	Albúmina	Globulinas	BT	BD	BI	GGT	FA	ANA	Título	Patrón	AMA	AML	LKMA
	M/F	años	(g/dL)	(g/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(U/L)	(U/L)						
SPC	F	81	3.71	3.6	3.18	1.98	1.2	302	453	-	<1:40	**	-	<1:40	<20.1
MPIU	F	52	3.56	3.3	0.61	0.13	0.48	1008	369	+	1:640	Moteado	+	<1:40	<20.1
CJD	F	57	2.82	3.1	0.51	0.1	0.41	127	348	+	>1:640	Moteado	-	<1:40	<20.1
MAM	F	46	4.2	3.1	2.8	0.7	2.1	446	247	-	<1:40	**	+	<1:20	<20.1
FMGP	F	58	3.52	3.2	1.77	0.81	0.96	1344	372	+	1:5120	Moteado	-	<1:40	<20.1
MGP	F	59	3.75	3.9	1.09	0.31	0.78	284	239	-	<1:40	**	+	<1:40	<20.1
MCFA	F	51	4.3	4.2	0.79	0.07	0.72	239	440	-	<1:40	**	+	<1:40	<20.1
MWT	M	65	3.38	3.2	1.24	0.3	0.94	20	94	-	<1:40	**	+	<1:40	<20.1
AVVV	M	49	3.36	5.3	2.32	1.23	1.09	1247	565	+	>1:640	Periférico	+	<1:40	<20.1
Media	**	57.5	3.6	3.6	1.59	0.62	0.96	557	347						
± DE		± 10.5	± 0.44	± 0.72	± 0.98	± 0.63	± 0.49	± 503	± 139						

M - Masculino, F - Femenino, BT - Bilirrubina total, BD - Bilirrubina directa, BI - Bilirrubina Indirecta, FA - Fosfatasa alcalina, GGT - Gamaglutamil transpeptidasa, ANA - Anticuerpos Antinucleares, AMA - Anticuerpos Antimitocondriales, AML - Anticuerpos Antimúsculo Liso, LKMA - Anticuerpos Microsomales Hígado-Riñón, DE - Desviación estándar.

Tabla 3. Ancestría y alelos de HLA encontrados en cada paciente.

PACIENTE	ORIGEN MATERNO	ORIGEN PATERNO	ORIGEN ABUELA	ORIGEN ABUELO	ORIGEN ABUELO	ORIGEN ABUELA	HLA-B	HLA-DR
			MATERNA	MATERNO	PATERNO	PATERNA		
SPC	México	México	México	México	México	México	B*14, B*51	*01, *13
MPIU	España	España	España	España	España	España	B*44, B*49	*01, *07
CJD	México	México	México	México	México	México	B*18, B*44	*15, *11
MAM	España	España	España	España	España	España	B*41, B*51	*03, *04
FMGP	México	México	México	México	México	México	B*14, B*39	*01, *04
MGP	México	México	España	España	España	España	B*35, B*52	*08, *08
MCFA	México	México	México	México	México	México	B*15, B*45	*01, *13
MWT	México	Polonia	México	México	Polonia	Polonia	B*39, B*58	*04, *07
AVVV	México	México	España	Francia	España	España	B*08, B*39	*04, *08

Tabla 4. Haplotipos de cada paciente

PACIENTE	ANCESTRÍA	HAPLOTIPOS ENCONTRADOS		HLA EN		COMENTARIO (FH)*
				DESEQUILIBRIO GENÉTICO		
SPC	Mexicana	B*14-DRB1*01	B*51-DRB1*13	B*14-DRB1*01		Haplotipo de origen del norte de África en paciente de ascendencia mexicana. Edad de presentación tardía. (0.005)
MPIU	Española	B*44-DRB1*07	B*49-DRB1*01			
CJD	Mexicana	B*18-DRB1*15	B*44-DRB1*11			
MAM	Española	B*41-DRB1*03	B*51-DRB1*04	B*51-DRB1*04		Haplotipo europeo, sur de Europa (portugués) (0.007)
FMGP	Mexicana	B*14-DRB1*01	B*39-DRB1*04	B*14-DRB1*01 y B*39-DRB1*04		Haplotipos Amerindio y Mediterráneo (Sur de Europa). Doble alelo en desequilibrio en paciente con manifestaciones notorias en laboratorio clínico e inmunológico (0.022 y 0.005)
MGP	Mexicana/Española	B*35-DRB1*08	B*52-DRB1*08			
MCFA	Mexicana	B*45-DRB1*01	B*15-DRB1*13			
MWT	Mexicana/Polaca	B*58-DRB1*07	B*39-DRB1*04	B*39-DRB1*04		Haplotipo Amerindio; posiblemente sin efecto de ancestría. (0.022)
AVVV	Mexicana/Española/Francesa	B*39-DRB1*04	B*08-DRB1*08	B*39-DRB1*04		Haplotipo Amerindio. (0.022)

FH: Frecuencia de Haplotipo en población nacida en México.

* Basado en el estudio de Barquera y colaboradores.⁶⁰

Tabla 5. Frecuencias de HLA-B y DRB1 en pacientes con CBP y Controles sanos

	<i>Pacientes con CBP N = 18</i>		<i>Controles N = 762</i>		<i>p</i>	RM	IC 95%
	<i>n</i>	<i>f.g.</i>	<i>n</i>	<i>f.g.</i>			
HLA-B							
B*39	3	0.166	78	0.102	0.62	1.7	0.5 – 6.1
B*14	3	0.166	46	0.060	0.18	3.1	0.9 – 11.1
B*51	2	0.111	60	0.078	0.95	1.4	0.3 – 6.5
B*44	1	0.055	52	0.068	0.79	0.8	0.8 – 6.1
B*49	1	0.055	17	0.022	0.89	2.5	0.3 – 20.4
B*18	1	0.055	25	0.032	0.89	1.7	0.2 – 13.5
B*41	1	0.055	15	0.018	0.82	2.9	0.3 – 23.4
B*35	1	0.055	128	0.168	0.34	0.2	0.1 – 2.2
B*52	1	0.055	13	0.017	0.74	3.3	0.4 – 27.4
B*15	1	0.055	14	0.018	0.78	3.1	0.4 – 25.2
B*45	1	0.055	9	0.011	0.56	4.9	0.6 – 41
B*58	1	0.055	8	0.010	0.51	5.5	0.6 – 46.8
B*08	1	0.055	28	0.036	0.83	1.5	0.2 – 12
HLA-DRB1							
*04	4	0.222	196	0.257	0.95	0.9	0.3 – 2.5
*01	4	0.222	62	0.081	0.09	3.2	1.1 – 10.1
*08	3	0.166	93	0.122	0.83	1.4	0.4 – 5.1
*07	2	0.111	69	0.090	0.90	1.3	0.3 – 5.5
*13	2	0.111	66	0.086	0.95	1.3	0.3 – 5.8
*15	1	0.055	45	0.059	0.65	0.9	0.1 – 7.2
*11	1	0.055	46	0.060	0.67	0.9	0.1 – 7
*03	1	0.055	55	0.072	0.85	0.8	0.1 – 5.7

f.g. Frecuencia génica

DISCUSIÓN

Este estudio describe los haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad en nueve casos de CBP mestizos mexicanos y su comparación con controles sanos; muestra en los pacientes la presencia de haplotipos de origen Caucásico, particularmente Mediterráneo, combinados con otros de origen Amerindio y Negroide. Los principales alelos del locus HLA-B fueron HLA-B*39, HLA-B*14, HLA-B*51, mientras que en el locus HLA-DR fueron: HLA-DRB1*04 y HLA-DRB1*01. En relación con los bloques en desequilibrio genético de HLA-B/-DRB1, se encontraron en asociación el B*14-DRB1*01, el B*51-DRB1*04 y el B*39-DRB1*04 los cuales se han descrito en poblaciones del sur de Europa, Norte de África y en Centro y Suramérica respectivamente.

Estos resultados confirman el papel del haplotipo HLA-B*14/DRB1*01 como marcador genético de susceptibilidad para el desarrollo de CBP y añade el origen probablemente mediterráneo de dicho haplotipo. En la literatura, los haplotipos descritos en CBP son primordialmente aquellos pertenecientes a la familia del HLA-DRB1*08.^{44,46,48,49,54} Es notable que a pesar de que éste alelo y el encontrado en población nacida en México son diferentes, ambos poseen un origen geográfico similar (sur de Europa). Esta evidencia sugiere que la CBP en el mestizo mexicano tiene un trasfondo genético similar al descrito por otros autores^{1,54} aunque con desequilibrios genéticos peculiares a esta población, ya que añade la posible participación del haplotipo HLA-B*39/HLA-DRB1*04 como marcador autóctono de susceptibilidad en mexicanos sustentado por el hecho de que dicho haplotipo es relativamente frecuente en población mexicana (mestiza e indígena) y está asociado con otras enfermedades autoinmunes en esta población, hecho demostrado en pacientes con Artritis Reumatoide,⁶⁴⁻⁶⁶ Rhus,⁶⁷ Espondiloartropatías,⁶⁸ la arteritis de Takayasu⁶⁹ y el Lupus.⁷⁰ Este haplotipo ha sido relacionado también con otras enfermedades presumiblemente no autoinmunes, como son la litiasis vesicular⁷¹, la enfermedad de Chagas⁷² así como la tuberculosis extrapulmonar.⁶⁹

Los datos presentados en este trabajo sugieren la presencia del mecanismo autoinmune en la CBP y sienta las bases para investigar el mecanismo por el cual los autoanticuerpos lesionan el ducto biliar. En este sentido se encuentra implicado el mimetismo molecular con ciertas proteínas nucleares y mitocondriales así como la existencia de un probable detonador infeccioso. Es probable también el papel de las células T citotóxicas reactivas que expresan el receptor CD4 y CD8, así como receptor de células T $\alpha\beta$,³¹ el cual se ha encontrado que van dirigidos contra el dominio lipoidil de la familia del complejo de piruvato deshidrogenasa.⁷³⁻⁷⁵

La CBP tiene una presentación con un amplio rango de manifestaciones que van desde pacientes asintomáticos hasta la cirrosis. Ningún estudio ha evaluado este aspecto el cual resulta relevante dado el pronóstico de la enfermedad. Específicamente en nuestro estudio, un paciente presentó elevaciones importantes de GGT y FA así como una titulación alta de anticuerpos antinucleares, presentando dos alelos en desequilibrio genético, uno de origen amerindio (B*39-DRB1*04) y otro del sur de Europa (B*14-DRB1*01) los cuales contribuyen a la aparición de la CBP. Este hallazgo puede sugerir que la contribución genética de dos haplotipos desequilibrados en un mismo paciente podría constituir un factor de riesgo para presentar mayores manifestaciones clínicas, posiblemente por una mayor concentración de autoanticuerpos, y quizá un curso más agresivo de la misma, pudiendo implicar una mayor priorización para el tratamiento definitivo. Este hallazgo debe ser valorado en estudios con mayor cantidad de pacientes.

En conclusión, en pacientes mexicanos con CBP, existe un fondo genético de susceptibilidad a la autoinmunidad. El mestizo mexicano parece particularmente proclive a la autoinmunidad en CBP debido a la combinación de genes autóctonos (HLA-B39 y HLA-B14) con otros de origen mediterráneo (HLA-DR1 y HLA-DR4). La heterogeneidad genética que presentan los pacientes de esta serie permite sugerir que la CBP tiene un trasfondo genético relacionado

al encontrado por otras series en la literatura^{33,44,46,48,49,54,55} aunque peculiar al mestizo mexicano, y por lo tanto constituye una entidad que no es exclusiva de pacientes con ascendencia caucásica.

ANEXOS

Anexo 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por este medio hago constar que se me ha invitado a participar en el proyecto de investigación "ANTÍGENOS LEUCOCITARIOS HUMANOS EN PACIENTES MEXICANOS CON CIRROSIS BILIAR PRIMARIA"; se me ha explicado que el objetivo de este trabajo es identificar los antígenos leucocitarios humanos más frecuentes en pacientes con mi enfermedad, cirrosis biliar primaria.

Como parte del estudio seré revisado por médicos especialistas, se obtendrá una muestra de sangre de mi brazo y se obtendrá información contenida en mi expediente localizado en esta unidad. Hago constar que se me ha explicado como se obtendrá dicha muestra y cuáles son las posibles molestias derivadas de la toma, como son la posible aparición de moretón y dolor discreto en mi brazo.

Entiendo que estoy en mi derecho de solicitar cualquier aclaración e información sobre la investigación en cualquier momento del desarrollo de la misma sin que esto afecte mi atención médica en el futuro. Con mi firma en este documento, autorizo a los investigadores a incluirme en este proyecto de investigación.

Nombre y Firma del Paciente

Nombre y Firma del Investigador

Nombre y Firma de Testigo

Nombre y Firma de Testigo

Anexo 2

Índice de Abreviaturas

ANA	Anticuerpos Antinucleares
AMA	Anticuerpos Antimitocondriales
AML	Anticuerpos Antimúsculo Liso
BT	Bilirrubina total
BD	Bilirrubina directa
BI	Bilirrubina Indirecta
CBP	Cirrosis Biliar Primaria
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CPD-E2	Complejo de la Piruvato Deshidrogenasa E2
CTL 4	Antígeno Citotóxico Linfocitario 4
DE	Desviación estándar
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
FA	Fosfatasa alcalina
FDA	Food and Drug Administration, Estados Unidos
GGT	Gamaglutamil transpeptidasa
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos; siglas en inglés
IC	Intervalo de Confianza
LKMA	Anticuerpos Microsomales Hígado-Riñón
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa; siglas en inglés
RM	Razón de Momios
SSOP	Oligonucleóticos secuencia específica, siglas en inglés
TC	Tasa de concordancia

REFERENCIAS

1. Juran BD, Lazaridis KN. Genetics and genomics of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis.* 2008;12:349-365; ix.
2. Ahrens EH, Jr., Payne MA, Kunkel HG, Eisenmenger WJ, Blondheim SH. Primary biliary cirrhosis. *Medicine (Baltimore).* 1950;29:299-364.
3. Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med.* 2005;353:1261-1273.
4. Kim WR, Lindor KD, Locke GR, 3rd, et al. Epidemiology and natural history of primary biliary cirrhosis in a US community. *Gastroenterology.* 2000;119:1631-1636.
5. James OF, Bhopal R, Howel D, Gray J, Burt AD, Metcalf JV. Primary biliary cirrhosis once rare, now common in the United Kingdom? *Hepatology.* 1999;30:390-394.
6. Sood S, Gow PJ, Christie JM, Angus PW. Epidemiology of primary biliary cirrhosis in Victoria, Australia: high prevalence in migrant populations. *Gastroenterology.* 2004;127:470-475.
7. Mayo MJ. Natural history of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis.* 2008;12:277-288; viii.
8. Prince MI, Chetwynd A, Craig WL, Metcalf JV, James OF. Asymptomatic primary biliary cirrhosis: clinical features, prognosis, and symptom progression in a large population based cohort. *Gut.* 2004;53:865-870.
9. Pares A, Rodes J. Natural history of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis.* 2003;7:779-794.
10. Bergasa NV. Pruritus and fatigue in primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis.* 2003;7:879-900.
11. Peters MG, Di Bisceglie AM, Kowdley KV, et al. Differences between Caucasian, African American, and Hispanic patients with primary biliary cirrhosis in the United States. *Hepatology.* 2007;46:769-775.
12. Koulentaki M, Ioannidou D, Stefanidou M, et al. Dermatological manifestations in primary biliary cirrhosis patients: a case control study. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:541-546.
13. Uddenfeldt P, Danielsson A. Evaluation of rheumatic disorders in patients with primary biliary cirrhosis. *Ann Clin Res.* 1986;18:148-153.
14. Menon KV, Angulo P, Weston S, Dickson ER, Lindor KD. Bone disease in primary biliary cirrhosis: independent indicators and rate of progression. *J Hepatol.* 2001;35:316-323.
15. Weetman AP. Non-thyroid autoantibodies in autoimmune thyroid disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2005;19:17-32.
16. Tsianos EV, Hoofnagle JH, Fox PC, et al. Sjogren's syndrome in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 1990;11:730-734.
17. Mayo MJ, Jenkins RN, Combes B, Lipsky PE. Association of clonally expanded T cells with the syndrome of primary biliary cirrhosis and limited scleroderma. *Hepatology.* 1999;29:1635-1642.
18. Kumagi T, Onji M. Presentation and diagnosis of primary biliary cirrhosis in the 21st century. *Clin Liver Dis.* 2008;12:243-259; vii.
19. Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines. *Hepatology.* 2000;31:1005-1013.
20. Dickson ER, Grambsch PM, Fleming TR, Fisher LD, Langworthy A. Prognosis in primary biliary cirrhosis: model for decision making. *Hepatology.* 1989;10:1-7.
21. Muratori P, Muratori L, Ferrari R, et al. Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 2003;98:431-437.
22. Neuberger J. Antibodies and primary biliary cirrhosis - piecing together the jigsaw. *J Hepatol.* 2002;36:126-129.
23. Worman HJ, Courvalin JC. Antinuclear antibodies specific for primary biliary cirrhosis. *Autoimmun Rev.* 2003;2:211-217.

24. Ludwig J, Dickson ER, McDonald GS. Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 1978;379:103-112.
25. Lindor K. Ursodeoxycholic acid for the treatment of primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med.* 2007;357:1524-1529.
26. Crosignani A, Battezzati PM, Invernizzi P, Selmi C, Prina E, Podda M. Clinical features and management of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2008;14:3313-3327.
27. Selmi C, Cocchi CA, Zuin M, Gershwin ME. The Chemical Pathway to Primary Biliary Cirrhosis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2008.
28. Amano K, Leung PS, Rieger R, et al. Chemical xenobiotics and mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis: identification of antibodies against a common environmental, cosmetic, and food additive, 2-octynoic acid. *J Immunol.* 2005;174:5874-5883.
29. Costenbader KH, Karlson EW. Cigarette smoking and autoimmune disease: what can we learn from epidemiology? *Lupus.* 2006;15:737-745.
30. Gross RG, Odin JA. Recent advances in the epidemiology of primary biliary cirrhosis. *Clin Liver Dis.* 2008;12:289-303; viii.
31. Lleo A, Invernizzi P, Mackay IR, Prince H, Zhong RQ, Gershwin ME. Etiopathogenesis of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2008;14:3328-3337.
32. Tanaka A, Borchers AT, Ishibashi H, Ansari AA, Keen CL, Gershwin ME. Genetic and familial considerations of primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 2001;96:8-15.
33. Invernizzi P, Selmi C, Mackay IR, Podda M, Gershwin ME. From bases to basis: linking genetics to causation in primary biliary cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005;3:401-410.
34. Selmi C, Mayo MJ, Bach N, et al. Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment. *Gastroenterology.* 2004;127:485-492.
35. Trowsdale J. HLA genomics in the third millennium. *Curr Opin Immunol.* 2005;17:498-504.
36. Sundberg EJ, Deng L, Mariuzza RA. TCR recognition of peptide/MHC class II complexes and superantigens. *Semin Immunol.* 2007;19:262-271.
37. Shimoda S, Nakamura M, Ishibashi H, Hayashida K, Niho Y. HLA DRB4 0101-restricted immunodominant T cell autoepitope of pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: evidence of molecular mimicry in human autoimmune diseases. *J Exp Med.* 1995;181:1835-1845.
38. Kita H, Matsumura S, He XS, et al. Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *J Clin Invest.* 2002;109:1231-1240.
39. Kita H, Naidenko OV, Kronenberg M, et al. Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology.* 2002;123:1031-1043.
40. Migliaccio C, Van de Water J, Ansari AA, et al. Heterogeneous response of antimitochondrial autoantibodies and bile duct apical staining monoclonal antibodies to pyruvate dehydrogenase complex E2: the molecule versus the mimic. *Hepatology.* 2001;33:792-801.
41. Rhodes DA, Trowsdale J. Genetics and molecular genetics of the MHC. *Rev Immunogenet.* 1999;1:21-31.
42. Charatcharoenwitthaya P, Lindor KD. Current concepts in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Ann Hepatol.* 2005;4:161-175.
43. Talwalkar JA, Lindor KD. Primary biliary cirrhosis. *Lancet.* 2003;362:53-61.

44. Donaldson PT, Baragiotta A, Heneghan MA, et al. HLA class II alleles, genotypes, haplotypes, and amino acids in primary biliary cirrhosis: a large-scale study. *Hepatology*. 2006;44:667-674.
45. Stone J, Wade JA, Cauch-Dudek K, Ng C, Lindor KD, Heathcote EJ. Human leukocyte antigen Class II associations in serum antimitochondrial antibodies (AMA)-positive and AMA-negative primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 2002;36:8-13.
46. Mullarkey ME, Stevens AM, McDonnell WM, et al. Human leukocyte antigen class II alleles in Caucasian women with primary biliary cirrhosis. *Tissue Antigens*. 2005;65:199-205.
47. Begovich AB, Klitz W, Moonsamy PV, Van de Water J, Peltz G, Gershwin ME. Genes within the HLA class II region confer both predisposition and resistance to primary biliary cirrhosis. *Tissue Antigens*. 1994;43:71-77.
48. Onishi S, Sakamaki T, Maeda T, et al. DNA typing of HLA class II genes; DRB1*0803 increases the susceptibility of Japanese to primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 1994;21:1053-1060.
49. Wassmuth R, Depner F, Danielsson A, et al. HLA class II markers and clinical heterogeneity in Swedish patients with primary biliary cirrhosis. *Tissue Antigens*. 2002;59:381-387.
50. Miyamori H, Kato Y, Kobayashi K, Hattori N. HLA antigens in Japanese patients with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Digestion*. 1983;26:213-217.
51. Seki T, Kiyosawa K, Ota M, et al. Association of primary biliary cirrhosis with human leukocyte antigen DPB1*0501 in Japanese patients. *Hepatology*. 1993;18:73-78.
52. Liu HY, Deng AM, Zhou Y, Yao DK, Xu DX, Zhong RQ. Analysis of HLA alleles polymorphism in Chinese patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2006;5:129-132.
53. Bittencourt PL, Palacios SA, Farias AQ, et al. Analysis of major histocompatibility complex and CTLA-4 alleles in Brazilian patients with primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003;18:1061-1066.
54. Invernizzi P, Battezzati PM, Crosignani A, et al. Peculiar HLA polymorphisms in Italian patients with primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 2003;38:401-406.
55. Invernizzi P, Poly F, et al. HLA DRB1 polymorphisms in 676 Italian patients with primary biliary cirrhosis and 2028 matched healthy controls. A nation-wide population based case-control study. *Hepatology*. 2005;42:462A.
56. Mendez-Sanchez N, Villa AR, Zamora-Valdes D, Morales-Espinosa D, Uribe M. Worldwide mortality from cirrhosis. *Ann Hepatol*. 2007;6:194-195.
57. SSA. Estadísticas de Mortalidad: Información Tabular. Vol 2008. Secretaría de Salud ed. Ciudad de México: Secretaría de Salud; 2005.
58. Mendez-Sanchez N, Villa AR, Chavez-Tapia NC, et al. Trends in liver disease prevalence in Mexico from 2005 to 2050 through mortality data. *Ann Hepatol*. 2005;4:52-55.
59. Mendez-Sanchez N, Aguilar-Ramirez JR, Reyes A, et al. Etiology of liver cirrhosis in Mexico. *Ann Hepatol*. 2004;3:30-33.
60. Barquera R, Zuniga J, Hernandez-Diaz R, et al. HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico. *Mol Immunol*. 2008;45:1171-1178.
61. Guerrero-Almeda MG-V, GG. Muestreo y estimación del tamaño de muestra en estudios con diseño transversal, casos y controles, cohortes y ensayos clínicos. In: Mendez-Sanchez N, ed. *Métodos clínicos y epidemiológicos de investigación clínica*. Ciudad de México, México: Masson Doyma México; 2006:164-178.
62. Davis RW, Thomas M, Cameron J, St John TP, Scherer S, Padgett RA. Rapid DNA isolations for enzymatic and hybridization analysis. *Methods Enzymol*. 1980;65:404-411.

63. Bignon JD F-VM. International Histocompatibility Workshop for typing of HLA class II alleles by DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR) and hybridization with sequence specific oligonucleotide probes (SSOP). In: Charron D, ed. *Genetic Diversity of HLA: Functional and Medical Implications*. Vol 1. Paris, France: EDK; 1997:584-595.
64. Delgado-Vega AM, Martin J, Granados J, Anaya JM. [Genetic epidemiology of rheumatoid arthritis: what to expect from Latin America?]. *Biomedica*. 2006;26:562-584.
65. Delgado-Vega AM, Anaya JM. Meta-analysis of HLA-DRB1 polymorphism in Latin American patients with rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2007;6:402-408.
66. Ruiz-Morales JA, Vargas-Alarcon G, Flores-Villanueva PO, et al. HLA-DRB1 alleles encoding the "shared epitope" are associated with susceptibility to developing rheumatoid arthritis whereas HLA-DRB1 alleles encoding an aspartic acid at position 70 of the beta-chain are protective in Mexican Mestizos. *Hum Immunol*. 2004;65:262-269.
67. Simon JA, Granados J, Cabiedes J, Morales JR, Varela JA. Clinical and immunogenetic characterization of Mexican patients with 'rhopus'. *Lupus*. 2002;11:287-292.
68. Vargas-Alarcon G, Londono JD, Hernandez-Pacheco G, et al. Effect of HLA-B and HLA-DR genes on susceptibility to and severity of spondyloarthropathies in Mexican patients. *Ann Rheum Dis*. 2002;61:714-717.
69. Soto ME, Vargas-Alarcon G, Cicero-Sabido R, Ramirez E, Alvarez-Leon E, Reyes PA. Comparison distribution of HLA-B alleles in mexican patients with takayasu arteritis and tuberculosis. *Hum Immunol*. 2007;68:449-453.
70. Granados J, Zuniga J, Acuna-Alonzo V, Rosetti F, Vargas-Alarcon G. [Influence of alleles and haplotypes of the main histocompatibility complex on the susceptibility to systemic lupus erythematosus in the Mexican population]. *Gac Med Mex*. 2006;142:195-199.
71. Mendez-Sanchez N, King-Martinez AC, Ramos MH, Pichardo-Bahena R, Uribe M. The Amerindian's genes in the Mexican population are associated with development of gallstone disease. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:2166-2170.
72. Cruz-Robles D, Reyes PA, Monteon-Padilla VM, Ortiz-Muniz AR, Vargas-Alarcon G. MHC class I and class II genes in Mexican patients with Chagas disease. *Hum Immunol*. 2004;65:60-65.
73. Gershwin ME, Mackay IR, Sturgess A, Coppel RL. Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis. *J Immunol*. 1987;138:3525-3531.
74. Yeaman SJ, Fussey SP, Danner DJ, James OF, Mutimer DJ, Bassendine MF. Primary biliary cirrhosis: identification of two major M2 mitochondrial autoantigens. *Lancet*. 1988;1:1067-1070.
75. Gershwin ME, Mackay IR. The causes of primary biliary cirrhosis: Convenient and inconvenient truths. *Hepatology*. 2008;47:737-745.