



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
SERVICIO DE DERMATOLOGÍA, HOSPITAL
GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZALEZ"



Determinación de moléculas HLA clase II en pacientes mexicanos con
Lepra, en diferentes zonas de la republica mexicana.

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE
ESPECIALISTA EN DERMATOLOGÍA.

PRESENTA
DR. SERGIO MIGUEL MERCADO CEJA

DIRECTOR: DRA. ELBA LUCÍA RANGEL GAMBOA

MÉXICO DF

AGOSTO 2010



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.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Dermatología, en el Laboratorio de Biología Molecular e Histocompatibilidad del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" y en el Departamento de Trasplantes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" bajo la dirección de la Doctora Elba Lucía Rangel Gamboa.

Este trabajo de Tesis con No. 06-55-2010, presentado por el alumno Sergio Miguel Mercado Ceja se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Dra. Elba Lucía Rangel Gamboa con fecha del 13 de Agosto 2010 para su impresión final.

Autorizaciones

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

Dr. Luciano Domínguez Soto
Jefe del departamento de Dermatología
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

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

Determinación de moléculas HLA clase II en pacientes mexicanos con Lepra, en diferentes zonas de la republica mexicana.

Colaboradores:

Nombre: Dr. Sergio Miguel Mercado Ceja.

Firma _____

Nombre: Dra. Elba Lucía Rangel Gamboa.

Firma _____

Nombre: Dr. Julio Granados Arriola

Firma _____

Nombre: Dr. Roberto Arenas Guzmán

Firma _____

Nombre: Dra. María Angélica Alfonsina Olivo Díaz

Firma _____

"El Mundo está en las manos de aquellos que tienen el coraje de soñar y correr el riesgo de vivir sus sueños."

Paulo Cohelo

Gracias por darme ese coraje y apoyarme todos y cada uno de los días de mi vida. Gracias

Mamá

Gracias, porque por ti, se lo que es luchar hasta triunfar. Gracias Papá

Gracias por dejarme compartir nuestras vidas. Gracias May.

Gracias por ser mis mejores amigos. Gracias Alex, Gracias Gab.

Gracias a mis maestros: Gracias Lucy por tu guía, Gracias Dr. Julio Granados, Gracias Dr. Roberto Arenas, Gracias Dr. Benjamín Moncada, Gracias Dra. Angélica Olivo.

INDICE

Resumen	8
1. Introducción.....	9
2. Antecedentes	11
3. Justificación.....	16
4. Hipótesis.....	16
5. Objetivos	16
6. Material y Métodos	17
6.1. Tipo de estudio	17
6.2. Ubicación temporal y espacial.....	17
6.3. Criterios de selección	17
6.4. Variables.....	18
6.5. Tamaño de la muestra.....	18
6.6. Métodos de Laboratorio	19
6.6.1 Obtención de ADN	19
6.6.2 Amplificación del ADN por reacción en cadena de la polimerasa	20
6.6.3 Tipificación.....	21
6.7. Análisis estadístico	21
7. Resultados	22
8. Discusión.....	25
9. Conclusiones	26
10. Perspectivas	26
11. Bibliografía.....	27
12. Glosario	30
13. Figuras	32
14. Anexos.....	36
12.1. Anexo No. 1	36
12.2. Anexo No. 2	37
12.3. Anexo No. 3	38

RESUMEN

Introducción.- La lepra es una enfermedad infecciosa crónica causada por *Mycobacterium leprae*, que afecta nervios periféricos, piel y otros órganos. En México se detectaron 243 casos nuevos en 2007. Actualmente hay más de 702 casos en tratamiento con poliquimioterapia. La presentación clínica es variable lo que condujo a la clasificación de Joplin en 2 grupos polares y 3 interpolares. En el polo tuberculoide los pacientes tienen una respuesta inmunológica mediada por células importante, que se manifiesta por una prueba de lepromina positiva y pocos bacilos ácido-alcohol resistentes en los tejidos. El polo lepromatoso se presenta en pacientes con deficiencia en la inmunidad celular. Los linfocitos que suelen responder al estímulo, están ausentes y como resultado los macrófagos no activados son incapaces de digerir al *M. leprae*. En la lepra lepromatosa esta deficiencia parece ser absoluta, de por vida y no reversible después del tratamiento, lo que sugiere factores genéticos involucrados. En este contexto, el locus del HLA tiene un papel crucial en la presentación de antígenos durante la respuesta inmune. Por tanto es posible que existan variantes alélicas del HLA que confieran mayor susceptibilidad al *M. leprae*.

Hipotesis.- Si en la patogénesis de la Lepra participan factores genéticos ubicados en el brazo corto del cromosoma 6, entonces los pacientes con esta enfermedad expresan frecuencias alélicas del HLA diferentes a las de la población sana.

Objetivo.- Determinar los alelos HLA DR en pacientes mexicanos con lepra, originarios de diversas zonas de la república.

Material y métodos.- Estudio multicéntrico, comparativo, abierto, prospectivo, transversal y observacional. Realizado entre Mayo 2008 a Agosto 2010. Se incluyeron pacientes mexicanos de cualquier sexo mayores de edad registrados en los programas de control de Lepra en los hospitales participantes. Se excluyeron los pacientes que no aceptaron firmar el consentimiento informado. El grupo control se constituyó por muestras de controles históricos que comprenden una muestra homogénea de la población mexicana. Se aisló DNA genómico a partir de células mononucleares de sangre periférica mediante la técnica de “*fenol-cloroformo*”. La tipificación genética de HLA-DRB1 y HLA-DQB1 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 Altaenzymes. La tipificación de alta resolución por el método de hibridación con sondas específicas de secuencia (PCR-SSOP). La información de los oligonucleótidos y de las sondas que se utilizaron fue tomada de las especificidades para DR y DQ publicadas en el 12º Taller Internacional de Histocompatibilidad.

El análisis estadístico se realizó utilizando la aplicación STATCALC contenida en el software EPI-INFO™ 6. La significancia de la diferencia en la frecuencia de alelos se analizó utilizando tablas de contingencia de 2x2 para calcular J_i^2 , con poder de 95%.

Resultados.- La frecuencia del alelo DRB1*15 entre los pacientes fue de 0.19 (16/84), la cual es significativamente mayor que la frecuencia de 0.05 (45/762,) observada en los pacientes sanos ($pC = 0.0004$, $OR = 3.7$, $IC = 1.9-7.2$). En contraste, la frecuencia del alelo HLA-DQB1*0301 fue significativamente menor en la población de pacientes 0.09 (8/84) que la frecuencia de 0.20 (158/762) en pacientes control ($pC = 0.02$, $OR = 2.4$, $IC = 1.1-5.6$).

Conclusión.- En el 19% de los pacientes se encontró aumentado el alelo HLA-DRB1*15 de manera estadísticamente significativa, indicando su participación en la susceptibilidad, por otra parte el HLA-DQB1*0301 puede ser un factor de protección.

1. INTRODUCCION

La lepra es una de las enfermedades que ha sido reconocida por antiguas culturas y a su paso por el tiempo se ha conocido con infinidad de nombres: Cagoteria, Elefanciasis de los Arabes, Kushta, Ta-Na-Fe-Ping, Mal de San Antonio, Mal de San Lázaro, al parecer el nombre hace referencia al lugar donde vivían los enfermos de Lepra “Hospital de San Lázaro en Jerusalem” y a los portadores de la enfermedad se les conoció como Lazarinos. Los registros más antiguos conocidos se encuentran en papiros egipcios que datan del año 4,600 años A.C. pertenecientes a la primera dinastía de Faraones. En la India para el año 1,400 A.C. se le conoce como “Kushta” y el castigo de la enfermedad recae hasta los hijos de padres enfermos a los cuales también se les llama “leprosos” aún sin ser portadores de la enfermedad. ¹

En Europa se reportan los primeros casos de Lepra posterior al regreso de Egipto de los Soldados Romanos. Para el siglo XII se construyen los primeros albergues para aislar a estos pacientes y en Paris incluso existió una ceremonia para anunciar el internamiento de un paciente “Separatio Leprosarum” ²

A México la Lepra llega a mano de la conquista y con esta se erige el hospital de San Lázaro de la Nueva España en 1525 el cual sería destruido solamente 2 años más tarde. Veintidós años después se levanta el segundo Hospital de San Lázaro que funcionaria cerca de 3 siglos hasta 1894. ³

En la actualidad, de acuerdo a los últimos reportes recibidos de 121 países por parte de la OMS, la prevalencia de esta enfermedad a principios de 2009 era de 213,036 casos. Durante el 2008 la República Democrática del Congo, y Mozambique alcanzaron la meta de eliminación de la enfermedad (<1 caso/10 000 habitantes) siendo solo 3 países los que aun no alcanzan este objetivo: Brasil, Madagascar, India. En este mismo año los casos detectados a nivel mundial disminuyeron en un 4% comparado con el 2007. ⁴⁻⁷

En México se detectaron 243 casos nuevos en 2007. Actualmente hay más de 702 casos en tratamiento con poliquimioterapia. El 76% de los casos en tratamiento se concentran en 10 estados. Aunque el espectro de la

enfermedad es amplio, el 73.6 % de los casos nuevos son Multibacilares (Lepra lepromatosa), el 0.8% afecta a niños y se cuentan con 11 casos de recaídas. ⁶⁻⁷

2. ANTECEDENTES

La lepra es una enfermedad infecciosa crónica producida por *Mycobacterium leprae* o bacilo de Hansen en honor a Gerard Henri Armauer Hansen, quien lo descubre en el Hospital St. Jorgen de Bergen, Noruega; es un bacilo acido-alcohol resistente de 1 a 8 μm de largo por 0.3 a 0.5 μm de ancho, su forma es rectilínea, pertenece a la clase *Actinomycetales*, orden *Micobacteriales*, familia *Mycobacteriaceae*, género *Mycobacterium*, tiende a agregarse en cúmulos llamados Globias por medio de una sustancia llamada glea.⁸⁻¹¹

Es la menos transmisible de todas las enfermedades, apenas 5% de las personas que se exponen al contagio llegan a infectarse. Esencialmente es una enfermedad de los nervios periféricos, pero también afecta la piel y otros órganos (mucosas, ojos, testículos, tracto respiratorio alto, músculos y huesos).⁴

En 1873 Hansen da a conocer al mundo la descripción del bacilo causal de la enfermedad, lo denomina *Bacillus leprae*, lo que marca el inicio del estudio científico de la leprología,⁴ y permite reconocer las múltiples facetas que presenta la enfermedad, observándose que se comporta de manera diferente según los individuos y que su evolución es también muy variada. En la actualidad la clasificación más aceptada es la postulada por 1966 Ridley y Joplin (1966) que incluye 5 subtipos, basados en el aspecto inmunológico en donde todos los pacientes inician como indeterminados, viran a un estado interpolares, antes de llegar finalmente a un polo.¹⁰⁻¹¹

En uno de los polos, los pacientes tienen una respuesta inmunológica mediada por células importantes, por lo tanto se presentan con lesiones simples, bien demarcadas con hipopigmentación, anhidrosis o hipohidrosis e hipoestesia central, en este polo los macrófagos se especializan en células epitelioides y reclutan linfocitos formando Granulomas tuberculoides. Encontramos hipersensibilidad cutánea retardada que se manifiesta por una prueba de lepromina positiva y muy raramente encontraremos bacilos acido-alcohol resistentes en los tejidos, esta faceta es llamada Lepra tuberculoides tipo polar (TT).⁹⁻¹⁰

En el otro extremo, los pacientes parecen no tener resistencia alguna al *M. leprae*, le permiten no solo la supervivencia al bacilo sino su gran reproducción, en esta presentación se observan las manifestaciones más características de la enfermedad; numerosas lesiones nodulares de tamaños variables y placas infiltradas en casi cualquier parte del cuerpo pero con gran predominio en la cara, en etapas avanzadas se presenta la fascie leonina y la destrucción del tejido cartilaginoso de la nariz lo que se conoce como “nariz en silla de montar”. Los lóbulos de los pabellones auriculares aumentan de tamaño y muestran un aspecto de péndulo⁹⁻¹⁰

La deficiencia de inmunidad celular frente al bacilo de Hansen le permite a este reproducirse dentro de los macrófagos, que lo han fagocitado pero que se muestran incapaces de digerirlos. En este contexto los macrófagos se observan como células espumosas (Células de Virchow) y los bacilos pueden agruparse en colonias llamadas globias. Este tipo de pacientes presentan siempre una baciloscopia positiva, mientras que la reacción a la lepromina (Reacción de Mitsuda) siempre nos dará un resultado negativo. A esta forma no resistente se denomina Lepra lepromatosa polar (LL).⁹⁻¹⁰

Entre estos dos polos opuestos existe un amplio espectro de manifestaciones limítrofes que cuando están mas cerca del polo lepromatoso se les conoce como lepra lepromatosa limítrofe (borderline lepromatoso o BL), al centro del espectro se le llama lepra limítrofe pura (Lepra borderline BB o indeterminada) y cuando las manifestaciones clínicas están mas cerca del polo tuberculoide, lepra tuberculoide limítrofe (borderline tuberculoide o BT). Estos casos son inestables y tienen a alejarse y acercarse de los polos, así cuando un caso BT vira hacia el polo L observamos un fenómeno de “degradación” por el contrario cuando un caso BL se acerca al extremo T observamos la reacción de “reversa”.⁹⁻¹⁰⁻¹²⁻¹³

Las biopsias de estas formas de lepra se caracterizan por la presencia de granulomas con predominio de células epiteloideas en la forma tuberculoide limítrofe hasta un predominio de macrófagos a medida que se aproxima a la forma lepromatosa. El número de linfocitos es variable, y en los granulomas cutáneos abundan los bacilos. Por ello, esta forma y la forma lepromatosa se conocen como lepra multibacilar, y la forma intermedia tuberculoide y tuberculoide limítrofe se denomina lepra paucibacilar. Es por esto que el espectro de la lepra es utilizado como un paradigma de la respuesta inmunológica.¹⁴

Los hallazgos inmunológicos en la lepra indican que hay una deficiencia en la inmunidad celular absoluta al *M. leprae* en pacientes con enfermedad lepromatosa. Por lo anterior se ha sugerido que puede haber un defecto genético involucrado.

La asociación con un alelo de HLA específico implica que el estímulo inmunogénico para la autoinmunidad sería un péptido específico, y que al menos inicialmente la autoinmunidad es dependiente de la reactividad de una o un número limitado de clonas de células T potencialmente auto-agresivas. Por esto la determinación de los haplotipos del HLA podría aportar información que contribuya a esclarecer si la presencia de lepra en mexicanos se debe o no a la aportación genética de ancestros amerindios quienes por no tener un contacto previo (antes de la conquista) con el *M. leprae* presentasen haplotipos que confieren mayor susceptibilidad.

La respuesta del cuerpo a los microorganismos invasores involucra mecanismos de defensa específicos e inespecíficos. Dentro de los mecanismos de defensa inespecíficos incluimos a las barreras que crean la piel y las mucosas, así como sus secreciones, la fagocitosis por los macrófagos. Los mecanismos específicos son aquellos elaborados por la respuesta inmune, estos contribuyen a las reacciones de hipersensibilidad y curación de enfermedades.

Los hallazgos inmunológicos en la lepra indican que hay una deficiencia en la inmunidad celular al *M. leprae* en pacientes con enfermedad lepromatosa. Los linfocitos que suelen responder al estímulo, están ausentes y como resultado los macrófagos no activados son incapaces de digerir al *M. leprae*. En la lepra lepromatosa esta deficiencia parece ser absoluta, de por vida y no reversible después del tratamiento. Por lo anterior se ha sugerido que puede haber un defecto genético involucrado.

En este contexto, el locus del antígeno leucocitario humano (HLA) tiene un papel crucial como presentador de antígenos, es una de las vías asociadas a la respuesta inmune celular, y regula los niveles de secreción de Interferon- γ (INF) y por consecuencia la evolución de la enfermedad.^{12,15}

Las moléculas HLA (por sus siglas en inglés, Human Leukocyte Antigen) se encuentran en el locus 21 del brazo corto del cromosoma 6, contiene más de 200 genes, 40 de los cuales codifican antígenos leucocitarios. Los genes del complejo HLA que participan en la respuesta inmune se dividen en 2 clases I y II, las cuales son estructural y funcionalmente diferentes. Hay cerca de 20 genes clase I, tres de estos, HLA-A, HLA-B y HLA-C llamados clásicos o genes clase IA son actores principales en el teatro inmunológico.¹⁴⁻¹⁵

Los genes clase II codifican las cadenas α y β de las moléculas clase II. Su designación en el cromosoma 6 consiste de 3 letras la primera (D) indica la clase, la segunda (M, O, P, Q, o R) la familia y la tercera (A o B) indica la cadena (α o β , respectivamente). HLA-DRB se refiere a los genes clase II de la familia R que codifican para la cadena β . Los genes individuales se diferencian con números arábigos y la notación para las variantes alélicas de estos genes es un número precedido por un asterisco. Por ejemplo HLA-DRB1*0401.¹⁴

La molécula DQ está conformada por dos diferentes subunidades para formar un $\alpha\beta$ heterodímero. Cada subunidad es codificada por un gen. La subunidad α es codificada por el gen HLA-DQA1 y la subunidad β está codificada por el gen HLA-DQB1. Hay diferentes serotipos, específicamente hablando del HLA-DQB1 son cuatro principales DQB1*01, DQB1*02, DQB1*03, DQB1*04, posteriormente se encontró que DQB1*05 y DQB1*06 pertenecían a DQB1*01. Los serotipos DQB1*07, DQB1*08 y DQB1*09 encontrados últimamente pertenecen a DQB1*03 y se expresan DQB1*0301, DQB1*0201 y DQB1*0303 respectivamente.

Específicamente las moléculas HLA-II intervienen en la respuesta específica a la infección y a la evolución de la respuesta inmune secundaria a los antígenos de *M. leprae*.

Para funcionar como antígenos reconocidos por las células T, las proteínas deben primero ser procesadas y convertidas a péptidos, de manera que estos puedan unirse a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de la célula huésped. En este caso el procesamiento tiene lugar a través de la vía endocítica.

Muchos péptidos antigénicos provienen de proteínas que fueron capturadas y transportadas al interior de una célula desde su medio externo. Estos antígenos incluyen proteínas que fueron parte de un microorganismo o de alguna otra partícula grande engullida mediante fagocitosis. Estas proteínas son transportadas al interior de la célula mediante vesículas endosómicas membranosas, donde posteriormente serán degradadas gradualmente al ser expuestas a enzimas proteolíticas celulares y pH ácido.

Los péptidos generados a través de la vía endocítica varían ampliamente en cuanto a secuencia y longitud. Es importante señalar que esta vía entrega péptidos a las moléculas clase II del CMH, las cuales son expresadas por macrófagos y otras células presentadoras de antígenos (linfocitos B y Células de Langerhans) cuya información es entregada a los linfocitos CD4 cooperadores.

Los sistemas HLA que controlan la inmunidad mediada por células hacen probable que las diferencias en los haplotipos HLA contribuyan al amplio espectro de respuesta inmune observada en la lepra. Debido a la complejidad de los factores de riesgo intrínsecos de la susceptibilidad o resistencia a la lepra no se han descrito los determinantes genéticos con precisión.⁴⁻¹⁹

En México existe un estudio realizado con familias con lepra en la Ciudad de México donde se reporta que el alelo DRB1*1501, y el haplotipo DQA1*0102-DQB1*0602 se encuentran aumentados en los pacientes por lo tanto se asocian con susceptibilidad. Se desconocen datos del resto de la republica mexicana.²⁰

En otros países de América se ha encontrado asociación positiva con otros alelos como en Brasil al HLA-DRB1*16 (*1601 and *1602) y un efecto protector del DRB1*04 en contra de lepra lepromatosa.²¹

En Argentina se concluyo que el DQB1*0201 podría ser un factor protector en lepra lepromatosa en la región del Chaco debido a las mezclas que hay con nativos Guaraníes y Tobas.²²

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha observado que los alelos que confieren susceptibilidad varían en las poblaciones de acuerdo a su origen, por tanto la determinación de los haplotipos del HLA podría aportar información que contribuya a esclarecer si la presencia de lepra en mexicanos se debe o no a la aportación genética de ancestros amerindios quienes por no tener un contacto previo (antes de la conquista) con el *M. leprae* presenta haplotipos que confieren mayor susceptibilidad.²³⁻²⁵

4. HIPÓTESIS

Si en la patogénesis de la Lepra participan factores genéticos ubicados en el brazo corto del cromosoma 6, entonces los pacientes con esta enfermedad expresan frecuencias alélicas del HLA diferentes a las de la población sana.

5. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es determinar los alelos HLA DR y DQ en pacientes mexicanos con lepra, originarios de diversas zonas de la república.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Tipo de Estudio:

Se trata de un estudio multicéntrico, comparativo, abierto, prospectivo, transversal y observacional.

6.2. Ubicación Temporal y Espacial.

Se incluyeron pacientes con el diagnóstico de lepra en cualquiera de sus tipos del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, “Centro Dermatológico “Dr. Fernando Latapi”, Hospital Dermatológico “Dr. Pedro López” y del Programa de control de Lepra del Estado de San Luis Potosí de Mayo 2008 a Agosto 2010

6.3. Criterios de Selección

Criterios de Inclusión:

Grupo de estudio

- Pacientes de cualquier sexo que formen parte de los programas de Control de la Lepra en los hospitales de estudio
- Pacientes de cualquier sexo, de diagnóstico reciente que ingresen a formar parte de los programas de control de la lepra de estos hospitales
- Ser Mexicano(a)
- Aceptar el procedimiento de venopunción y análisis de la muestra
- Firmar el Consentimiento informado

Grupo control

- Pacientes de cualquier sexo sanos
- De edad similar al grupo de estudio
- Mexicanos
- Pertenecientes al registro histórico de una muestra homogénea de HLA de pacientes mexicanos²⁵

Criterios de Exclusión

- Pacientes incluidos en los programas de Control y tratamiento de Lepra que no acepten entrar al estudio
- Pacientes en control de lepra que sea extranjeros

Criterios de Eliminación

- Muestra insuficiente
- Perdida de la muestra
- Problemas del procesamiento que no permitan obtener ADN.

6.4. Variables

<u>Independientes</u>			<u>Dependientes</u>		
Variable		Escala	Variable	Escala	
Sexo	H/M	Nominal dicotómica	HLA clase II	DR	Nominal categórica
Edad	18-99 años	Continua		DQ	Nominal categórica

6.5. Tamaño de la Muestra

42 pacientes

6.6. Métodos de Laboratorio

Obtención de ADN a partir de sangre periférica

Lisis y obtención de núcleos

La sangre periférica en EDTA se cambió a un tubo marcado de 50 mL. Se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 minutos a 4°C con rotor 243 en centrifuga refrigerada de la marca Thermo IEC, Modelo Centra CL3R para separar el plasma.

Con una pipeta Pasteur desechable se transfirió cuidadosamente la capa de células blancas “buffy coat” a otro tubo. Se agregó solución de lisis I hasta llenar el tubo y se agita suavemente. Se centrifugó nuevamente a 3,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, desechando el sobrenadante. Este paso se repitió hasta lograr que las células blancas quedaran libres de eritrocitos. Al paquete de células blancas se les agregó solución de lisis II, y se agito para desprender el paquete. Se completa el volumen del tubo con la misma solución de lisis II.

Se centrifugó nuevamente a 3,000 rpm durante 15 min a 4°C, se desecho el sobrenadante y en el fondo del tubo obtuvimos los núcleos.

Obtención de DNA por digestión con proteinasa K

Se resuspendió el botón de leucocitos en 1 mL de SSPE 1X. Se añadió 4 mL de Proteinasa K (300mM/mL) y se dejó incubando toda la noche en baño María de la marca Boekel Grant a 53°C.

Extracción con fenol/cloroformo

Se añadió 4 mL de fenol saturado (volumen equivalente de Proteinasa K). Se agitó por 10 minutos hasta obtener una emulsión completa. Se centrifugó 15 minutos a 3,000 rpm, a 4°C, rotor 243. Al terminar se tomó la fase superior y se pasó a un tubo limpio (sin tomar la interfase) y se realizó una segunda extracción con fenol saturado de la misma manera. La fase superior se pasó a un tubo limpio y se agregó ahora fenol cloroformo se centrifugó de la misma manera. Se agregó cloroformo/alcohol isoamílico, se centrifugó y la fase superior se pasó a un tubo limpio.

Precipitación con isopropanol absoluto

Se añadió 120 μ l de NaCl 5M para obtener una concentración final de 100mM. Se agitó suavemente hasta que el DNA formo un precipitado blanco. El DNA flotante se colecto con la punta de una micropipeta y se colocó en un tubo de 1.5 mL. Se centrifugó 1 minuto a 12,000 xg a 4°C para compactar la pastilla de DNA, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el DNA a temperatura ambiente. Se resuspendió el DNA en 1 mL de TE agitando a 65°C por 3 horas. Se guardó el DNA obtenido en refrigeración a 4°C.

Amplificación del ADN por reacción en cadena de la polimerasa

Preparación de la mezcla de amplificación

Se descongelaron los reactivos a utilizar y se prepararon las siguientes mezclas:

ADN (100ng/4 μ L) 3 μ L

H₂O 57 μ L

A la mezcla anterior se agregó la mezcla maestra con Taq Pol. Se centrifugaron 2 segundos y posteriormente se agregó 40 μ L de la mezcla a cada tubo y 2 gotas de aceite mineral, se centrifugó nuevamente y se inició la amplificación.

Amplificación de las muestras

Se utilizó el termociclador PCR express de la marca Thermo Hybaid a las siguientes temperaturas:

Desnaturalización 95°C/1 minuto

Alineación 58°C/1 minuto

Extensión 72°C/1 minuto

Se repitieron 30 ciclos

Última extensión 72°C/10 minutos

Verificación de la amplificación

Se preparó un gel de agarosa al 2%: Agarosa 4 gm en 200 ml de TAE 1X y bromuro de etidio ($5\mu\text{g}/\mu\text{L}$) por cada 50mL de solución. Se corrieron 12.5 μL de la reacción de amplificación con 3 μL de solución de peso molecular como indicador.

Tipificación

La tipificación de baja resolución por el método de hibridación con sondas específicas de secuencia (PCR-SSOP). La información de los oligonucleótidos y de las sondas que se utilizaron fue tomada de las especificidades para DR y DQ publicadas en el 12º Taller Internacional de Histocompatibilidad.

6.7. Análisis Estadístico

La frecuencia de alelos se calculó por conteo directo de los genes. La significancia de la diferencia en la frecuencia génica de alelos del *loci* HLA-DR y HLA-DQ se analizó utilizando tablas de contingencia de 2x2 para calcular χ^2 , con poder de 95%. Los valores nominales de p fueron corregidos por Bonferroni en los casos de HLA-DRB1 y por Yates en HLA-DQB1. Un valor de $p < 0.05$ se aceptó como estadísticamente significativo. La fuerza de las asociaciones se estimó calculando la razón de Momios (OR).

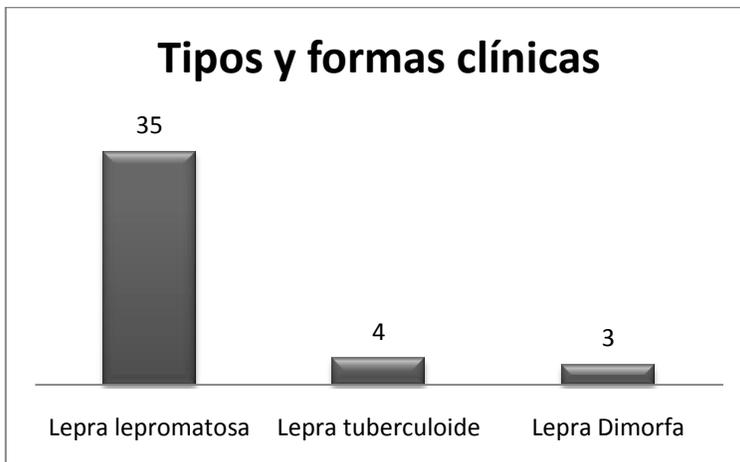
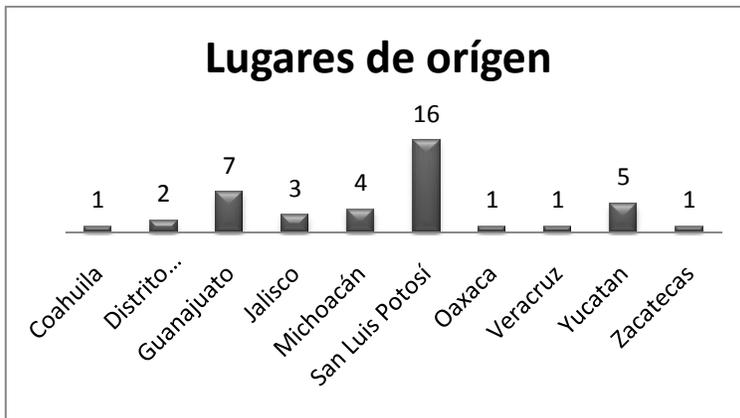
El análisis estadístico se realizó utilizando la aplicación STATCALC contenida en el software EPI-INFO™ 6 (Centers for Disease Control and Prevention Atlanta).

7. RESULTADOS

Al final del estudio se logró revisar a 43 pacientes, en uno de ellos fue muy difícil la obtención de una muestra adecuada por lo que no fue incluido en el estudio. Así mismo se encontraron 6 pacientes que no quisieron formar parte del mismo.

De los 42 pacientes, veintidós fueron mujeres y veinte hombres, los rangos de edad de fueron desde 41 hasta 90 años, encontrándose la mayoría de los pacientes en el rango entre 70-79 (30.9%). Fueron 10 las ciudades de origen de los pacientes en estudio: Coahuila, Distrito Federal, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, San Luis Potosí, Veracruz, Yucatán y Zacatecas.

La mayoría de los tipos estuvieron en el polo lepromatoso con 35 pacientes (83.3%), en el polo tuberculoide 4 pacientes (9.5%) y 3 pacientes en casos interpolares o dimorfos (7.2%)



Se realizó genotipificación para HLA-DRB1 y HLA-DQB1. De los 18 alelos analizados, dos alelos mostraron una frecuencia con una diferencia significativa entre los pacientes y el grupo control.

La tabla 1 y 2 resumen la frecuencia de los alelos HLA-DRB1 y HLA-DQB1 en los pacientes con lepra y la población control respectivamente, así como los resultados del análisis de asociación. La frecuencia del alelo DRB1*15 entre los pacientes fue de 0.19 (16/84), la cual es significativamente mayor que la frecuencia de 0.05 (45/762) observada en los pacientes sanos ($pC= 0.0004$). Tabla N.1.

Tabla 1.
Frecuencias de moléculas HLA DR en pacientes con Lepra.

<i>Locus</i>	Pacientes N=84		Controles N=762		<i>pC</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>
	<i>n</i>	<i>fg</i>	<i>n</i>	<i>Fg</i>			
DR4	19	0.226	196	0.257	ns	ns	ns
DR15	16	0.190	45	0.059	0.0004	3.7	1.9-7.2
DR8	11	0.130	93	0.122	ns	ns	ns
DR14	9	0.107	67	0.087	ns	ns	ns
DR13	7	0.083	66	0.086	ns	ns	ns
DR3	6	0.071	54	0.070	ns	ns	ns
DR1	5	0.059	62	0.081	ns	ns	ns
DR7	5	0.059	69	0.090	ns	ns	ns
DR9	2	0.023	7	0.009	ns	ns	ns
DR10	2	0.023	12	0.015	ns	ns	ns
DR11	1	0.011	46	0.060	ns	ns	ns
DR16	1	0.011	38	0.049	ns	ns	ns

pC= valor de p corregido por Bonferroni.

En contraste, la frecuencia del alelo HLA-DQB1*0301 fue significativamente menor en la población de pacientes 0.09 (8/84) que la frecuencia de 0.20 (158/762) en controles ($pC=0.02$). Tabla N. 2.

Tabla 2.
Frecuencias de moléculas HLA DQ en pacientes con Lepra.

<i>Locus</i>	Pacientes		Controles		<i>pC</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>
	<i>n</i>	<i>fg</i>	<i>n</i>	<i>fg</i>			
DQ5	17	0.202	107	0.140	ns	ns	ns
DQ6	17	0.202	88	0.115	ns	ns	ns
DQ8	17	0.202	181	0.237	ns	ns	ns
DQ4	13	0.154	93	0.122	ns	ns	ns
DQ2	12	0.142	124	0.162	ns	ns	ns
DQ7	8	0.095	158	0.207	0.02	2.4	1.1-5.6

pC= valor de p corregido por Yates

Posteriormente se analizó la asociación de los alelos con los subtipos clínicos, sin encontrarse diferencias significativas entre los tipos lepromatoso y tuberculoide.

8. DISCUSION

En este trabajo se encontró que en una muestra homogénea de pacientes mexicanos con lepra el alelo HLA-DRB1*15 puede ser factor de susceptibilidad para el desarrollo de lepra y un efecto probablemente protector el alelo HLA-DQB1*0301.

Ya en otros estudios se ha demostrado que este mismo alelo confiere susceptibilidad a la población brasileña¹⁵ con una frecuencia similar a la observada en nuestro país (15% vs 19%), pero menor que la observada en china (32%)²⁶, India (31%)²⁷ y Japón²⁸.

En otras poblaciones se han encontrado alelos protectores para la enfermedad como el HLA-DRB1*09 en pacientes chinos²⁶, el HLA- DQB1*0201/0202/0203 en pacientes argentinos²². Dentro de los últimos reportes en la población de Taiwan se encontró una asociación protectora con el HLA-DRB1*0405²⁹. Sin embargo es la primera vez en la que se encuentra evidencia significativa de que el alelo HLA-DQB1*0301 puede estar asociado a protección contra la infección por el *M. leprae* (pC=0.02).

Las manifestaciones de la enfermedad representan un espectro inmunológico que van de la respuesta tipo Th1 a la tipo Th2. En la defensa al *M. leprae*, los macrófagos juegan un rol esencial en los mecanismos de lisis bacteriana, pero requieren la presencia de citocinas como la IL-2 y el INF- γ , las cuales son secretadas por linfocitos para eliminar efectivamente a los microorganismos. Se ha demostrado que la inmunidad asociada al HLA-DR puede ser crucial en la respuesta inmune adaptativa a la infección donde juega un gran papel en la presentación de antígenos del *M. leprae* a las células T en el paciente con lepra²⁷. Por otra parte se cree que la disminución del DQB1 confiere una resistencia innata del macrófago debido a una capacidad bacteriostática muy eficiente³¹ y probablemente la inducción de una respuesta inmune celular específica se relaciona inversamente a la expresión de moléculas DQ asociadas a péptidos bacterianos para hacerlos visibles al receptor de células T.

9. CONCLUSIONES

Es útil estudiar los genes que controlan la respuesta inmune en pacientes con lepra y dicha respuesta está influida por la región llamada complejo principal de histocompatibilidad (MHC) dentro de la cual se ubican tanto los genes del HLA (DR y DQ) como los genes de las citocinas que regulan la respuesta inflamatoria como son: el factor de necrosis tumoral, los genes del complemento y las proteínas del choque térmico.

Los genes del complejo mayor de histocompatibilidad se encuentran entre los principales candidatos que pueden explicar el proceso coevolutivo hospedero/agente infeccioso, por tanto determinar los alelos asociados a la lepra es el primer paso para comprender la interacción huésped/agente infeccioso a nivel molecular.

10. PERSPECTIVAS

- a) Utilizar esta información con un diseño que nos permita seguir a los pacientes para determinar si los diferentes polos de la enfermedad siguen un patrón genético.
- b) Aumentar el tamaño de muestra, particularmente en cada región geográfica.
- c) Realizar alta resolución de los alelos involucrados para conocer con más detalle los genes involucrados

11. BIBLIOGRAFIA

1. Terencio de las Aguas, J. Lecciones de leprología. Soberana y Militar orden de Malta. España: Fontilles 1973.
2. Rodríguez O. La lepra y los niños. [Tesis de postgrado Universidad Nacional Autónoma de México; 1949
3. González Urreña J. La Lepra en México. México, DF: "El Ateneo" 1941.
4. Francisco Javier López-Antuñano. Salud Publica de México 1998;40(1):1-10
5. World Health Organization. Weekly epidemiological record. 2008;83:293-300
6. World Health Organization 2008. URL disponible en: <http://www.who.int/lep/situation/prevalence/en/print.html>
7. Organización Panamericana de la Salud. Situación de la Lepra en las Américas 2007
8. Arenas R. Atlas de Dermatología 4ª Ed. México DF: McGraw Hill. 2009.
9. Bryceson A, Pfaltzgraff R, Leprosy 2nd Ed. Churchill Livingstone. 1979.
10. De Ovando Pérez De Salazar Francisco. Evaluación clínica y bacteriológica de la asociación de Clofazimina-Rifampicina en el tratamiento del paciente con lepra lepromatosa sulfonoresistente. [Tesis de posgrado. Universidad Nacional Autónoma de México; 1981.
11. Saul, Amado. Lecciones de Dermatología. México DF: Méndez Editores. 2006.
12. Távora Mira M. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. Microbes and Infection 2006; 8:1124-1131.
13. McDougall A. El enfoque espectral. Resumen. En XI Congreso Internacional de la Lepra. México DF: 1978: 65-66.
14. Jan Klein, Akie Sato. The HLA system. First of two parts . N Eng J Med 2000;343(10):702-709.
15. Vanderborght PR, Pacheco AG, Moraes ME. HLA-DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. Genes and Immunity 2007;8:320-324.
16. Meyer CG, Jürgen M, Klaus S. Human leukocyte antigens in tuberculosis and leprosy. Trends microbiol 1998;6:148-154.

17. Joko S, Numaga, Kawashima H, Namisato M, Maeda H. Human leukocyte antigens in forms of leprosy among Japanese patients.. *Int J Lepr* 2000; 68: 49-52.
18. M. Kocak, M. Balci, B. PenÇe, Kundakci N. Associations between human leukocyte antigens and leprosy in the Turkish population. *Clinical and experimetal Dermatol* 2002; 27: 235-39.
19. Todd JR, West BC, McDonald JC. Human leukocyte antigen and leprosy: study in northern Louisiana and review. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 63-74.
20. Gorodezky C, Alaez C, Munguía A, Cruz R, Vazquez A, Camacho A, et al. Molecular mechanisms of MHC linked susceptibility in leprosy: towards the development of synthetic vaccines. *Tuberculosis* 2004;84:82-92.
21. Da Silva Samira, Mazini Priscila, Reis Pamela. HLA-DR and HLA-DQ alleles in patients from the south of Brazil: markers for leprosy susceptibility and resistance. *BMC Infectious diseases* 2009;9:134.
22. Patricia María Fabiana Motta, Norma Cech, Claudia Fontan, Manuel Fernando Giménez, Norma Lodeiro, Karina Marinic, et al. Papel de las moléculas HLA-DR y HLA-DQ en la lepra multibacilar y paucibacilar en la provincia del Chaco; Argentina. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25(10):627-31.
23. Vega-Memije M, Sáez M, Cortés-Franco R, et al. Analisis de HLA-DR en pacientes mexicanos con pénfigo. *Gac Méd Méx* 2001:137:535-40.
24. 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.
25. Rodrigo Barquera, Joaquín Zúñiga, Raquel Hernández-Díaz, Víctor Acuña-Alonzo, Karla Montoya-Gama, Juan Moscoso et al. HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico. *Molecular Immunology* 2008;45:1171-1178.
26. Furen Zhang, Hong Liu, Shumin Chen, Changyuang Wang, Chuanfu Zhu, Ling Zhang et al. Evidence for an association of HLA-DRB1*15 and DRB*09 with leprosy and the impact of DRB1*09 on disease onset in a Chinese Han population. *BMC Med Genet* 2009;10:133.

27. Tosh K, Ravikumar M, Bell JT, Meisner S, Hill AV, Pitchappan R. Variation in MICA genes and enhanced susceptibility to paucibacillary leprosy in South India. *Hum Mol Genet* 2006;15:2880-2887.
28. Joko S, Numaga J, Kawashima H, Namisato M, Maeda H. Human leukocyte antigens in forms of leprosy among Japanese patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2000; 1:49-56.
29. Hsieh NK, Chu CC, Lee NS, Lee HL, Lin M. Association of HLA-DRB1*0405 with resistance to multibacillary leprosy in Taiwanese. *Hum Immunol.* 2010;7:712-6.
30. Gorodezky C, Alaez C, Munguía A, Cruz R, Vazquez A, Camacho A, et al. Molecular mechanisms of MHC linked susceptibility in leprosy: towards the development of synthetic vaccines. *Tuberculosis* 2004;84:82-92.

12. GLOSARIO

ADN polimerasa.- Enzima que replica las hebras de ADN.

Alineación.- Fase de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en la cual los oligonucleótidos se unen a sitios específicos en cada hebra del ADN.

Antígeno.- Sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmunitaria.

CMH.- Complejo mayor de histocompatibilidad.

Desnaturalización.- Fase de la reacción en cadena de la polimerasa en la que se separa la doble hélice del DNA en 2 hebras sencillas.

dNTPs.- Desoxinucleotidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) estos proveen los nucleótidos a la reacción para la síntesis de ADN

Estudio abierto.- Todos los investigadores conocen las variables del experimento.

Estudio comparativo.- Estudia dos o más muestras.

Estudio multicéntrico.- Estudio clínico que se realiza en más de una institución médica.

Estudio observacional.- El investigador no modifica el fenómeno

Estudio prospectivo.- Los datos obtenidos serán de eventos que se presenten en el futuro.

Estudio transversal.- Los datos se obtienen sólo una vez por cada individuo o no se relacionan entre sí.

Extensión.- La ADN polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde añadiendo los dNTP's complementarios en dirección 5'→ 3', uniendo el grupo 5'- fosfato de los dNTPs con el grupo 3'- hidroxilo del final de la hebra de ADN creciente (la cual se extiende). La temperatura para este paso depende de la ADN polimerasa que usemos. Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad está en 75-80 °C. El tiempo de extensión depende tanto de la ADN polimerasa usada como de la longitud del fragmento de ADN que se va a amplificar. Hay una regla comúnmente usada: en su temperatura óptima, la polimerasa de ADN polimerizará mil bases en un minuto.

Glea.- Material gelatinoso que provoca la adherencia del *Mycobacterium leprae* en colonias.

Globias.- Agrupaciones de *M. leprae*, observadas en las baciloscopias positivas de pacientes bacilíferos.

Haplotipo.- Se define como la constitución genética de un cromosoma individual. Un haplotipo (del griego *haploos* = simple) es una combinación de alelos ligados a múltiples *loci* que se transmiten juntos. También se puede definir como un conjunto de genes que determinan un cierto fenotipo.

HLA.- Siglas en inglés para antígeno leucocitario humano (Human Leukocyte Antigen).

OMS.- Organización Mundial de la Salud.

PCR.- Siglas en inglés para reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction).

Taq-polimerasa.- ADN polimerasa aislada por primera vez de la bacteria *Thermus aquaticus* en 1976. Esta bacteria vive en ambientes con altas temperaturas por esto las enzimas que se extraen de ella son termoestables.

Termociclador.- También conocido como máquina de PCR o reciclador térmico de PCR es un aparato usado en Biología Molecular que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para una reacción en cadena de la polimerasa de amplificación de ADN o para reacciones de secuencia con el método de Sanger. El modelo más común consiste en un bloque de resistencia eléctrica que distribuye a través de una placa una temperatura homogénea durante tiempos que pueden ser programables, normalmente con rangos de temperatura de 4 °C a 96 °C. Dado que las reacciones incubadas en el aparato son en soluciones acuosas, suelen incluir una tapa calentada constantemente a 103 °C para evitar la condensación de agua en las tapas de los tubos donde ocurre la reacción, y así evitar que los solutos se concentren, que de otra forma modificaría las condiciones óptimas para la enzima polimerizante y la termodinámica del apareamiento de los iniciadores.

13. FIGURAS



Cuadro 1. Manifestaciones agudas de lepra tuberculoide.- Manchas hiperpigmentadas, con escama en la superficie, anestésicas y anhidróticas.



Figura 2. Manifestaciones tardías de la lepra lepromatosa difusa.- Madarosis.



Figura 3. Manifestaciones tardías de la lepra lepromatosa nodular.- lesión bilateral del nervio mediano y amputaciones distales.



Figura 4. Reacción de Mitsuda.- Levantamiento de la piel de 8 mm de diámetro a las 3 semanas de la aplicación de 0.1 ml de lepromina en una paciente con LT.

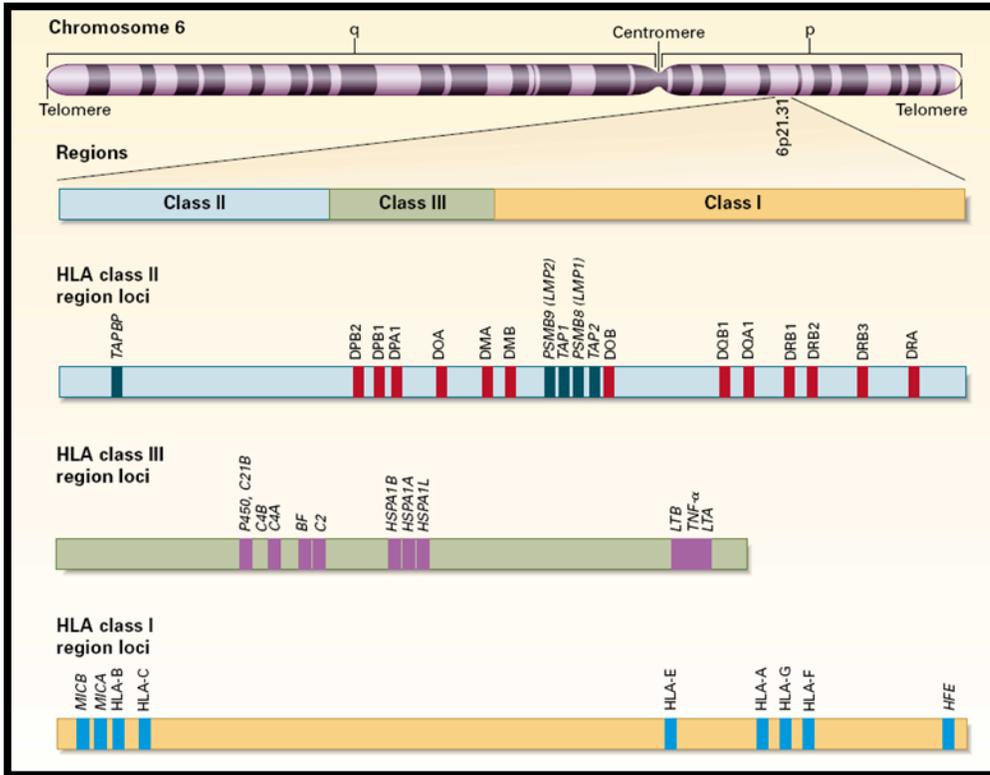


Figura 5. Localización y organización del complejo HLA en el cromosoma 6

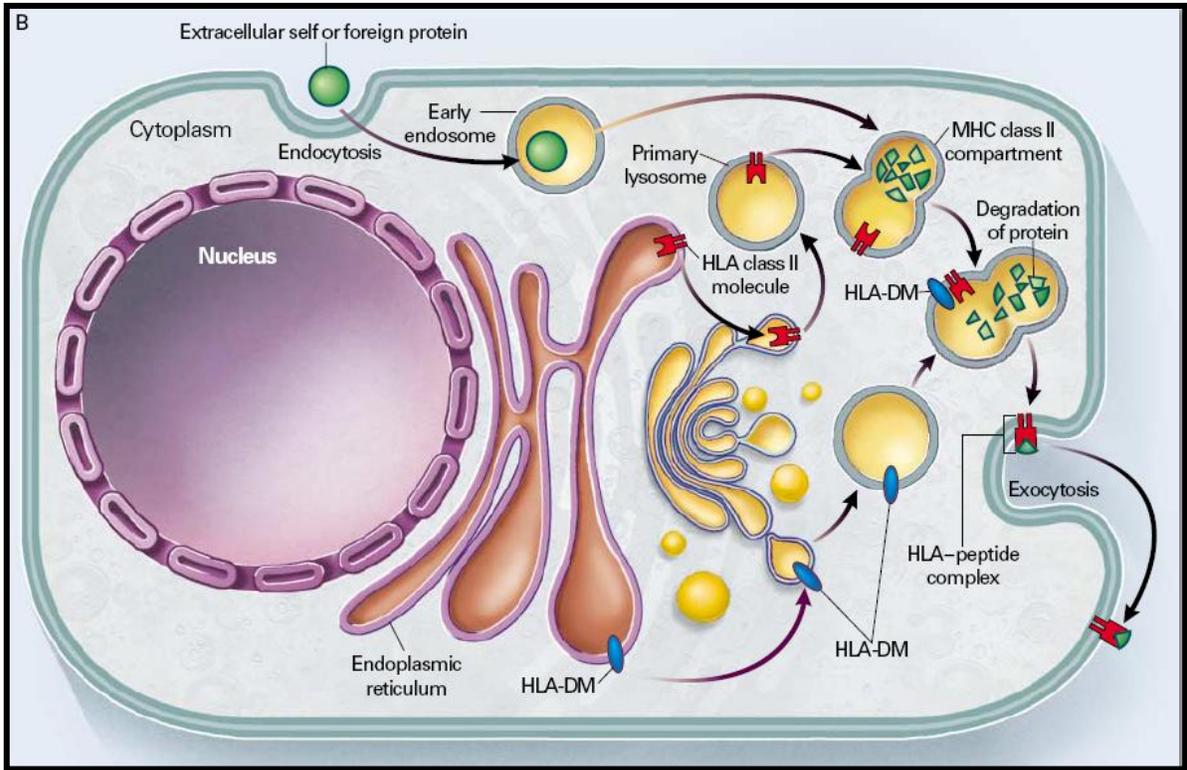


Figura 6.- Procesamiento de antígeno.- Procesamiento de proteínas extracelulares.

Anexo N. 1

Hoja de captura de datos Estudio HLA en lepra

Numero de Paciente.

Este apartado será llenado por el investigador

Expediente:

Hospital:

/ / . Tipo de presentación de la enfermedad: L T

Nombre: _____

Edad al Dx : Masculino (Edad) Femenino(Edad) Tel. _____

E-mail: _____ Residencia _____

Lugar de nacimiento _____

Lugar de nacimiento: 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:

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

Anexo N. 2

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

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

- I. Se me ha explicado que padezco la enfermedad conocida como Lepra y se me propone participar en el proyecto "Determinación de moléculas HLA tipo II en pacientes mexicanos con Lepra, en diferentes zonas de la republica mexicana" para estudiar las moléculas que pueden tener influencia en el desarrollo de este padecimiento.
- II. Se me ha informado que se tomara una muestra de sangre de 10 ml, esta toma es adicional al estudio que requiere mi enfermedad, cuyo único objetivo será obtener los HLA tipo II DQ y DR, después de esto, la muestra será desechada.
- III. Se me explico que la toma de sangre de 10 ml (una jeringa mediana) puede dar como resultado moretones, sangrados e infección, estos se resolverán con las indicaciones del médico en término de una o 2 semanas.
- IV. Los resultados de este estudio ayudaran a determinar si hay un factor heredado en la presentación de la enfermedad de mi caso y el de otros pacientes
- V. Se me ha asegurado que puedo preguntar hasta mi complacencia todo lo relacionado con el estudio y mi participación
- VI. Se me aclaró que puedo abandonar el estudio en cuanto yo lo decida, sin que ello afecte mi atención de parte del médico o del hospital.
- VII. Autorizo la publicación de los resultados de mi estudio a condición de que en todo momento se mantendrá en secreto profesional y que no se publicara mi nombre o revelara mi identidad.
- VIII. Los estudios de laboratorio que se practicaran no tendrán ningún costo para mí.

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 moléculas HLA tipo II en pacientes mexicanos con Lepra, en diferentes zonas de la republica mexicana.

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
Dr. Sergio Miguel Mercado Ceja

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

Para preguntas o comentarios comunicarse con el Dr. Octavio Sierra Martínez, presidente de las Comisiones de Ética y de Investigación al (01 55) 4000-3050

Anexo N. 3
Secretaría de Salud. Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTE CONTROL

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

- I. Se me ha explicado y se me propone participar en el proyecto “Determinación de moléculas HLA tipo II en pacientes mexicanos con Lepra, en diferentes zonas de la republica mexicana” para servir como paciente control.
- II. Se me ha informado que se tomara una muestra de sangre de 10 ml, esta toma es adicional al requerido para donar sangre, cuyo único objetivo será obtener los HLA tipo II DQ Y DR, después de esto, la muestra será desechada.
- III. Se me explico que la toma de sangre de 10 ml (una jeringa mediana) puede dar como resultado moretones, sangrados e infección, estos se resolverán con las indicaciones del médico en término de una o 2 semanas.
- IV. Los resultados de este estudio ayudaran a determinar si hay un factor heredado en la presentación de la enfermedad de otros pacientes
- V. Se me ha asegurado que puedo preguntar hasta mi complacencia todo lo relacionado con el estudio y mi participación
- VI. Se me aclaró que puedo abandonar el estudio en cuanto yo lo decida, sin que ello afecte mi atención de parte del médico o del hospital.
- VII. Autorizo la publicación de los resultados de mi estudio a condición de que en todo momento se mantendrá en secreto profesional y que no se publicara mi nombre o revelara mi identidad. VIII. Los estudios de laboratorio que se practicaran no tendrán ningún costo para mí.

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 moléculas HLA tipo II en pacientes mexicanos con Lepra, en diferentes zonas de la republica mexicana.

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
Dr. Sergio Miguel Mercado Ceja

Este documento se extiende por duplicado, quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o de su representante legal y el otro en poder del investigador.
Para preguntas o comentarios comunicarse con el Dr. Octavio Sierra Martínez, presidente de las Comisiones de Ética y de Investigación al (01 55) 4000-3050

PACIENTES CONTROL (BANCO DE SANGRE)