



Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la Salud

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador
Zubirán"

HLA-DQA1, DQB1 Y DRB1 EN LUPUS ERITEMATOSO CUTÁNEO Y LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

Tesis que para obtener el título de:

Maestría en Ciencias Médicas

Presenta:

Dra. Alma Angélica Rodríguez Carreón

Tutor:

Dr. Julio Granados Arriola

México, D.F. Marzo de 2012



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.

Co-tutoras:

Dra. María Elisa Vega Memije

Dermatopatóloga, Subdirectora de Investigación Médica del Hospital
General Dr. Manuel Gea González

Dra. María Angélica Alfonsina Olivo Díaz

Jefa del Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad del
Hospital General Dr. Manuel Gea González

A mi compañero impaciente y a mis grandes maestros...

Contenido

Glosario.....	5
Resumen.....	7
Introducción.....	8
Antecedentes.....	20
Problema y justificación.....	28
Pregunta de investigación.....	28
Objetivo.....	29
Hipótesis.....	29
Diseño.....	29
Material y Métodos.....	30
Análisis estadístico.....	41
Resultados.....	45
Discusión.....	55
Conclusión.....	59
Bibliografía.....	59
Carta de consentimiento informado.....	Anexo 1
Material y reactivos para la extracción de DNA.....	Anexo 2
Reactivos para la amplificación de DNA.....	Anexo 3
Sondas utilizadas para la tipificación de alelos.....	Anexo 4

Glosario

Alelo: Variantes del mismo gen, ocupando el mismo locus en cromosomas homólogos y gobernando las variantes en producción del mismo producto genético.

ANAs: Anticuerpos antinucleares.

Anti-DNA_{dc}: Anticuerpos anti-DNA de doble cadena.

CLIP: Del inglés **C**Lass II associated **I**nvariant **P**eptide.

Dímero: De dos monómeros.

Frecuencia génica o frecuencia alélica: La proporción de un alelo en particular con respecto a todos los alelos existentes para un locus determinado en una población específica. La suma de las frecuencias alélicas en una población siempre es 1 (o 100%).

Frecuencia genotípica: La proporción en la que se observan los genotipos de una población para un locus determinado. Siendo p la frecuencia alélica de un alelo (por ejemplo "A") y q la frecuencia del otro alelo del mismo gen (por ejemplo "a"), se tiene que las frecuencias genotípicas serán p^2 para el genotipo "AA", $2pq$ para el heterocigoto "Aa" y q^2 para "aa", de tal forma que: $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$.

Heterodímero: Con dos monómeros distintos.

HLA: Antígeno leucocitario humano (del inglés Human Leukocyte Antigens).

HLA-DR2: Alelos HLA-DRB1*15 y DRB1*16

HLA-DR5: Alelos HLA-DRB1*11 y DRB1*12

HLA-DR6: Alelos DRB1*13 y DRB1*14

Ii: Cadena invariable.

KDa: Kilodaltons.

LEC: Lupus eritematoso cutáneo.

LECA: Lupus eritematoso cutáneo agudo.

LECC: Lupus eritematoso cutáneo crónico.

LECSA: Lupus eritematoso cutáneo subagudo.

LED: Lupus eritematoso discoide.

LES: Lupus eritematoso sistémico.

Ley de Hardy-Weinberg: Esta ley establece que en una población suficientemente grande, en la que los apareamientos se producen al azar y que no se encuentra sometida a mutación, selección o migración, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de una generación a otra, una vez alcanzado un estado de equilibrio que en loci autosómicos se alcanza tras una generación.

Loci: Plural de locus.

Locus: Región específica en el genoma que indica la posición de un gen.

MHC: Complejo principal de Histocompatibilidad (del inglés Major Histocompatibility Complex).

Kb: Kilobases.

Monómero: Del griego "mono" uno y "meros" parte. La forma más simple de una molécula capaz de reaccionar con otra molécula similar para formar una molécula más grande.

Nonamérico: De nueve monómeros.

SSOP: Sondas de oligonucleótidos específicos de secuencia (del inglés **S**equence **S**pecific **O**ligonucleotide **P**robes).

SSP: Iniciadores específicos de secuencias, del inglés **S**equence **S**pecific **P**rimers.

Trimérico: De tres monómeros.

Resumen

Introducción y objetivo: El lupus eritematoso es una enfermedad autoinmune con un amplio espectro de manifestaciones clínicas en donde se distinguen la forma sistémica (LES) y la forma cutánea (LEC). Como una de las asociaciones genéticas reportadas con más fuerza es el HLA, el objetivo de este estudio fue comparar los alelos del HLA-DQA1, DQB1 y DRB1 entre LEC y LES.

Material y métodos: En este estudio transversal comparativo se incluyeron 31 pacientes con LEC y 41 pacientes con LES, de los cuales se tipificaron los alelos específicos del HLA-DQA1, DQB1 y DRB1. Se compararon las frecuencias alélicas mediante la prueba de χ^2 con corrección de Yates, se calculó la razón de prevalencias y la OR de prevalencias de los alelos con sus respectivos IC95%.

Resultados: Los pacientes con LEC mostraron una frecuencia significativamente mayor de los alelos HLA-DQA1*03:01:01 ($\Delta= 0.25$, $p_c=0.002$, RP= 2.4, OR= 3.5), HLA-DQB1*03:02 ($\Delta= 0.219$, $p=0.006$, RP= 2.3 y OR= 3) y HLA-DR4 ($\Delta= 0.22$, $p_c=0.011$, RP= 2.3, OR= 3.1), así como del haplotipo HLA-DQA1*03:01:01-DQB1*03:02 ($\Delta= 0.216$, $p=0.006$, RP= 2.3 y OR= 3.1). Mientras que los pacientes con LES mostraron mayor frecuencia de HLA-DQ6 ($\Delta= 0.123$, $p_c= 0.03$, RP= 0.3, OR= 0.2) y HLA-DR6 ($\Delta= 0.2$, $p_c=0.009$, RP= 0.4 y OR= 0.3).

Conclusión: Este estudio sugiere que el LEC y el LES siguen mecanismos fisiopatogénicos distintos donde algunos alelos del HLA, de origen mexicano, pudieran jugar un papel importante.

Introducción

El lupus eritematoso es una enfermedad autoinmune inflamatoria y crónica, caracterizada por la presencia de complejos inmunitarios y autoanticuerpos dirigidos contra estructuras de la piel, las mucosas, las serosas, las articulaciones, los riñones, el sistema nervioso central, vascular y/o hematológico. Dicha afección ocurre a diferentes grados de intensidad, con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, desde el lupus eritematoso limitado solo a un órgano como la piel, hasta la afección de diferentes órganos y sistemas con anticuerpos circulantes, conocida como lupus eritematoso sistémico (LES).¹⁻⁴

Lupus eritematoso cutáneo y sistémico

El lupus eritematoso cutáneo (LEC) se clasifica en agudo, subagudo, intermitente (túmido) y crónico. El **lupus eritematoso cutáneo agudo (LECA)** puede ser localizado o diseminado. La forma localizada típica es el eritema malar en alas de mariposa, el cual es simétrico y respeta los surcos nasogenianos (figura 1). Las formas diseminadas son menos frecuentes y afectan áreas fotoexpuestas de cara, tronco y extremidades, denominándose “dermatitis lúpica fotosensible”, con tres formas de presentación clínica: 1) Máculas, pápulas y placas eritematoescamosas; 2) Erupción morbiliforme o rash lúpico y 3) Lupus vesículo-ampolloso.^{2, 3, 5-7}

El **lupus eritematoso cutáneo subagudo (LECSA)** presenta placas eritematoescamosas psoriasiformes, anulares o policíclicas, dispuestas en áreas fotoexpuestas de cuello, tronco y extremidades superiores (Figura 2).^{2, 3}

El **lupus eritematoso cutáneo intermitente (lupus tómico)**, se caracteriza por placas eritemato-edematosas que se observan con mayor frecuencia en mejillas (figura 3).²

El **lupus eritematoso cutáneo crónico (LECC)** Incluye al lupus discoide (LED) y al lupus profundo.^{2, 5} El LED es la forma de LEC más frecuente y se observa en cara, piel cabelluda, orejas, V del cuello y superficies extensoras de los miembros torácicos. Las placas típicas de LED tienen eritema, escama y atrofia (figura 4).^{3, 7} El *lupus profundo* se caracteriza por la presencia de nódulos subcutáneos que dejan foveas en cabeza, tronco y proximidad de extremidades (figura 5).^{3, 6}



Figura 1. Eritema malar “en alas de mariposa”



Figura 2. Lupus eritematoso cutáneo subagudo



Figura 3. Lupus tómico

Figura 4. LED clásico



Figura 5. Nódulo subcutáneo y foveas de lupus profundo

En el lupus eritematoso cutáneo agudo, subagudo, tímido y discoide es posible observar mucina en la dermis, sin embargo existen otros hallazgos tanto clínicos como histológicos que permiten la distinción entre ellos: El LECA tiene necrosis de queratinocitos, telangiectasias, extravasación de eritrocitos y neutrófilos en el infiltrado inflamatorio; el LECSA presenta edema con daño de interfaz vacuolar y liquenoide alternantes; el lupus tímido tiene un infiltrado inflamatorio linfocitario con mayor cantidad de mucina en la dermis y el LED muestra atrofia de la epidermis, vacuolización de la capa basal, engrosamiento de la membrana basal de la epidermis y del epitelio folicular, mucina entre las fibras de colágena de la dermis y un infiltrado inflamatorio perivascular superficial y perianexial por linfocitos (figura 6).^{2, 3, 7-9}

El lupus profundo se denomina así porque el infiltrado inflamatorio está en la dermis profunda y el tejido celular subcutáneo, a lo que se denomina paniculitis lúpica (figura 7).^{3, 8, 9}

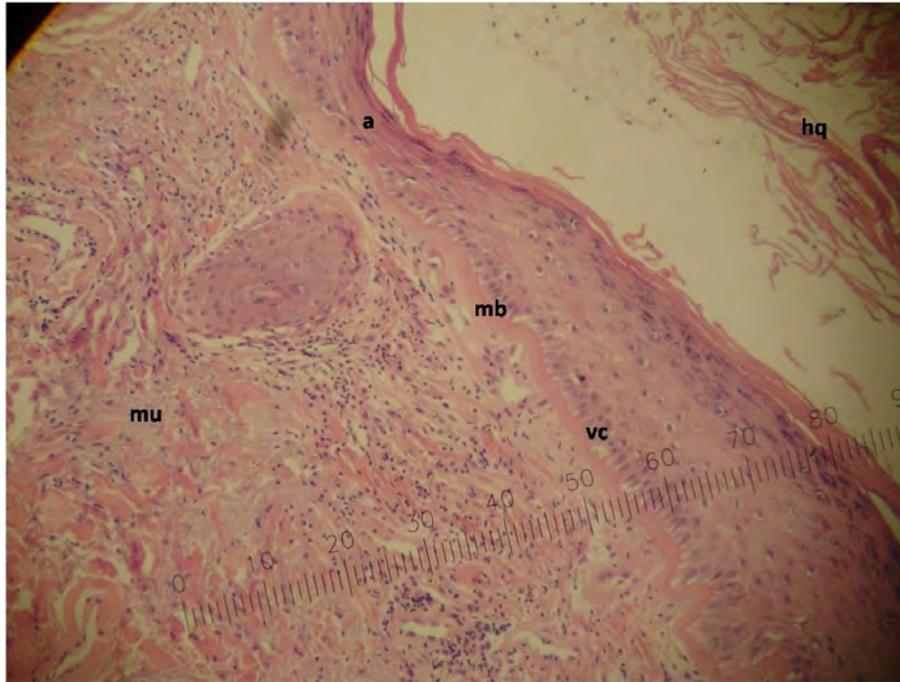


Figura 6. Imagen histológica de LED con (hq) hiperqueratosis, (a) atrofia de la epidermis, (vc) vacuolización de la capa basal, (mb) engrosamiento de la membrana basal y (mu) mucina en la dermis.

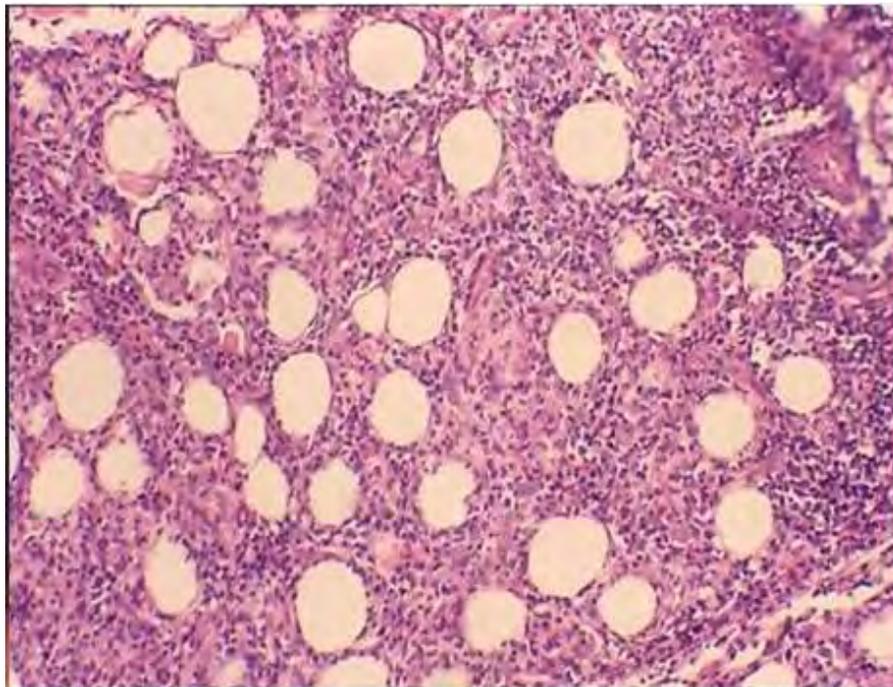


Figura 7. Imagen histológica de paniculitis lúpica

De acuerdo con los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología, un caso de **LES** debe cumplir con cuatro o más de los siguientes criterios: ¹⁰

1. Eritema malar que respeta los pliegues nasolabiales.
2. Placas de lupus discoide.
3. Fotosensibilidad.
4. Úlceras orales o nasofaríngeas indoloras.
5. Artritis no erosiva en dos o más articulaciones periféricas, caracterizada por sensibilidad a la palpación, edema o derrame articular.
6. Serositis, la cual incluye pericarditis y/o pleuritis.
7. Proteinuria persistente mayor a 3 cruces o más de 0.5 g/día y/o cilindros celulares.
8. Convulsiones y/o psicosis.
9. Anemia hemolítica, leucopenia menor de 4000/mm³, linfopenia menor de 1300/ mm³ y/o trombocitopenia menor de 100 000/ mm³
10. Anticuerpos anti-DNA nativo, anti-Sm, antifosfolípidos (anticardiolipina IgM o IgG, anticoagulante lúpico y VDRL falso positivo).
11. Anticuerpos antinucleares.

Estos criterios deben ser aplicados con cautela en los pacientes con LEC, ya que es muy fácil que cumplan cuatro de estos criterios y, como no se considera la confirmación histológica de las lesiones cutáneas, son catalogados erróneamente como LES.^{3, 11}

Prácticamente todos los casos de LECA forman parte de LES y cuando se exacerban indican actividad.^{2,11} Los pacientes con LECSA suelen tener recurrencias intermitentes y hasta un 15%, especialmente los hombres que presentan la forma papuloescamosa, desarrolla nefropatía, anticuerpos antinucleares, anti-DNA de doble cadena y leucopenia.³ Está reportado que entre el 5 y el 10% de los casos con LED y entre el 10 y el 50% de los pacientes con lupus profundo desarrollan LES, especialmente durante los primeros 5 años de evolución,¹²⁻¹⁵ pero la mayor parte persiste con la

enfermedad limitada a la piel, siendo su principal problema el estético, ya que tanto el LED como el lupus profundo dejan cicatrices.^{3, 11, 12}

Debido a la posibilidad de desarrollar LES, una vez que se diagnostica LEC en un paciente debe solicitarse biometría hemática completa, proteinuria de 24h, anticuerpos antinucleares, anti-DNA de doble cadena, anti-Sm y evaluación por parte de Reumatología. El seguimiento debe ser semestral y posteriormente anual,³ prestando especial atención en la presencia de linfopenia, anticuerpos antinucleares a títulos $\geq 1:320$, patrón homogéneo o moteado fino, y anticuerpos anti-DNA de doble cadena y anti-Sm, ya que son los principales marcadores de evolución a LES.¹³⁻¹⁷

HLA

El Complejo principal de Histocompatibilidad (MHC, del inglés: Major Histocompatibility Complex) en el humano se conoce como complejo HLA (del inglés: Human Leukocyte Antigens), el cual se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y abarca aproximadamente 3600 Kb. Este complejo genético es el más polimórfico e induce y regula la respuesta inmunológica, discriminando lo propio de lo extraño. Se divide en tres regiones denominadas clase I, clase II y clase III (Figura 8).¹⁸⁻²²

La región clase I tiene una longitud aproximada de 1500 Kb y está conformada por 17 genes, de los cuales sólo se transcriben 6. Esta región codifica para los antígenos clásicos HLA-A, -B y -C, los cuales presentan péptidos a las células T CD8+ y se encuentran ampliamente distribuidos en las membranas de todas las células nucleadas, con densidad particularmente alta en los linfocitos T y B, pero ausentes en los eritrocitos y los espermatozoides. Los genes clase I no clásicos son el HLA-E, F, G, H y X; no son polimórficos y se expresan en el período embrionario para modular la maduración y el mantenimiento intrauterino del feto.^{20, 23}

La región clase II abarca 1000 Kb y tiene 3 subregiones: DP, DQ y DR, además de los genes DMA, DMB, DNA, DOB, LMP2, LMP7, TAP1 y TAP2. La subregión DP está localizada en el extremo centromérico, la DR en el telomérico y la DQ en el centro (figuras 8 y 9). La subregión DR está formada por 10 loci: Un locus corresponde al DRA, que es poco polimórfico, y los nueve restantes al DRB, de los cuales sólo se expresan el DRB1, 3, 4 y 5. El DRB1 codifica para las cadenas DR β 1, las más polimórficas. La subregión DQ tiene cuatro loci: DQA1, DQA2, DQB1 y DQB2, de los cuales sólo se expresan DQA1 y DQB1, que codifican para las cadenas α y β de las moléculas DQ. En la región DP hay dos genes, DPA1 y DPB1 (que codifican para las cadenas α y β que conforman las moléculas DP) y dos pseudogenes, DPA2 y DPB2, que no se expresan. Los genes DR y DQ están muy cerca uno del otro, por lo que se encuentran en desequilibrio de ligamiento. El DP está más alejado de ellos, por lo que el desequilibrio de ligamiento es débil o no existe (Figuras 8 y 9).²⁰

Los genes clase II son altamente polimórficos y se expresan en las células presentadoras de antígenos (CPAs, donde se incluyen macrófagos, monocitos, células de Langerhans y células dendríticas), linfocitos B, Linfocitos T activados, células epiteliales del timo, células endoteliales y en algunas células tumorales.^{20, 21}

La región clase III no codifica para moléculas del HLA, sino para genes del complemento, Cyp21A y 21B (importantes en la síntesis de la 21-hidroxilasa), Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α y - β), proteína de choque térmico de 70 KDa (HSP-70) y proteínas asociadas a los transcritos de HLA-B (BAT).^{20, 21} (Figura 9)

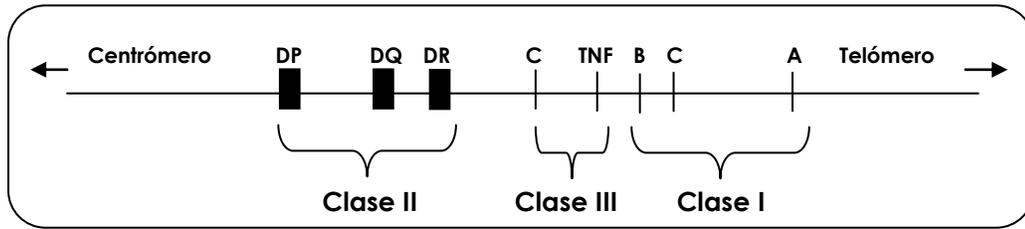


Figura 8. Organización genética del HLA

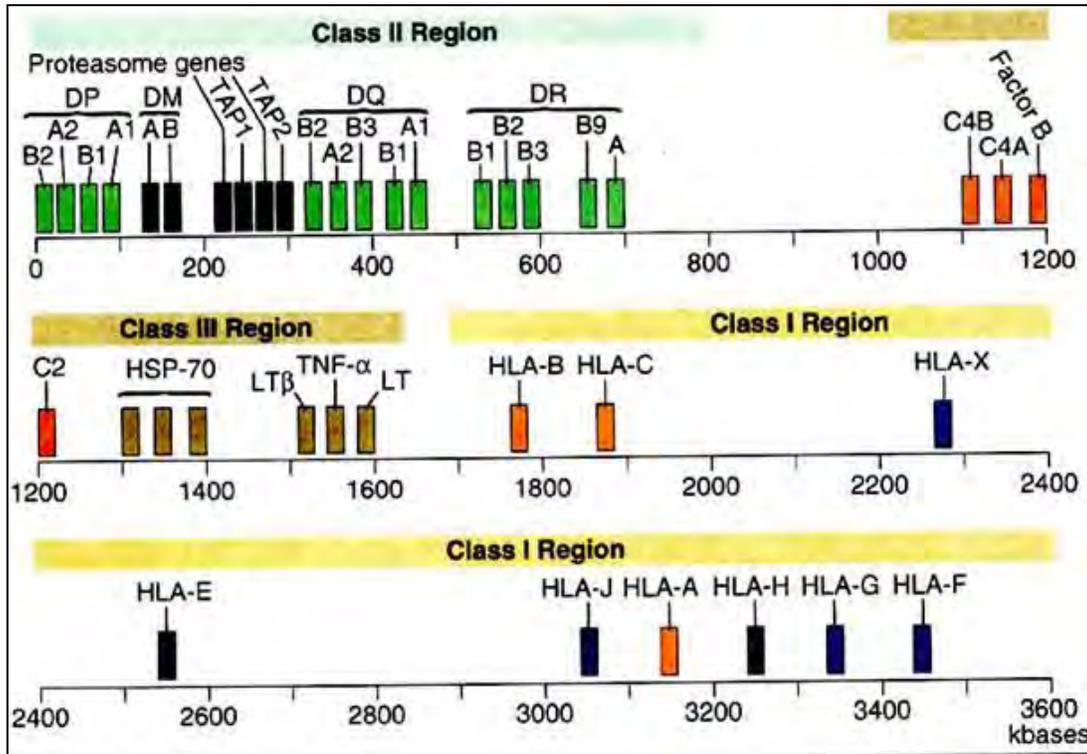


Figura 9. Mapa de genes del HLA, tomado de <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/hla.htm>

Haplotipos del HLA

Los genes del HLA están ligados estrechamente y forman haplotipos que se heredan de cada padre siguiendo un patrón mendeliano, de tal manera que dos hijos tienen 25% de probabilidad de ser idénticos en su HLA (dos haplotipos idénticos), 50% de ser HLA haploidénticos (compartir un haplotipo) y 25% de no compartir haplotipos (figura 10). Ciertos haplotipos son más frecuentes en algunas poblaciones, como el HLA-A1-B8-DR17 en europeos, lo cual se llama desequilibrio de ligamiento.²⁰

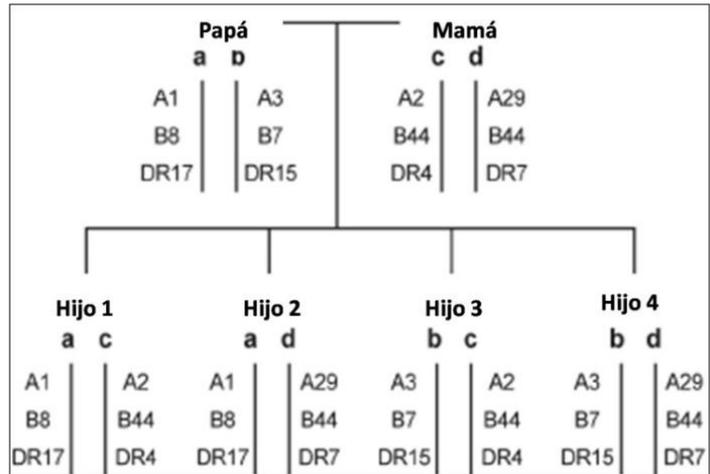


Figura 10. Herencia mendeliana de los haplotipos del HLA

Moléculas clase II del HLA

Los productos de los genes clase II del HLA son heterodímeros unidos a la membrana plasmática que están conformados por dos cadenas polipeptídicas glucosiladas, la cadena ligera α y la cadena pesada β . Ambas cadenas están unidas de forma no covalente, tienen una porción extracelular conformada por los dominios α -1 y α -2 de la cadena α y los dominios β -1 y β -2 de la cadena β , una porción transmembrana (TM) y una porción intracitoplásmica (CY). El dominio β -1 (DRB1, DQB1 y DPB1) es el sitio más polimórfico de las moléculas clase II y junto con el dominio α -1 conforman el nicho de unión de péptidos, capaz de unir péptidos de 12 aminoácidos o más (Figura 11).²⁰⁻²⁶

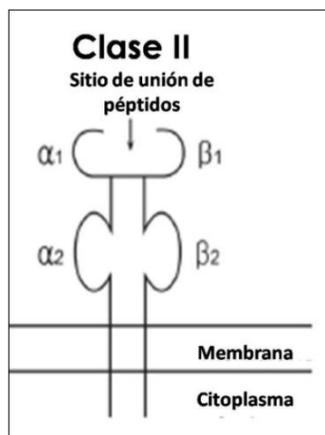


Figura 11. Estructura de las moléculas clase II del HLA.

Las cadenas α y β se ensamblan en el retículo endoplásmico con ayuda de la calnexina e inmediatamente se asocian con la cadena Ii, codificada en el cromosoma 5, que evita que el sitio de unión de péptidos se ocupe.^{21, 25, 26} La mayoría de las cadenas Ii se remueven por proteólisis dependiente de catepsinas B y D antes de que las moléculas clase II se acumulen en los compartimientos pre-lisosómicos y, una vez que se fragmentan las cadenas Ii, se genera un péptido llamado CLIP (del inglés: **C**lass II associated **I**nvariant **P**eptide), el cual cubre el sitio de unión de péptidos de las moléculas clase II y las mantiene en una conformación relativamente inestable que es receptiva a los péptidos antigénicos introducidos por vía endocítica y degradados por las catepsinas A y B. Las moléculas HLA-DM, también presentes en los compartimientos pre-lisosómicos, catalizan la eliminación del CLIP con dependencia de pH bajo, haciendo que las moléculas clase II tengan una conformación altamente estable y con mayor capacidad de unir péptidos. El mecanismo por el que las moléculas clase II se liberan del compartimiento pre-lisosómico para expresarse en la superficie celular no es del todo claro, pero los estudios con microscopía electrónica sugieren que el compartimiento que lleva a las moléculas clase II con los péptidos se fusionan a la membrana celular y de esta manera se expresan en la superficie para ser presentados a las células T (Figuras 12 y 13).^{21, 26-30}

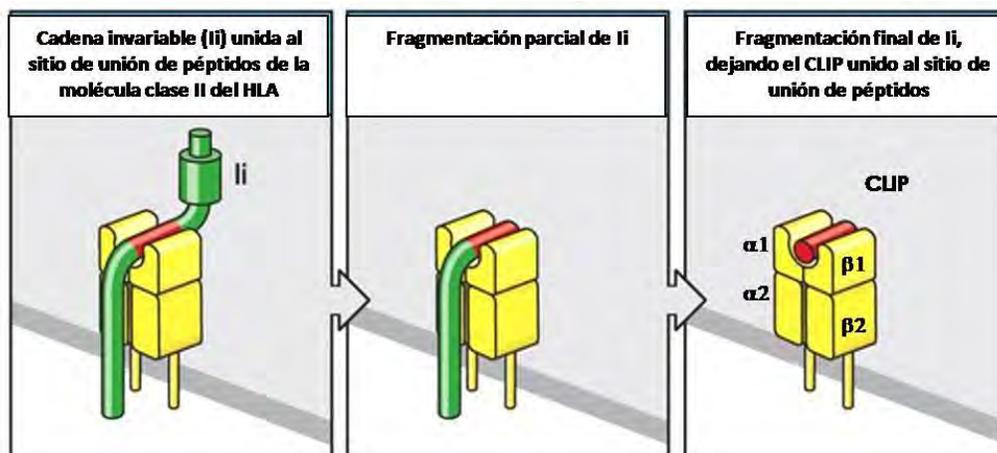


Figura 12. Formación del péptido CLIP

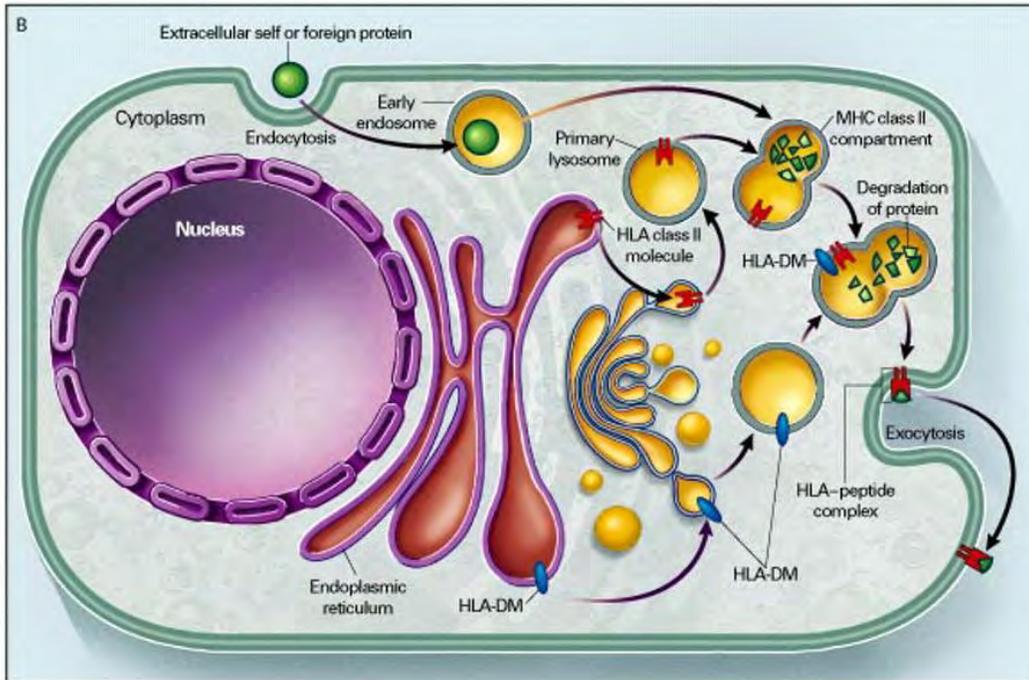


Figura 13. Procesamiento de antígenos por las moléculas clase II Del HLA. Tomado de: <http://labmed.hallym.ac.kr/immunogenetics/NEJM-HLA.htm> 9 de Nov., 2011²¹

Las variaciones en los aminoácidos de los agentes patógenos existentes en cada región geográfica son capaces de producir cambios estructurales en el sitio de unión de péptidos de las moléculas del HLA. Es por eso que las moléculas del HLA difieren entre las poblaciones debido a la evolución por selección natural.²⁰

A diferencia de los receptores de células T y B, que son distintos en cada linfocito de un mismo individuo, las moléculas del HLA son iguales en todas las células de una misma persona, aunque distintas entre individuos. Así, en una misma población, existen individuos con moléculas del HLA capaces de unir ciertos péptidos antigénicos de organismos patógenos, pero otros no, pudiendo facilitar o dificultar su entrada a las células. De esta manera, algunos individuos son susceptibles mientras que otros son resistentes a las enfermedades inducidas por microorganismos.^{20,31} Otras posibilidades de asociación del HLA con enfermedades inducidas por agentes patógenos son: 1) Que el HLA intervenga en el timo durante la selección de linfocitos,

determinando cuáles antígenos deberán presentarse a los linfocitos T, 2) que las células T toleren a algunos patógenos y 3) que exista mimetismo molecular entre los antígenos infecciosos y los propios del individuo.¹⁹

Para detectar antígenos y alelos del HLA, están disponibles los métodos celulares (microlinfocitotoxicidad de Terasaki y cultivo mixto de linfocitos) y los métodos de Biología Molecular (SSP y SSOP). El método de microlinfocitotoxicidad celular mediada por anticuerpos funciona a través de la reacción de un anticuerpo contra las moléculas de HLA presentes en la superficie celular. En el cultivo mixto de linfocitos, las especificidades del HLA son definidas por células con un fenotipo conocido. Los linfocitos T se usan para tipificar al HLA-A, B y C, y los linfocitos B para el HLA-DR y DQ. Las técnicas de Biología Molecular no tipifican las moléculas de HLA expresadas en las superficies celulares, sino a los alelos o grupos de alelos. Después de extraer el DNA de las células, se amplifica por reacción en cadena de polimerasa (PCR) y así, la tipificación de los alelos del HLA se puede realizar por los métodos SSP (Sequence Specific Primer ó Iniciadores específicos de secuencias que amplifican un alelo o un grupo de alelos) y SSOP (Sequence Specific Oligonucleotide Probe ó sonda de oligonucleótidos de secuencias específicas), diseñadas para reconocer uno o algunos alelos de cierto grupo, mediante hibridación.¹⁹

Antecedentes

Una enfermedad autoinmune se desarrolla cuando los individuos genéticamente predispuestos interactúan con agentes ambientales que desencadenan la enfermedad y, una vez desencadenada la respuesta inmunitaria, ésta se propaga hasta que entran en juego factores reguladores que limitan o aumentan el proceso, por lo que se conocen cuatro fases: Predisposición, inducción, propagación y regulación.^{2, 13, 32}

A pesar de la heterogeneidad fenotípica del lupus eritematoso, la fuerte contribución genética en la susceptibilidad a la enfermedad se demuestra con la gran heredabilidad de la enfermedad (>66%), la fuerte concordancia en gemelos monocigotos más que en gemelos dicigotos o hermanos (24–56% versus 2–5%, respectivamente), y la alta razón de riesgo en hermanos de pacientes con LES (entre 8 y 29 veces más que en la población general).³³⁻³⁵

En el lupus eritematoso sistémico, donde muchas vías, procesos y tipos celulares determinan la forma clínica de la enfermedad, la base genética es muy compleja, existiendo asociación con genes que codifican para proteínas que participan en el procesamiento de complejos inmunes, el funcionamiento de los receptores tipo Toll, la producción del interferón tipo I, la transducción de señales inmunológicas de linfocitos y en la presentación, procesamiento y depuración de células apoptóticas por parte de las células presentadoras de antígenos (figuras 17 y 18).^{32, 36, 37}

Los estudios epidemiológicos en LES demuestran un alto interés en estudiar las bases genéticas de la enfermedad. Son comunes los estudios de casos y controles de genes candidatos para evaluar si un marcador genético de prueba está presente en una frecuencia mayor en pacientes con LES que en controles sanos pareados por etnicidad. Los genes candidatos se

escogen con base en su relevancia funcional en la patogénesis de la enfermedad y con este abordaje se ha establecido exitosamente que los genes de las variantes clase II del HLA y del receptor Fcγ (FcγR) confieren predisposición para LES, así como la deficiencia de los componentes del complemento C1q, C2 o C4.³³ Otros estudios refieren que de todos los genes involucrados en LES, los que confieren mayor susceptibilidad son *TREX1*, *C1q*, *C4(A y B)*, *C2*, *TNFAIP3*, *HLA-DR2* y *DR3* en orden descendente,^{12, 38} y de éstos genes, el *TNFAIP3* (OR= 2.3), el *HLA DR2* (OR= 2.0) y el *HLA-DR3* (OR= 2.0) están confirmados por estudios de asociación en todo el genoma (GWAS, por sus siglas en inglés Genome-Wide Association Study),³⁶ entre otros (Cuadro 1).^{34, 37, 39-43}

Los estudios GWAS utilizan cientos de miles de marcadores microsatélites multialélicos que son distribuidos a intervalos genómicos de 10–15 Kb a lo largo de todo el genoma, para identificar regiones cromosómicas que confieren riesgo y que son compartidas entre múltiples miembros afectados de una o varias familias o en una gran muestra de casos y controles.^{33, 34, 36} La asociación genética más fuerte hasta ahora en Americanos con ascendencia europea es el HLA.^{35, 44}

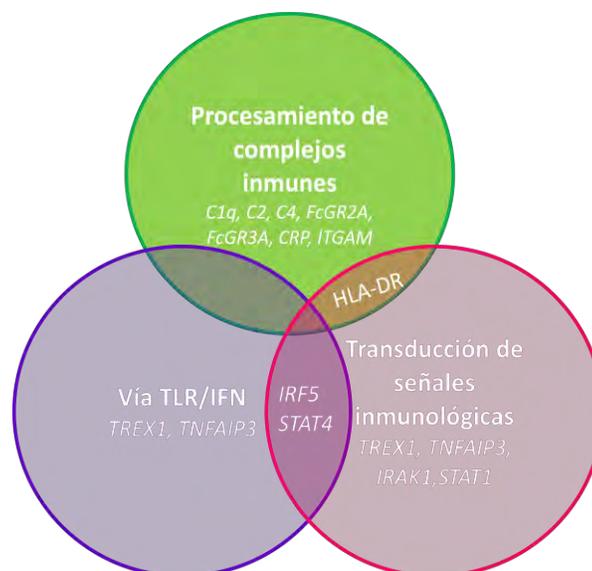


Figura 17. Genes de los procesos involucrados en la predisposición a lupus eritematoso. Adaptado de: Harley I, Kaufman K, Langefeld C, Harley J, Kelly J. Genetic Susceptibility to Lupus³⁶

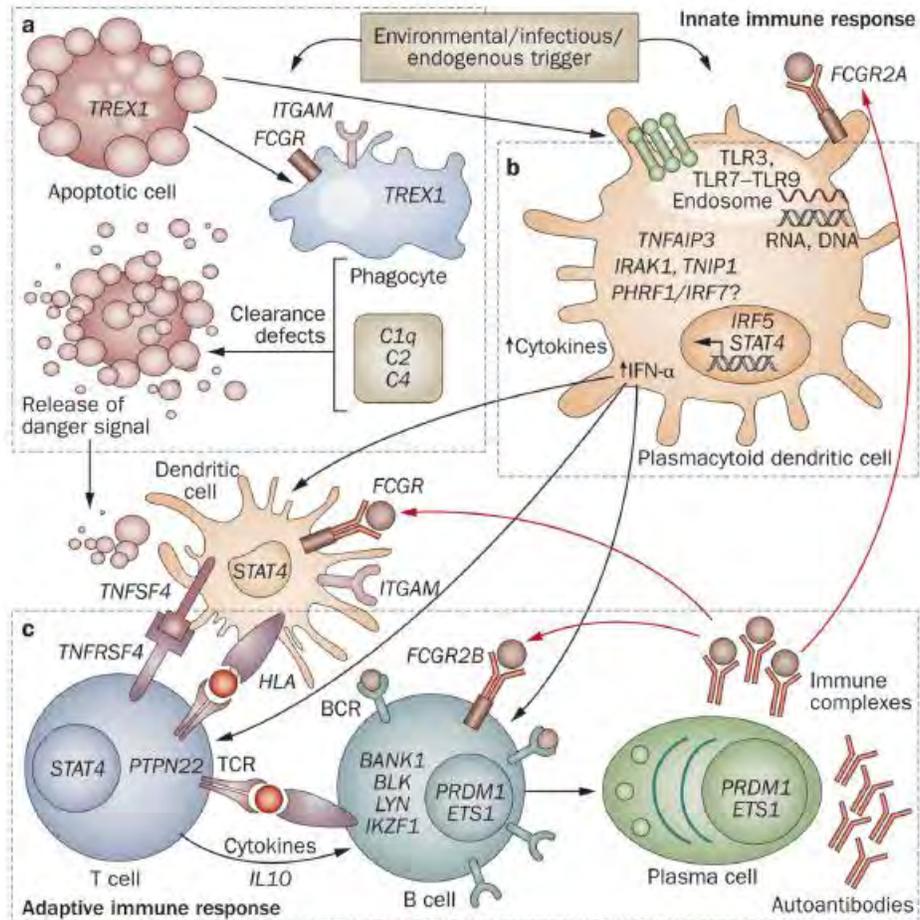


Figura 18. Mecanismos involucrados en el desarrollo de enfermedades autoinmunes.³³

HLA en lupus eritematoso

Como la mayoría de las enfermedades autoinmunes humanas, los genes del HLA muestran una fuerte asociación con LES, en especial las moléculas clase II.³⁴

Las moléculas clase II del HLA se encargan de presentar péptidos antigénicos a las células T CD4+, resultando de suma importancia la distinción entre péptidos propios y extraños. El extenso polimorfismo de estas moléculas incide en la estructura de los péptidos unidos, generando respuestas inmunitarias distintas entre los individuos. Las enfermedades autoinmunes se presentan en todos los grupos étnicos, pero su frecuencia y manifestaciones clínicas pueden ser distintas, al igual que sus alelos clase II del HLA, sugiriendo variabilidad en los péptidos que inducen autoinmunidad según la zona geográfica estudiada.⁴⁵

Cuadro 1. Genes fuertemente relacionados con LES³³

Estudio	Fuerte evidencia (OR)		Buena evidencia (OR)	
	Establecida	Nueva	Establecida	Nueva
Europeos				
Hom	HLA-DR3(ND) IRF53(ND) STAT4(ND)	C8orf13-BLK (1.4) ITGAM-ITGAX (1.3)	--	--
Harley	Región del HLA (1.4-2.3) IRF5 (1.3-1.6) STAT4 (1.5)	ITGAM (1.3-1.7) PHRF (1.3) P XK (1.3) XKR6 (1.2-1.3) BLK (1.2) LYN (1.3)	PTPN22 (1.5) FCGR2A (1.4)	ATG5 (1.2) UBE2L3 (1.2) SCUBE1 (1.3)
Kozyrev	--	BANK1 (1.3)	--	--
Graham	Región del HLA (ND) IRF53(ND) STAT4(1.5)	BLK (1.3) TNFAIP3 (2.3)	--	ITGAM (ND)
Gateva	HLA-DRB1 (2.0) IRF5 (1.9) STAT4 (1.6) PTPN22 (1.4) TNFSF4 (1.2) IL10 (1.2)	ITGAM (1.4) BLK (1.4) TNFAIP3 (1.7) PHRF1 (1.2) TNIPI (1.3) PRDM1-ATG5 (1.2) JAZF1 (1.2) UHRF1BP1 (1.2)	IRAK1-MECP2 (1.1)	UBE2L3 (1.2) ATG5 (1.2) P XK (1.2) IKZF1 (1.2) SLC15A4 (1.1)
Asiáticos				
Han	Región del HLA (1.9) IRF5 (1.4) STAT4 (1.5) TNFSF4 (1.4-1.5)	BLK (1.3-1.4) PRDM1-ATG5 (1.3) TNFAIP3 (1.7) HIC-UBE2L3 (1.3) IKZF1 (1.4) RASGRP3 (1.4) SLC15A4 (1.3) TNIPI (1.3) ETS1 (1.4) LRRC18-WDFY4 (1.2)	--	--
Yang	Región del HLA (1.8-2) STAT4(1.7)	ETS1 (1.3) WDFY3 (1.3)	IRF5 (1.5)	TNFAIP3 (1.9) BLK (1.6)

Fuerte evidencia: OR del gen con $p < 5 \times 10^{-8}$

Buena evidencia: OR del gen con $p < 5 \times 10^{-5}$

Establecida: Loci identificados por estudios de genes candidatos y GWAS

Nueva: Loci identificados sólo por GWAS

ND: No determinado

HLA-DRB1 en LES

De los estudios de asociación de HLA DR y lupus eritematoso publicados hasta el momento, la mayoría se ha realizado en pacientes con LES. Dichos estudios se han llevado a cabo en distintas zonas geográficas, pues es bien conocida la variabilidad del HLA por etnicidad.²⁰

Un estudio llevado a cabo en 3 grupos con LES de los Estados Unidos demostró que los alelos más frecuentes fueron HLA-DRB1*0301 (DR3) en

individuos con ascendencia europea, DRB1*1503 (DR2) en afroamericanos y DR8 en hispanos.⁴⁶

Las asociaciones más consistentes en europeos con LES son con el HLA-DR2 (DRB1*1501) y el HLA-DR3, especialmente el HLA-DRB1*0301 tanto en Europa del norte como del occidente.^{4, 34, 42, 46-63} Esta asociación también se ha observado en canadienses⁶⁴ y estadounidenses con ascendencia europea,³⁸ aunque también en pacientes de África,⁶⁵ la India⁶⁶ y Latinoamérica.⁶² En México los alelos más frecuentes en pacientes con LES, comparados con controles sanos, corresponden al HLA-DR3 y al HLA-DR7,⁶⁷ principalmente el HLA-DRB1*0301 y, en menor medida, el HLA-DRB1*0802 y el HLA-DRB1*1101 (DR5).⁶³

El HLA-DR2 está reportado con mayor frecuencia en asiáticos con LES⁶⁸⁻⁷³ (HLA-DRB1*1501 en japoneses⁶⁸ y HLA-DRB1*1502 en tailandeses)⁷³ y además se ha asociado con nefropatía lúpica.^{70, 74, 75} Este alelo también está reportado en estadounidenses con ascendencia europea,^{38,76-78} afroamericanos (HLA-DRB1*1503),⁴⁶ europeos,^{46, 79} sudafricanos⁸⁰ y mexicanos de Jalisco.⁸¹ Otros alelos asociados con LES son el HLA-DR13 (DR6) en España,⁴⁹ el HLA-DR5 en Egipto⁸² y el HLA-DR9 en Corea, este último además asociado con formas leves de LES, comparado con aquellos que presentan nefropatía lúpica, donde el HLA-DR2 es más frecuente.⁷⁰

Cuando se compararon los alelos del HLA-DRB1 en pacientes con LES del norte de España e hispanoamericanos de los Estados Unidos, se encontró una frecuencia mayor de HLA-DRB1*08 y ausencia de HLA-DRB1*0301 en hispanoamericanos, en quienes además el LES solía ser más grave (con más manifestaciones neurológicas y renales).⁸³

Reveille y colaboradores estudiaron proporciones equivalentes de individuos con LES de los Estados Unidos con ascendencia europea,

africana e hispana, observando que el HLA-DRB1*0301 (DR3) fue el alelo más frecuente en aquellos con ascendencia europea, el HLA-DRB1*1503 (DR2) el más frecuente en afroamericanos y el DRB1*08 (DR8) en hispanos. Los afroamericanos e hispanos mostraron mayor puntaje de actividad de la enfermedad, mayor daño renal y mayor frecuencia del HLA-DRB1*01, además de mayor daño cardíaco en hispanos y neurológico en afroamericanos.⁴⁶

Se ha reportado que el HLA-DR4 se asocia con un menor riesgo de LES⁴⁴ y, en presencia de LES, con menor riesgo de nefropatía lúpica.⁸⁴ Por otro lado, en quienes padecen nefropatía lúpica el HLA-DR6 es menos frecuente, mientras que en los pacientes con LES y vasculitis tanto el HLA-DR1 como el HLA-DR7 son menos frecuentes.⁵¹

HLA-DRB1 en LEC

Existen pocos estudios de asociación del HLA con lupus eritematoso cutáneo. Cuando se compararon los alelos del HLA-DRB1 entre distintas formas clínicas de LEC y LES en japoneses, se observó mayor frecuencia de HLA-DRB1*1501 tanto en LED como en LES, comparado con LECSA y lupus tímido.^{85, 86} Cuando se han comparado estos alelos en pacientes con LED y controles sanos, en LED han sido más frecuentes el HLA-DRB1*16 y el HLA-DR4 en México,⁸⁷ el HLA-DR2 y el HLA-DR3 en Alemania⁸⁸ y el HLA-DRw6 en los Estados Unidos (tanto en individuos con ascendencia europea como africana).⁸⁹

HLA-DQA1 en LES

Al comparar los alelos del HLA-DQA1 en pacientes con LES y controles sanos, en LES se ha observado mayor frecuencia del HLA-DQA1*0501 en España,⁴⁹ Reino Unido,⁹⁰ Noruega,⁵⁴ Dinamarca⁵² y Túnez;⁹² y el HLA-DQA1*0102 en Jalisco,⁸¹ China⁹¹ y Túnez.⁹² El HLA-DQA1*0101 se reportó en

asociación con nefritis lúpica en Italia, donde al parecer el HLA-DQA1*0102 es protector contra el daño renal.⁷⁴

HLA-DQB1 en LES

En estudios comparativos de casos con LES y controles sanos, los alelos más frecuentes en LES son el HLA-DQB1*0402 en Jalisco, quienes además mostraron disminución del HLA-DQB1*0303 y del HLA-DQB1*0501,⁸¹ contrario a lo reportado en Tailandia,⁷³ Malasia⁹¹ y Taiwán,⁹³ donde el HLA-DQB1*0501 fue más frecuente en los pacientes con LES. Otros alelos del HLA-DQB1 reportados con mayor frecuencia en LES son el HLA-DQB1*0601 en Malasia⁹¹ e Irán,⁹⁴ el HLA-DQB1*0602 en Japón,⁶⁸ el HLA-DQB1*0609 en Irán⁹⁴ y el HLA-DQB1*0201 en Noruega,⁵⁴ Alemania⁹⁵ y Hungría.⁶⁰ En Irán además se observa con mayor frecuencia la combinación del HLA-DQB1*0501 y *0504 y del HLA-DQB1*0601 y *0609, con disminución del HLA-DQB1*0301 y el HLA-DQB1*0304.⁹⁴

HLA DQ en LEC

Sólo está reportada una mayor frecuencia del HLA-DQA1*0102 en pacientes con LEC de Austria comparado con controles sanos.⁹⁶

Haplotipos DQ-DR en LES

Estudios europeos de comparación de la frecuencia haplotípica del HLA-DQ-DR entre pacientes con LES y controles sanos han demostrado mayor frecuencia del haplotipo HLA-DQ2/DR3 en los pacientes con LES, específicamente el HLA-DQB1*0201-DRB1*0301.⁹⁷ En el Reino Unido,^{42, 61} al igual que en Alemania,⁹⁵ los Estados Unidos⁴ y Latinoamérica,^{62, 63} el haplotipo HLA-DQA1*0501-DQB1*0201-DRB1*0301 fue más frecuente en los pacientes con LES. En Alemania, además del haplotipo HLA-DQA1*0501-

DQB1*0201-DRB1*0301, también el HLA-DQA1*0102-DQB1*0602-DRB1*02 fue más frecuente en los pacientes con LES.⁹⁵

En México existen dos estudios que comparan dichos haplotipos en pacientes con LES y controles sanos, uno de la ciudad de México donde los haplotipos HLA-DQA1*0501-DQB1*0201-DRB1*0301, HLA-DQA1*0401-DQB1*0402-DRB1*0802⁶³ y HLA-DQA1*0101-DQB1*0501-DR1,⁹⁸ fueron más frecuentes en los pacientes con LES, similar a lo reportado en el Reino Unido⁴² y los Estados Unidos;⁴ mientras que en la serie de Jalisco el haplotipo más frecuente fue el HLA-DQA1*0102-DQB1*0602-DRB1*15,⁸¹ similar a lo observado en japoneses (HLA-DQA1*0102-DQB1*0602-DRB1*1501)⁶⁸ y estadounidenses (HLA-DQB1*0602-DRB1*1501).⁴

Al comparar los haplotipos del HLA de pacientes con LES de Europa y Egipto se observó que el HLA-DQB1*0301-DRB1*1303 era más frecuente en europeos.⁸² Un estudio de familias de pacientes con LES de los Estados Unidos que comparó los haplotipos de HLA entre personas con ascendencia europea, africana e hispana demostró la existencia de tres haplotipos de riesgo: el HLA-DQB1*0602-DRB1*1501 (DQ6/DR2), el HLA-DQB1*0201-DRB1*0301 (DQ2/DR3) y el HLA-DQB1*0402-DRB1*0801 (DQ4/DR8), confiriendo mayor riesgo el haplotipo que incluía al HLA-DRB1*0301, seguido por el del HLA-DRB1*1501 y el del HLA-DRB1*0801. Casi dos terceras partes de los pacientes con LES tenían al menos uno de estos haplotipos de riesgo, es decir, 63.9% eran heterocigotos para el haplotipo de riesgo.⁹⁹

Haplotipos HLA-DQ-DR en LED

Un estudio alemán entre casos con LED y controles sanos, reportó mayor frecuencia de HLA-DR3-DQw1 en los pacientes con LED.⁸⁸

Problema y justificación

La prevalencia del LES en población general es de 1 en 2000 individuos (0.05-0.1%), especialmente en mujeres a razón de 6 a 10 por cada hombre^{4, 100} y, aunque la prevalencia es relativamente baja, este padecimiento genera grandes costos sociales en los servicios de salud, ya que frecuentemente afecta a adultos jóvenes en edad productiva, tiene gran morbilidad y mortalidad temprana.¹⁰⁰

Por otro lado, la incidencia anual media reportada del LECc es de 2.59 por cada 100 000 habitantes, siendo el LED y el lupus profundo las formas clínicas más frecuentes.¹⁰¹⁻¹⁰³ Ambas tienen buen pronóstico, ya que suelen limitarse a la piel y, aunque dejan cicatrices y secuelas con implicaciones estéticas, si llegan a desarrollar LES (entre 5 y 10% de los LE, especialmente durante los primeros 5 años), éste tiene una expresión mucho más leve.^{3, 11, 16-18}

Ante la notable diferencia en el comportamiento clínico de estas formas de LEC y el LES que no va precedido de manifestaciones cutáneas, surgió la interrogante de si estas dos formas de presentación de la enfermedad pudieran tener caminos fisiopatogénicos distintos,¹¹ por lo que en este estudio decidimos comparar las frecuencias de los alelos de tres genes clase II del HLA: DRB1, DQA1 y DQB1, ya que en estudios previos, éstos figuran entre los genes con fuerte asociación en LES y con mayor nivel de evidencia.^{33-35, 44, 46, 100}

Pregunta de investigación

¿Son diferentes los alelos de HLA-DQA1, DQB1 y DRB1 de los pacientes con lupus eritematoso limitado a piel a los de los pacientes con lupus eritematoso sistémico?

Objetivo

Comparar las frecuencias de los distintos alelos de HLA-DQA1, DQB1 y DRB1 entre los pacientes con lupus eritematoso limitado a piel y LES.

Hipótesis

Prueba de hipótesis para proporciones de los alelos de HLA-DQA1, DQB1 y DRB1.

P1= Proporción del alelo en pacientes con LEC

P2= Proporción del alelo en pacientes con LES

Hipótesis nula (H0): Los alelos de los pacientes con lupus eritematoso limitado a piel son iguales a los de los pacientes con LES. ($P1=P2$)

$P1_{HLA-DQA1}-P2_{HLA-DQA1} = 0$ es decir, $P1_{HLA-DQA1}=P2_{HLA-DQA1}$

$P1_{HLA-DQB1}-P2_{HLA-DQB1} = 0$ es decir, $P1_{HLA-DQB1}=P2_{HLA-DQB1}$

$P1_{HLA-DRB1}-P2_{HLA-DRB1} = 0$ es decir, $P1_{HLA-DRB1}=P2_{HLA-DRB1}$

Hipótesis alterna (H1). Los alelos de los pacientes con lupus eritematoso limitado a piel son diferentes a los de los pacientes con LES. (Ésta es la hipótesis del trabajo, $P1 \neq P2$).

$P1_{HLA-DQA1}-P2_{HLA-DQA1} \neq 0$ es decir, $P1_{HLA-DQA1} \neq P2_{HLA-DQA1}$

$P1_{HLA-DQB1}-P2_{HLA-DQB1} \neq 0$ es decir, $P1_{HLA-DQB1} \neq P2_{HLA-DQB1}$

$P1_{HLA-DRB1}-P2_{HLA-DRB1} \neq 0$ es decir, $P1_{HLA-DRB1} \neq P2_{HLA-DRB1}$

Diseño

Estudio transversal comparativo.

Material y métodos

Universo de estudio

Pacientes de Reumatología y Dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Población de estudio

Pacientes con lupus eritematoso limitado a piel y pacientes con LES.

Cálculo del tamaño de la muestra

El estudio que mejor define a los controles es el realizado por Martín-Villa en España, puesto que se aseguraron de que estos no tuvieran datos clínicos de LES y que fueran negativos para anticuerpos antinucleares y anti endonucleasas. En este estudio se observó una diferencia estadísticamente significativa en el HLA-DR3, con mayor frecuencia de este gen en los pacientes con LES respecto a los controles (52% y 27% respectivamente, $\Delta=25\%$) y HLA-DQA1*0501 (69 vs 44%, $\Delta=25\%$).⁴⁹

Con estos datos es posible calcular el tamaño de la muestra mediante la fórmula de proporciones para dos muestras independientes:

$$n = \frac{p_0q_0 (Z_\alpha + Z_\beta \sqrt{p_1q_1/p_0q_0})^2}{(p_1-p_0)^2}$$

Cálculo de tamaño de muestra para HLA-DR⁴⁹

p₀= Proporción de HLA-DR3 en los controles sin LES= 0.27
q₀= 1-p₀= 0.73
p₁= Proporción de HLA-DR3 en pacientes con LES= 0.52
q₁= 1-p₁= 1-0.52= 0.48

$$n = \frac{p_0q_0 (1.96 + 0.84 \sqrt{p_1q_1/p_0q_0})^2}{(p_1-p_0)^2} = \frac{0.27 \times 0.73 (1.96 + 0.84 \sqrt{0.52 \times 0.48 / 0.27 \times 0.73})^2}{(0.5 - 0.27)^2} = 31.45$$

Cálculo de tamaño de muestra para HLA-DQ⁴⁹

p₀= Proporción de HLA-DQA1*0501 en los controles sin LES= 0.44
q₀= 1-p₀= 1-0.44= 0.56
p₁= Proporción de HLA-DQA1*0501 en pacientes con LES= 0.69
q₁= 1-p₁= 1-0.69= 0.31

$$n = \frac{p_0q_0 (Z_\alpha + Z_\beta \sqrt{p_1q_1/p_0q_0})^2}{(p_1-p_0)^2} = \frac{([0.44][0.56])(1.96 + 0.84 \sqrt{[0.69][0.31]/[0.44][0.56]})^2}{(0.69-0.44)^2} = 29.71$$

Criterios de inclusión

*Para el grupo de LECc: Pacientes con diagnóstico de LECc por correlación clínico patológica, con 5 años o más de evolución.

*Para el grupo de LES: Pacientes con positividad a anticuerpos antinucleares a títulos de 1:320 o mayor, anticuerpos anti-DNA de doble cadena o anti-Sm, más uno o más de los siguientes:

- Afección renal (proteinuria persistente de 0.5g/día o mayor, cilindruria o biopsia renal con algún grado de nefropatía lúpica)
- Afección articular (artritis no erosiva de 2 o más articulaciones periféricas en la que se descarten otras causas)
- Afección neurológica (convulsiones o psicosis que no se deban a otras causas identificables)
- Afección de serosas (pleuritis, pericarditis en las que se descarten otras causas)
- Afección hematológica (leucopenia de 4000/mm³, linfopenia de 1500/mm³ o menor, trombocitopenia de menos de 100 000/mm³ o anemia hemolítica) en las cuales se descarten otras causas.

Criterios de exclusión

*Para el grupo de LECc: Pacientes que en algún momento del transcurso de la enfermedad hubieran mostrado linfopenia menor o igual a 1500/mm³, proteinuria persistente de 0.5g/día o mayor, cilindruria o títulos de anticuerpos antinucleares mayores o iguales a 1:320, datos francos de

afección sistémica por lupus eritematoso o cualquier enfermedad de tejido conectivo (síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, dermatomiositis, artritis reumatoide, etc.).^{13,14, 103}

*Para el grupo de LES: Pacientes que tuvieran además otras enfermedades autoinmunes sistémicas, como síndrome de sobreposición o enfermedad mixta de tejido conectivo (excepto Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos secundario al LES).

Criterios de eliminación

De ambos grupos se eliminaron los casos en quienes no fue posible extraer el DNA o tipificar el HLA por errores en el almacenamiento o procesamiento (cantidad insuficiente, defectos en la técnica, almacenamiento, etc.) y que no pudo tomarse una nueva muestra de sangre, ya sea porque no fue posible contactar nuevamente al paciente o porque no aceptó una segunda toma de muestra.

A. RECLUTAMIENTO DE PACIENTES

Se identificaron los pacientes en la consulta externa de Dermatología y Reumatología, así como en las bases de datos de Dermatopatología. Se revisaron los expedientes y todos tuvieron revisión Dermatológica y Reumatológica para aplicar los criterios de selección. Tras identificar a los casos que cumplían con los criterios de inclusión y no tenían ningún criterio de exclusión, se les invitó a participar en el estudio, ya sea personalmente, vía telefónica o por telegrama. Tras explicar en qué consistía el estudio, quienes aceptaron participar firmaron una carta de consentimiento informado (anexo 1), tras lo cual se obtuvo una muestra de 6mL de sangre venosa periférica, la cual se colectó en tubos con EDTA (Benson Dickinson) y se refrigeraron a 4°C hasta el momento de la extracción de DNA.

B. EXTRACCIÓN DE DNA^{104, 105}(material, reactivos y en anexo 2)

Día 1

1. Se colocó solución de lisis I en un vaso de precipitado sobre hielo, lista para agregarla a cada una de las muestras de sangre.
2. Se decantó la muestra de sangre en un tubo de polipropileno de 15mL y los tubos con EDTA que la contenían se enjuagan con solución de lisis para aprovechar al máximo el DNA existente y esta solución de “enjuague” se añadió a los tubos de polipropileno con sangre.
3. Se centrifugó la muestra de sangre con la solución de lisis durante 15 min a 3000 rpm y a 4°C (para que la interfase se compactara). Después se decantó el sobrenadante en el frasco de residuos y se homogeneizó el botón con pequeños golpecitos al tubo.
4. Se volvieron a lavar los tubos iniciales de polipropileno con el agua de lisis hasta que ésta quedó completamente transparente, colocándola cada vez en el tubo con el botón de DNA y centrifugando después hasta que el botón de DNA se observara blanco y el agua transparente.
5. Se decantó el sobrenadante, quedando el botón blanco en el fondo.
6. Finalmente se agregaron 4mL de proteinasa K y se dejó en baño María durante toda la noche.

Día 2

1. Se retiraron los tubos con el botón de DNA del baño María.
2. Por cada muestra se colocaron cinco tubos de polipropileno de 13mL y una pipeta de transferencia en una gradilla, los cuales se marcan para identificarlos perfectamente.
3. Se agregaron 4mL de la fase inferior del frasco con fenol saturado al tubo 1 (que tiene la muestra de DNA y proteinasa K) y al tubo 2.

4. Se centrifugó el tubo 1 durante 15 minutos a 3000 rpm en la centrífuga refrigerada a 4°C.
5. Se tomó la parte superior acuosa que quedó separada tras la centrifugación y se añadió al tubo 2, lo cual también se centrifuga.
6. La parte acuosa superior del tubo 2 centrifugado se colocó en el tubo 3 al cual se le añadieron 4 mL de fenol-cloroformo y se centrifugó.
7. En el tubo 4 se añadieron 4 mL de cloroformo/alcohol isoamílico y la parte acuosa del tubo 3 centrifugado y se centrifugó.
8. En el tubo 5 se añadieron 4 mL de alcohol isopropílico, 120 µL de NaCl 5M y la parte superior acuosa del tubo 4. Tras esto, ya fue posible visualizar el DNA con forma de medusa.

Cuantificación del DNA

1. El DNA flotante se colectó con la punta de una micropipeta y se colocó en un tubo de 1.5 mL, el cual se centrifugó durante 1 minuto a 12000 xg y a 4°C con la finalidad de compactar la pastilla de DNA.
2. Tras decantar el sobrenadante, cuidando de no eliminar la pastilla de DNA, se añadió 1 mL de etanol frío al 70% y se centrifugó durante 1 minuto a 12000 xg, 4°C.
3. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente con el tubo destapado.
4. Luego se resuspendió el DNA en 1 mL de TE (Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM; EDTA, pH 8.0, 1 mM). Para que el DNA se resuspenda completamente, puede dejarse 2 o 3 días a 4°C o 30 min a 53°C, mezclando suavemente varias veces.
5. El DNA recién extraído se leyó a 260 nm se multiplicó por 50 (el coeficiente de extinción molar del DNA), expresando la lectura en µg/mL. También se leyó a 240 y a 280 nm para evaluar la pureza del DNA. Se obtuvo la razón de las lecturas a 260/280 nm (para evaluar

contaminación con proteínas) y a 260/240 nm (para evaluar contaminación con fenol), siendo lo esperado obtener razones entre 1.7 y 2.

C. AMPLIFICACIÓN DEL DNA^{106, 107} (reactivos en el anexo 3)

Para cada individuo se amplificó el segundo exón de los loci DQA1, DQB1 y DRB1.

Preparación de la mezcla de amplificación

Para DQ: En un tubo de 0.5 mL se colocaron 3 µL de DNA y se aforó con agua a 60 µL. En otro tubo de 0.5 mL se colocó lo siguiente:

dNTPs 10X	10 µL	
Buffer 10X	10 µL	
BSA	10 µL	
MgCl ₂ 50mM	4 µL	
Iniciador A (Fw) (25 pmol)	1.5 µL	(Cuadro 2)
Iniciador B (Rv) (25 pmoles)	1.9 µL	
Taq-Pol	0.4 µL	
H ₂ O	12.2 µL	
Total	140 µL	

CUADRO 2. INICIADORES A y B PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS LOCI HLA-DQ^{106, 108}

Nombre	Codones exón 2	Secuencia	Tamaño de la banda
DQA1			
2DQAAMP-A	11-18	AT GGT GTA AAC TTG TAC CAG T	229 pb
2DQAAMP-B	80-87	TT GGT AGC AGC GGT AGA GTT G	
DQB1			
2DQBAMP-A	13-20	C ATG TGC TAC TTC ACC AAC GG	214 pb
2DQBAMP-B	78-84	CTG GTA GTT GTG TCT GCA CAC	

Para DR: Se colocaron 7 μL de DNA en un tubo de 0.5 mL y se aforó a 60 μL con agua. En otro tubo de 0.5 mL se colocó:

dNTPs 10X	10 μL	
Buffer 10X	10 μL	
BSA	1 μL	
MgCl ₂ 50 mM	6 μL	
Iniciador A (Fw)	0.2 μL	(Cuadro 3)
Iniciador B (Rv)	0.2 μL	
Taq-Pol	0.3 μL	
H ₂ O	12.3 μL	
Total	40 μL	

CUADRO 3. INICIADORES A y B PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS LOCI HLA-DR^{106, 108}

Nombre	Codones exón 2	Secuencia	Tamaño de la banda
DR1-DRB1			
2DRBAMP-1	8-14	TTC TTG TGG CAG CTT AAG TT	259 pb
2DRBAMP-B	87-94	CCG CTG CAC TGT GAA GCT CT	
DR2-DRB1			
2DRBAMP-2	7-13	TTC CTG TGG CAG CCT AAG AGG	259 pb
2DRBAMP-B	87-94	EL MISMO QUE PARA DR1-DRB1	
DR4-DRB1			
2DRBAMP-4	6-13	GT TTC TTG GAG CAG GTT AAA C	257 pb
2DR86AMP-GR	86-92	CTG CAC TGT GAA GCT CTC AC	
2DR86AMP-VR	86-92	CTG CAC TGT GAA GCT CTC CA	
DR52-DRB1			
2DRBAMP-3	5-12	CA CGT TTC TTG GAG TAC TCT AC	260 pb
2DR86AMP-GR	86-92	EL MISMO QUE PARA DR4-DRB1	
2DR86AMP-VR	86-92	EL MISMO QUE PARA DR4-DRB1	

La cantidad de agua se ajustó para que el volumen final fuera de 100 μL por muestra. Estas cantidades están calculadas para la amplificación de 1 muestra, por lo que para preparar la mezcla para todas las muestras, las cantidades de los reactivos se multiplican por el número de muestras a amplificar +1.

2. A cada uno de los tubitos con las muestras amplificadas se les agregaron 25 μL de colorante para corrimiento (1mL glicerol al 100%; 1mL rojo de cresol en agua destilada) y se tomaron 10 μL para ser depositadas en los pozos del gel de agarosa.
3. Las muestras se corrieron a 90V durante 1h con 3 μL del amortiguador de corrimiento LB 5X, y un marcador de peso molecular de DNA del fago phi-X174 digerido con Hae III en el primer pozo del gel.
4. Se colocó el gel en el transiluminador para observarlo con luz UV de 312 nm, identificando las bandas de DNA con peso molecular de 274 y se fotodocumentó.

D. TIPIFICACIÓN DE ALELOS DE HLA-DQA1, DQB1 Y DRB1¹⁰⁹ mediante Dot-Blot de los productos de PCR

**Preparación de la solución de prehibridación*

Para 10 mL de esta solución (de la cual se utilizaron 6mL/muestra) se empleó:

SSPE 6X	3 mL
Denhardt 5X	1 mL
ssDNA 100mcg/mL	100 μL
Laurilsarcosina de sodio 0.1%	200 μL
SDS 10%	100 μL
H ₂ O destilada cbp	5.6 μL

**Marcaje de los oligonucleótidos*

El marcaje se realizó con ddUTP-digoxigenina y desoxinucleotidiltransferasa (TdT). Para preparar 95 picomoles de oligonucleótido (poner en hielo) se requirió:

Tailing Buffer 5X	4.0	μL
CoCl ₂ (25 mM)	4.0	μL
Oligonucleótido (10 pmol/μL)	9.5	μL
dd UTP-Dig (1 nmol/μL)	1.0	μL
TdT (25 U/μL)	<u>1.5</u>	<u>μL</u>
	20.0	μL

Esto se incubó a 37°C durante 30 minutos e inmediatamente se colocó en hielo. Luego se añadieron 2μL de la solución conformada por 1μL de glicógeno comercial y 200μL de EDTA 0.2 M.

Los oligonucleótidos se precipitaron con 6 μL de LiCl 0.8M y 85μL de etanol absoluto a -20°C y se dejaron incubar a -20°C durante toda la noche.

Al día siguiente se centrifugaron a 12,000 xg a 4°C durante 30 min, se lavaron con 60 μL de etanol al 70-80% y se dejaron secar al aire.

Se resuspendió en 95 μL de H₂O para tener 1 picomol/μL y se añadieron 2-4 picomoles/mL de solución de hibridación.

**Mezcla de DNA amplificado con solución desnaturalizante*

1. Se colocaron 80μL del DNA amplificado en un tubo al cual se le añadieron 320μL de TE.
2. Se recortaron fragmentos de 11.5x8cm de la membrana de nylon (al tamaño de la cámara de Dot-Blot).
3. Cada membrana se remojó durante 1 minuto en SSPE 10X y luego se colocó en la cámara para Dot-Blot junto con papel filtro.
4. Se conectó la cámara al vacío y se agregaron 100 μL de TE en cada pozo.

5. De la mezcla de DNA amplificado se tomaron 50 μ L y se agregaron a cada pozo del aparato de Dot-Blot, utilizando una pipeta multicanal y se lavó con 100 μ L de TE.
6. Finalmente se dejó secar la membrana a temperatura ambiente sobre papel filtro.

**Desnaturalización y fijación del DNA*

1. Ya secas las membranas, se colocaron en NaOH 0.4M durante 10 min a temperatura ambiente en el agitador orbital.
2. Se les retiró el NaOH neutralizando con SSPE 10X durante 10 min a temperatura ambiente y se secaron en la estufa con papel filtro durante 2h a 80°C.
3. Luego se transiluminaron con luz UV de 260 nm durante 3 minutos a temperatura ambiente.

**Prehibridación*

1. Se añadieron 6 mL de solución de prehibridación a tubos de polipropileno de 15 mL, dentro de los cuales se colocaron las membranas enrolladas.
2. Las membranas se prehibridaron durante toda la noche a 42°C.

**Hibridación*

Se agregaron las sondas (SSOP) en los tubos de polipropileno y se dejaron hibridar a 42°C toda la noche (Las sondas utilizadas se muestran en los cuadros del anexo 4).^{106, 109}

**Quimioluminiscencia y revelado de las membranas*

1. Al día siguiente se sacaron las membranas de los tubos y se hizo lo siguiente: lavado dos veces con 2X SSPE/ SDS 0.1% durante 10 minutos; lavado con 5X SSPE/ SDS 0.1 % a la T_m de cada SSOP ($T_m = 2[A+T]+4[G+C]$, ver anexo 4) durante 15 minutos, dos veces; con el amortiguador 1 (100 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.3% Tween 20) durante 5 minutos, una vez; con el amortiguador 2 (reactivo bloqueador) durante 30 minutos, una sola vez; con amortiguador 2 + Fab anti-digoxigenina 1:10,000 durante 30 minutos, una vez; con el amortiguador 1 durante 15 minutos, dos veces; se equilibró con el amortiguador 3 (100 mM Tris-HCl, pH 9.5; 100 mM NaCl; 50 mM $MgCl_2$) durante 5 minutos una sola vez y se incubó con amortiguador 3 + CSPD (1:500) durante 5 minutos. Con excepción de los lavados con 5X SSPE/ SDS 0.1 % a la T_m de cada SSOP, todo lo demás se realizó a temperatura ambiente.
2. Se eliminó el exceso de CSPD, se colocaron las membranas en tubos de hibridación nuevos y se incubaron a 37°C durante 30 minutos.
3. Se expusieron las membranas en una placa radiográfica dentro del casete de exposición durante 5-60 min a temperatura ambiente en un cuarto completamente oscuro. Se llevaron a cabo varias exposiciones para el análisis correcto de los resultados (5 min, 10, min, 15 min, 20 min).
4. Luego se abrió el cassette en completa oscuridad y se colocó la placa radiográfica en un recipiente con el revelador durante 3 minutos.
5. Se enjuagó en agua, se pasó la placa a la solución fijadora durante 3 min, se volvió a enjuagar en agua y se dejó escurrir hasta secar.

Análisis estadístico

Variables

Tipo de lupus eritematoso (LECc o LES).

-Variable cualitativa dicotómica-

Alelos de HLA-DQA1, DQB1 y DRB1.

-Variables cualitativas politómicas-

Se calcularon las **Frecuencias Alélicas** (FA) por conteo directo para obtener la proporción de sujetos con un alelo dado dentro del total de individuos de cada grupo (conteo de cada alelo y dividido entre el número total de genotipos para cada locus de interés).

Por tener dos muestras, se utilizó estadística inferencial y se compararon las frecuencias alélicas de HLA-DQA1, DQB1 y DRB1 en ambos grupos independientes mediante la prueba de χ^2 con corrección de Yates (χ^2Y), ya que esta corrección hace a la prueba más estricta porque el HLA es extraordinariamente polimórfico y cualquier alelo podría mostrar significancia debida al azar, considerando una diferencia como estadísticamente significativa con una p menor o igual a 0.05. También se calculó el intervalo de confianza 95% (IC95%) para la diferencia de proporciones y el poder estadístico de una prueba bilateral para comparar dos proporciones en un estudio transversal, además de las prevalencias, razones de prevalencias con su IC 95%, odds de prevalencias y OR de prevalencias con su IC 95% para LEC, LES y cada uno de los alelos que resultaron significativos.

Los cálculos estadísticos se realizaron con los paquetes estadísticos SPSS 15.0, EPIDAT 3.1 (χ^2 , IC95%, RP y OR) y Microsoft Excel (poder).

*** Prueba de χ^2 con corrección de Yates**

$$\chi^2 = \sum \frac{(|Valor Observado - Valor Teórico| - 0.5)^2}{Valor Teórico} \quad \text{ó } \chi^2 Y = \frac{(ad - bc - N/2)^2 N}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

	LEC	LES
HLA+	a	b
HLA-	c	d

a = número de individuos del grupo 1 positivos para el alelo
 b = número de individuos del grupo 2 positivos para el alelo
 c = número de individuos del grupo 1 negativos para el alelo
 d = número de individuos del grupo 2 negativos para el alelo

***IC95% para la diferencia de proporciones**

$$P_1 - P_2 = (p_1 - p_2) \pm Z_{\alpha} \sqrt{\left\{ \frac{p_1 q_1}{n_1} + \frac{p_2 q_2}{n_2} \right\}}$$

Por tratarse de diferencias, este intervalo no debe incluir el cero.

***Poder estadístico**

$$Z_{1-\beta} = \frac{(p_1 - p_2) (\sqrt{\{n - Z_{1-\alpha/2}\}}) (\sqrt{\{2p(1-p)\}})}{\sqrt{\{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)\}}}$$

Idealmente se espera un poder de la prueba superior al 80%.

Que para el caso de este estudio transversal comparativo:

n = Número de individuos del total de la muestra que tienen el HLA de estudio.

p₁ = Proporción de individuos con el HLA de estudio, que desarrollan LES.

p₂ = Proporción de individuos sin el HLA de estudio, que desarrollan LES.

$$p = \frac{p_1 + p_2}{2}$$

Z_{1- α /2} para un nivel de seguridad de 95% = 1.96

***Prevalencias**

	LEC	LES
HLA+	a	b
HLA-	c	d

a = número de individuos del grupo 1 positivos para el alelo
 b = número de individuos del grupo 2 positivos para el alelo
 c = número de individuos del grupo 1 negativos para el alelo
 d = número de individuos del grupo 2 negativos para el alelo

Prevalencia del alelo en los pacientes con LEC = a/(a+c)

Prevalencia del alelo en los pacientes con LES = b/(b+d)

***Razón de prevalencias (RP)¹¹¹**

Se calculó la razón de prevalencias debido a éste es un buen estimador de la razón de riesgos o riesgo relativo (RR) cuando la duración de la enfermedad es igual entre expuestos y no expuestos, así como cuando no hay migración hacia dentro o fuera de estos grupos. Este sesgo de migración de un grupo a otro se evitó al incluir a los pacientes con LEC de menos de 5 años de evolución, debido a que los casos de lupus cutáneo que evolucionan a LES suelen hacerlo en los primeros cinco años.¹¹²

$$RP \text{ del alelo} = \frac{\text{Prevalencia del alelo en los pacientes con LEC}}{\text{Prevalencia del alelo en los pacientes con LES}}$$

Esta RP indica cuántas veces más probable es que los individuos con LEC tengan el alelo de interés con respecto a los pacientes con LES. Si la razón es superior a 1, indica que es más probable encontrar ese alelo en los pacientes con LEC que en los pacientes con LES. Si es menor a 1, indica lo opuesto. Si es igual a 1, entonces la prevalencia del alelo es similar entre LEC y LES, sugiriendo que no existe relación entre tener el alelo y tener LEC o LES.

$$\text{*IC95\% para la RP} = RP \pm 1.96 \sqrt{x^2}$$

Por tratarse de una razón, este intervalo no debe incluir al 1.

*** Momios de prevalencia¹¹¹**

$$\text{Momios de prevalencia del alelo en LEC} = \frac{\text{Prevalencia del alelo en LEC}}{1 - \text{Prevalencia del alelo en LEC}}$$

$$\text{Momios de prevalencia del alelo en LES} = \frac{\text{Prevalencia del alelo en LES}}{1 - \text{Prevalencia del alelo en LES}}$$

***OR de prevalencias^{111, 112}**

Como las prevalencias tanto de LEC como de LES son pequeñas y los momios (a/b y c/d) fueron casi iguales a las proporciones {a/(a+c) y b/(b+d)}, también se calculó la OR. Su interpretación es similar a la de una

RP: Un valor =1 se interpreta como momios iguales o igual posibilidad de portar el alelo en los que tienen LEC y los que tienen LES; >1 significa que la posibilidad de portar el alelo es mayor en los pacientes con LEC que en los pacientes con LES y un valor <1 significa que la posibilidad de portar el alelo es menor en los que tienen LEC que en los que tienen LES.

OR de prevalencias del alelo = $\frac{\text{Momios de prevalencia del alelo en LEC}}{\text{Momios de prevalencia del alelo en LES}}$

***IC95% para el OR=** $(\ln OR) \pm Z \sqrt{1/a + 1/b + 1/c + 1/d}$

Por tratarse de una razón, este intervalo no debe incluir al 1.

Resultados

De 23,131 biopsias de piel procesadas en la División de Dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González entre 1977 y el 2010, se encontraron 446 pacientes con el diagnóstico de lupus eritematoso, 269 con LEC y 97 con LES. Cinco pacientes con LEC se excluyeron por tener agregada otra enfermedad autoinmune (1 paciente con hipotiroidismo, 1 paciente con dermatomiositis y 1 paciente con esclerosis sistémica) o por conformar un síndrome de superposición (1 paciente) o enfermedad mixta de tejido conectivo (1 paciente). De esos 264 pacientes con LEC, 219 tenían al menos 5 años de evolución, 33 tenían menos de 5 años de evolución y en 13 no fue posible establecer el tiempo de evolución por no estar registrado en el expediente.

Finalmente se incluyeron de manera consecutiva 41 de los 94 pacientes con LES y 32 de los 219 pacientes con LEC, los cuales aceptaron participar en el estudio tras haber sido contactados por teléfono o telegrama y capturados en la consulta externa de Dermatología y Reumatología. De

los pacientes incluidos, se eliminó 1 paciente con LEC debido a que no fue posible extraer el DNA con la primera muestra de sangre y no aceptó una segunda toma de muestra.

Los alelos más frecuentes en los pacientes con LEC fueron el HLA-DQA1*03:01:01, el HLA-DQB1*03:02 y el HLA-DRB1*04:07, mientras que en los pacientes con LES los alelos más frecuentes fueron el HLA-DQA1*05:01, el HLA-DQB1*03:01 y el HLA-DRB1*08:02. Al comparar las frecuencias alélicas del HLA-DQA1, HLA-DQB1 y HLA-DRB1 entre los pacientes con LEC y LES, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los alelos específicos HLA-DQA1*03:01:01, DQB1*03:02, los alelos agrupados HLA-DQ6, DR4 y DR6 (gráficos 1-3 y 5) y en el haplotipo HLA-DQA1*03:01:01-DQB1*03:02 (gráfico 6).

En el cuadro 2 podemos observar que el alelo HLA-DQA1*03:01:01 fue significativamente mayor en los pacientes con LEC (FA 0.42 vs 0.17, diferencia de 0.25 [IC 95%= 0.103-0.396], $p=0.002$, poder 91.5%), en quienes la prevalencia fue 2.4 veces la prevalencia de los pacientes con LES (RP=2.4[IC 95%= 1.4-4.3]) y la posibilidad de portar dicho alelo fué 3.5 veces la posibilidad de portarlo en los pacientes con LES (OR=3.5[IC 95%= 1.6-7.5]).

En el cuadro 3 se observa que el alelo HLA-DQB1*03:02 fue significativamente mayor en los pacientes con LEC (FA 0.39 vs 0.17, diferencia= 0.219 [IC 95%= 0.07-0.36], $p= 0.006$, poder 85.2%). De acuerdo con la RP, la prevalencia de este alelo se duplica en los pacientes con LEC (RP=2.3 [IC 95%= 1.3-4]) y de acuerdo con la OR, la posibilidad de portar dicho alelo es el triple de la posibilidad de que los pacientes con LES lo porten (OR=3 [IC 95%= 1.4-6.6]).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los alelos específicos del HLA-DRB1 (gráfico 3 y cuadro 4).

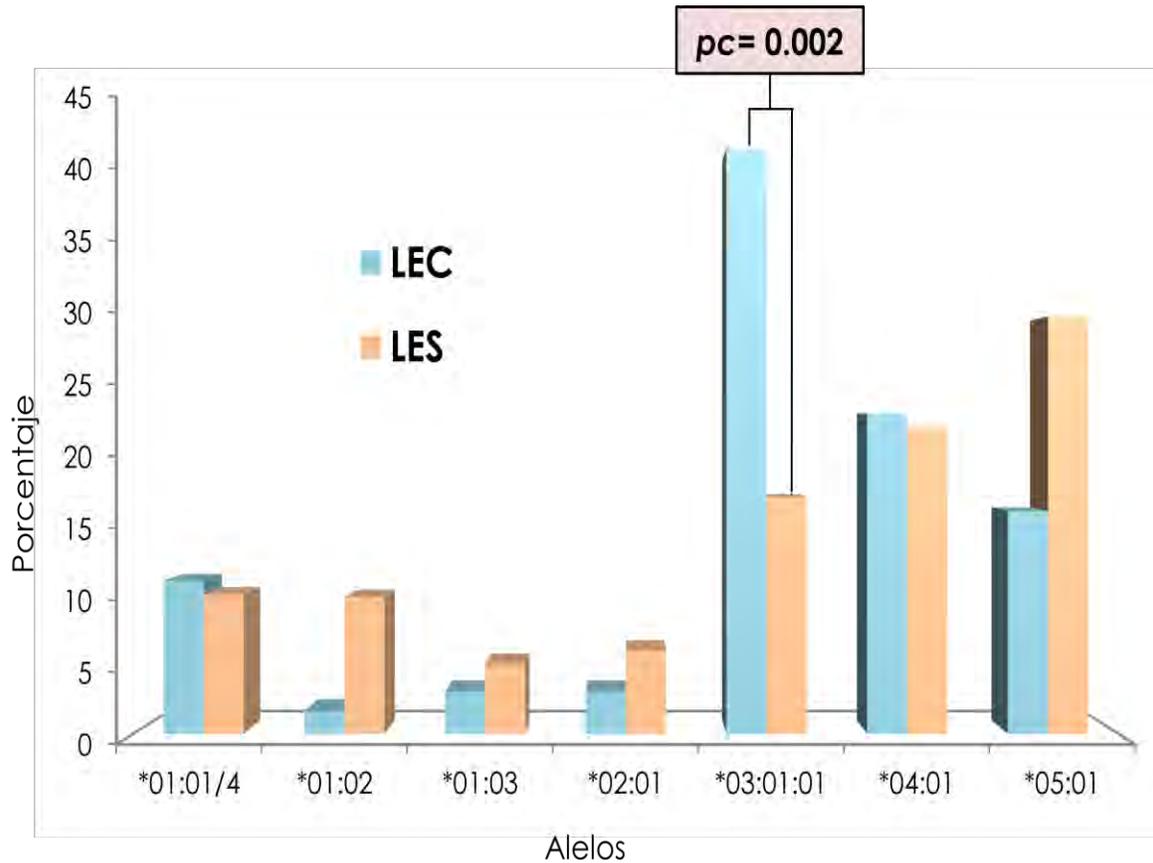


Gráfico 1. Representación gráfica de los alelos DQA1 en LEC y LES

Cuadro 2. Frecuencias alélicas de HLA-DQA1 en Lupus Eritematoso

DQA1 Alelos	LEC		LES		Diferencia (IC**95%)	X ² Y†	p	Poder (%)	RPalelo (IC95%)	ORalelo (IC95%)
	No. (n=62)	FA*	No. (n=82)	FA						
*01:01/4	7	0.110	8	0.100	0.010		NS			
*01:02	1	0.016	8	0.098	0.082	2.73	0.099			
*01:03	2	0.030	4	0.050	0.020		NS			
*02:01	2	0.030	5	0.060	0.030		NS			
*03:01:01	26	0.420	14	0.170	0.250 (0.1-0.4)	9.67	0.002	91.5	2.4 (1.4-4.3)	3.5 (1.6-7.5)
*04:01	14	0.230	18	0.220	0.010		NS			
*05:01	10	0.160	25	0.300	0.140	3.21	0.073			

*FA = Frecuencia alélica, **IC = Intervalo de confianza, †X²Y = Chi cuadrada con la corrección de Yates, OR = Razón de momios, RP = Razón de prevalencia.

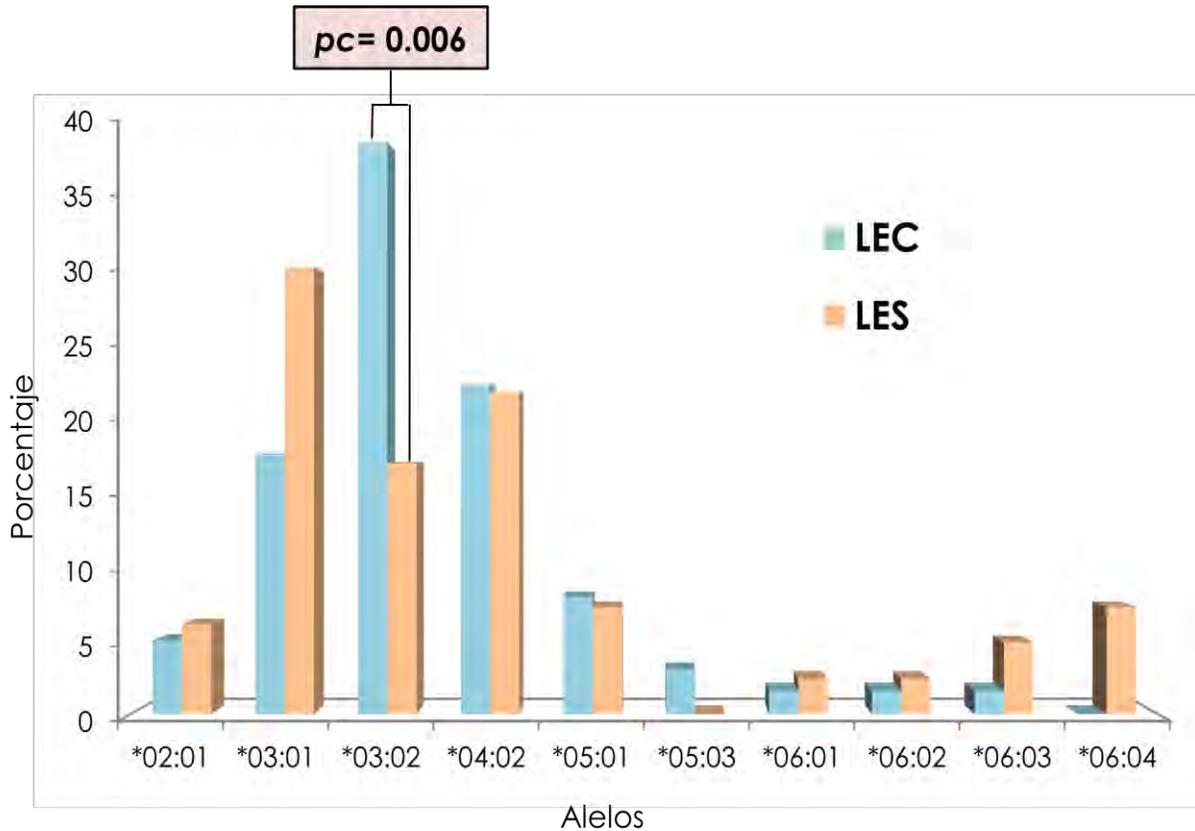


Gráfico 2. Representación gráfica de los alelos DQB1 en LES y LEC

Cuadro 3. Frecuencias alélicas de HLA-DQB1 en Lupus Eritematoso

DQB1 Alelos	LEC		LES		Diferencia (IC**95%)	X ² Y†	P	Poder (%)	RP _{alelo} (IC95%)	OR _{alelo} (IC95%)
	No. (n=62)	FA*	No. (n=82)	FA						
*02:01	3	0.050	5	0.061	0.011		NS			
*03:01	11	0.177	25	0.305	0.128		NS			
*03:02	24	0.390	14	0.171	0.219 (0.07-0.36)	7.43	0.006	85.2	2.3 (1.3-4.0)	3.0 (1.4-6.6)
*04:02	14	0.225	18	0.220	0.005		NS			
*05:01	5	0.080	6	0.073	0.007		NS			
*05:03	2	0.030	0	0.000	0.030		NS			
*06:01	1	0.016	2	0.024	0.080		NS			
*06:02	1	0.016	2	0.024	0.080		NS			
*06:03	1	0.016	4	0.049	0.033		NS			
*06:04	0	0.000	6	0.073	0.073	3.08	0.079			

*FA = Frecuencia alélica, **IC = Intervalo de confianza, †X²Y = Chi cuadrada con la corrección de Yates, RP = Razón de prevalencia.

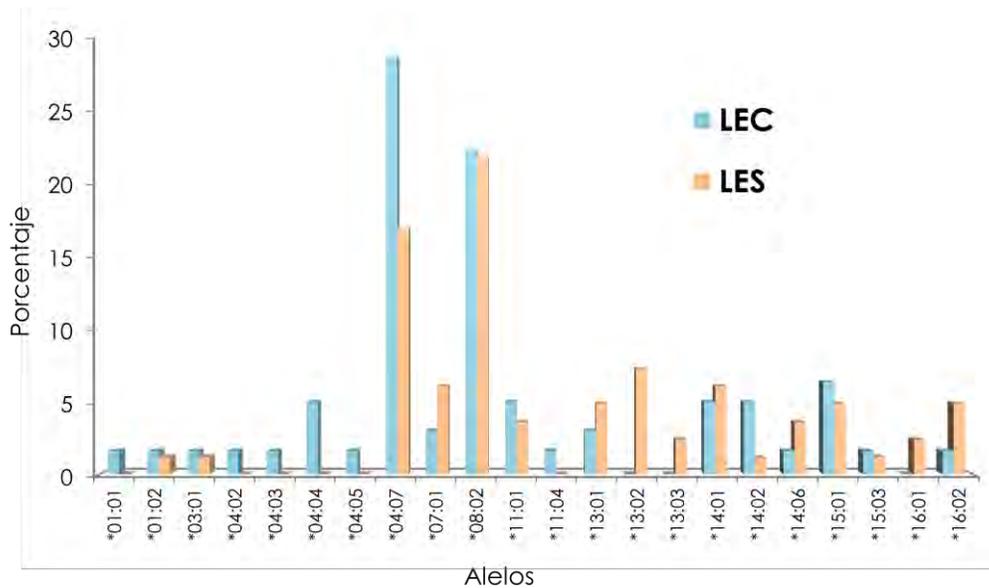


Gráfico 3. Representación gráfica de los alelos DRB1 en LES y LEC

Cuadro 4. Frecuencias alélicas del HLA-DRB1 en Lupus Eritematoso

DRB1 Alelos	LEC		LES		Diferencia	P
	No. (n=62)	FA*	No. (n=82)	FA		
*01:01	1	0.016	0	0	0.016	NS
*01:02	1	0.016	1	0.012	0.004	NS
*03:01	1	0.016	1	0.012	0.004	NS
*04:02	1	0.016	0	0	0.016	NS
*04:03	1	0.016	0	0	0.016	NS
*04:04	3	0.050	0	0	0.050	NS
*04:05	1	0.016	0	0	0.016	NS
*04:07	18	0.290	14	0.171	0.119	NS
*07:01	2	0.030	5	0.061	0.031	NS
*08:02	14	0.225	18	0.220	0.005	NS
*11:01	3	0.050	3	0.036	0.014	NS
*11:04	1	0.016	0	0	0.016	NS
*13:01	2	0.030	4	0.049	0.019	NS
*13:02	0	0	6	0.073	0.073	NS
*13:03	0	0	2	0.024	0.024	NS
*14:01	3	0.050	5	0.061	0.011	NS
*14:02	3	0.050	9	0.110	0.060	NS
*14:06	1	0.016	3	0.036	0.020	NS
*15:01	4	0.064	4	0.049	0.015	NS
*15:03	1	0.016	1	0.012	0.004	NS
*16:01	0	0	2	0.024	0.024	NS
*16:02	1	0.016	4	0.049	0.033	NS

*FA = Frecuencia alélica, **IC = Intervalo de confianza.

Al agrupar los alelos del HLA-DQB1 y del HLA-DR4, fue posible observar diferencias estadísticamente significativas en los alelos HLA-DQ6, DR4 y DR6 entre LEC y LES (gráficos 4 y 5, cuadros 5 y 6). El HLA-DQ6 fue significativamente mayor en los pacientes con LES (FA 0.171 vs 0.048, diferencia= 0.123 [IC 95%= 0.025-0.22], $p= 0.035$, poder 69.7%). De acuerdo con la RP de 0.3 [IC 95%= 0.1-0.9], este alelo es 97.7% menos prevalente en los pacientes con LEC y, con una OR de 0.2 [IC 95%= 0.1-0.9], la posibilidad de portar este alelo se reduce en un 80% en los pacientes con LEC, comparado con los pacientes con LES (gráfico 4 y cuadro 5).

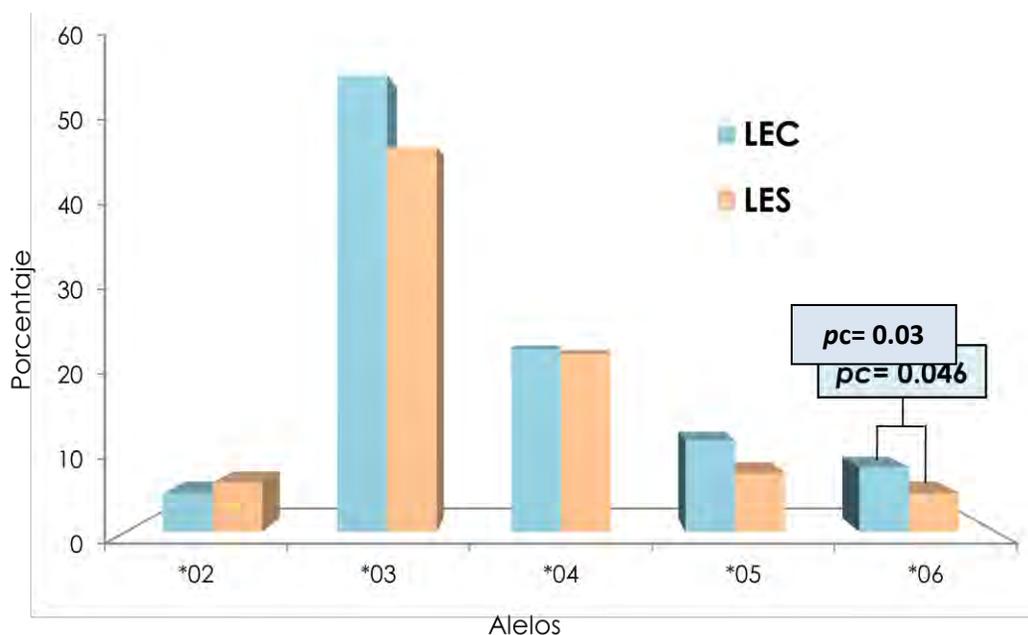


Gráfico 4. Representación gráfica de los grupos de alelos DQB1 en LES y LEC

Cuadro 5. Frecuencias alélicas de los grupos de alelos del HLA-DQB1 en Lupus Eritematoso

DQB1 Alelos	LEC		LES		Diferencia (IC**95%)	Fisher	Poder (%)	RP _{alelo} (IC95%)	OR _{alelo} (IC95%)
	No. (n=62)	FA*	No. (n=82)	FA					
*02	3	0.048	5	0.061					
*03	35	0.565	39	0.476					
*04	14	0.226	18	0.220					
*05	7	0.113	6	0.073					
*06	3	0.048	14	0.171	0.123 (0.025-0.22)	0.03	69.7	0.3 (0.1-0.9)	0.2 (0.1-0.9)

*FA = Frecuencia alélica, **IC = Intervalo de confianza, RP= Razón de prevalencia

El HLA-DR4 fue significativamente mayor en los pacientes con LEC (FA 0.39 vs 0.17, diferencia= 0.22 [IC 95%= 0.07-0.35], $p= 0.011$, poder 78%), mientras que el HLA-DR6 fue mayor en los pacientes con LES (FA 0.35 vs 0.15, diferencia= 0.2 [IC 95%= 0.07-0.35], $p=0.009$, poder 84%). De acuerdo con la RP de 2.3 [IC 95%= 1.3-4] para el HLA-DR4, su prevalencia en los pacientes con LEC fué el doble de la observada en LES y de acuerdo con una OR de 3.1 [IC 95%= 1.4-6.6], la posibilidad de portar este alelo se triplica en los pacientes con LEC con respecto a los pacientes con LES. En cuanto al alelo HLA-DR6, una RP de 0.4 [IC 95%= 0.2-0.8] indica que su prevalencia en los pacientes con LEC es 60% menor a la observada en LES y una OR de 0.3 [IC 95%= 0.1-0.7] indica que la posibilidad de que los pacientes con LEC porten este alelo es 70% menor que en los pacientes con LES (gráfico 5 y cuadro 6).

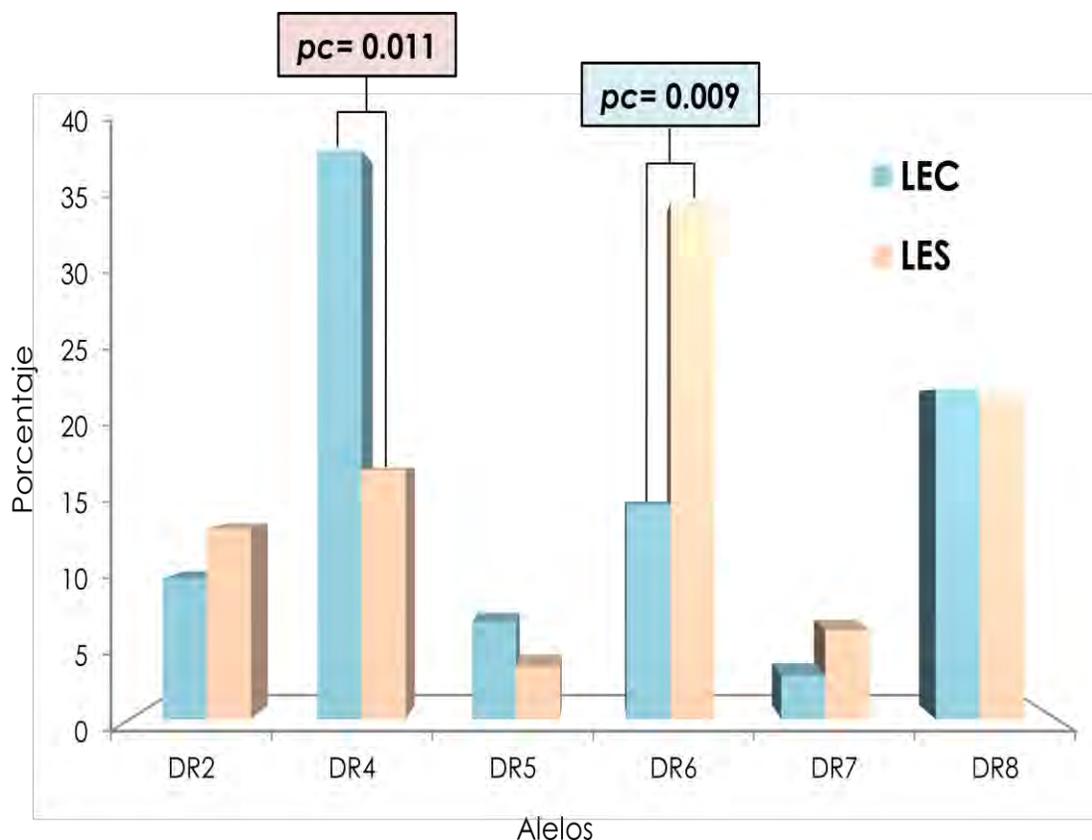


Gráfico 5. Representación gráfica de los grupos de alelos DRB1 en LES y LEC

Cuadro 6. Frecuencias de los grupos de alelos de HLA-DRB1 en Lupus Eritematoso

DRB1	LEC		LES		Diferencia (IC**95%)	χ^2Y^\dagger	P	Poder (%)	RP ^{alelo} (IC95%)	OR ^{alelo} (IC95%)
	No. (n=62)	FA*	No. (n=82)	FA						
DR2	6	0.096	11	0.13	0.034		NS			
DR4	24	0.39	14	0.17	0.22 (0.07-0.36)	7.4	0.006	78	2.3 (1.3-4)	3.1 (1.4-6.6)
DR5	4	0.066	3	0.036	0.030		NS			
DR6	9	0.15	29	0.35	0.20 (0.07-0.35)	6.86	0.009	84	0.4 (0.2-0.8)	0.3 (0.1-0.7)
DR7	2	0.030	5	0.061	0.031		NS			
DR8	14	0.225	18	0.220	0.005		NS			

*FA = Frecuencia alélica, **IC = Intervalo de confianza, † χ^2Y = Chi cuadrada con la corrección de Yates, RP=Razón de prevalencias, OR= Razón de momios

Los haplotipos HLA-DQA1-DQB1 más frecuentes en ambos grupos fueron el HLA-DQA1*03:01:01-DQB1*03:02 y el HLA-DQA1*04:01-DQB1*04:02. El HLA-DQA1*03:01:01-DQB1*03:02 fue significativamente mayor en los pacientes con LEC (FH 0.387 vs 0.171, diferencia= 0.216 [IC 95%= 0.07-0.36], $p= 0.006$, poder 79.65%). De acuerdo con la RP de 2.3 [IC 95%= 1.3-4], este haplotipo en LEC tiene dos veces la prevalencia observada en LES y, de acuerdo con la OR de 3.1 [IC 95%= 1.4-6.6], la posibilidad de portar este alelo en LEC es el triple de la posibilidad de observarlo en los pacientes con LES (gráfico 6 y cuadro 7).

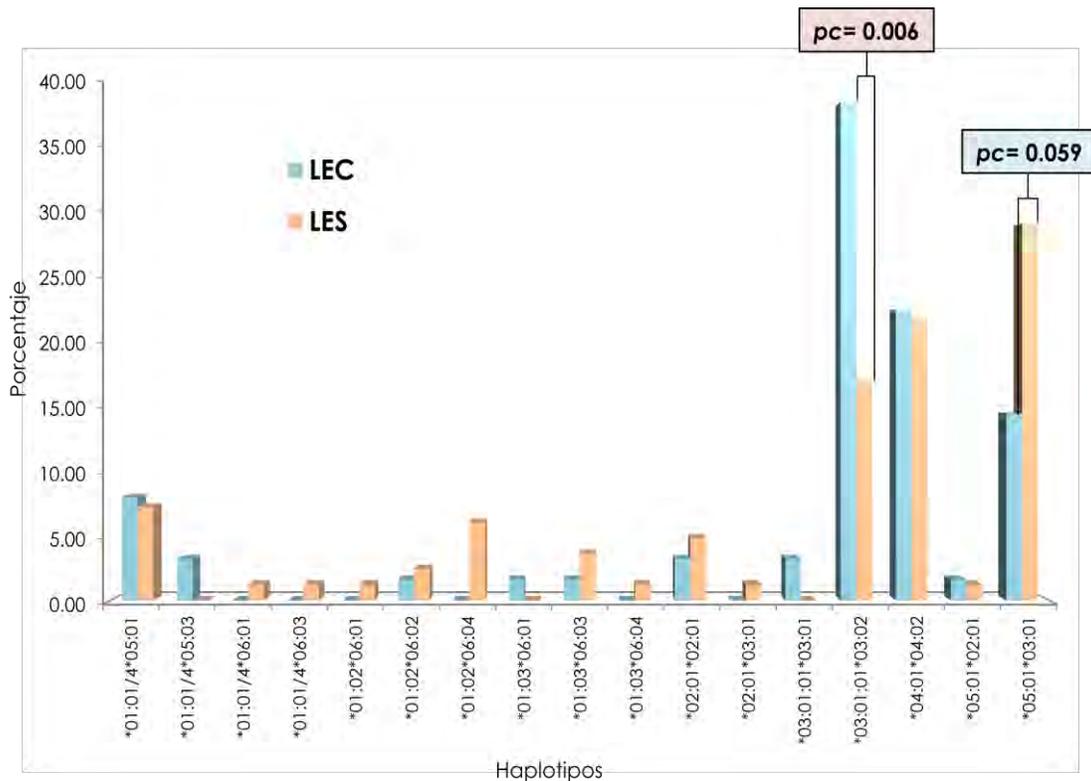


Gráfico 6. Representación gráfica de los haplotipos DQA1-DQB1 en LEC y LES

Cuadro 7. Frecuencias haplotípicas de HLA-DQA-DQB1 en Lupus Eritematoso

Haplotipos DQA1-DQB1	LEC		LES		Diferencia (IC**95%)	X ² Y†	p	Poder (%)	RPh (IC95%)	ORateo (IC95%)
	No. (n=62)	FH*	No. (n=82)	FH						
*01:01/4*05:01	5	0.081	6	0.073	0.008					
*01:01/4*05:03	2	0.032	0	0.000	0.032					
*01:01/4*06:01	0	0.000	1	0.012	0.012					
*01:01/4*06:03	0	0.000	1	0.012	0.012					
*01:02*06:01	0	0.000	1	0.012	0.012					
*01:02*06:02	1	0.016	2	0.024	0.008					
*01:02*06:04	0	0.000	5	0.061	0.061					
*01:03*06:01	1	0.016	0	0.000	0.016					
*01:03*06:03	1	0.016	3	0.037	0.021					
*01:03*06:04	0	0.000	1	0.012	0.012					
*02:01*02:01	2	0.032	4	0.049	0.017					
*02:01*03:01	0	0.000	1	0.012	0.012					
*03:01:01*03:01	2	0.032	0	0.000	0.032					
*03:01:01*03:02	24	0.387	14	0.171	0.216 (0.07-0.36)	7.43	0.006	79.65	2.3 (1.3-4.0)	3.1 (1.4-6.6)
*04:01*04:02	14	0.226	18	0.220	0.006					
*05:01*02:01	1	0.016	1	0.012	0.004					
*05:01*03:01	9	0.145	24	0.293	0.148 (0.017-0.28)	3.55	0.059			

*FA = Frecuencia alélica, **IC = Intervalo de confianza, †X²Y = Chi cuadrada con la corrección de Yates, RP=Razón de prevalencia.

Los haplotipos HLA-DQA1-DQB1-DRB1 más frecuentes en todos los pacientes evaluados fueron el HLA-DQA1*03:01:01-DQB1*03:02-DRB1*04:07 y el HLA-DQA1*04:01-DQB1*04:02-DRB1*08:02, pero cuando se compararon los pacientes con LEC y LES, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (gráfico 7 y cuadro 8).

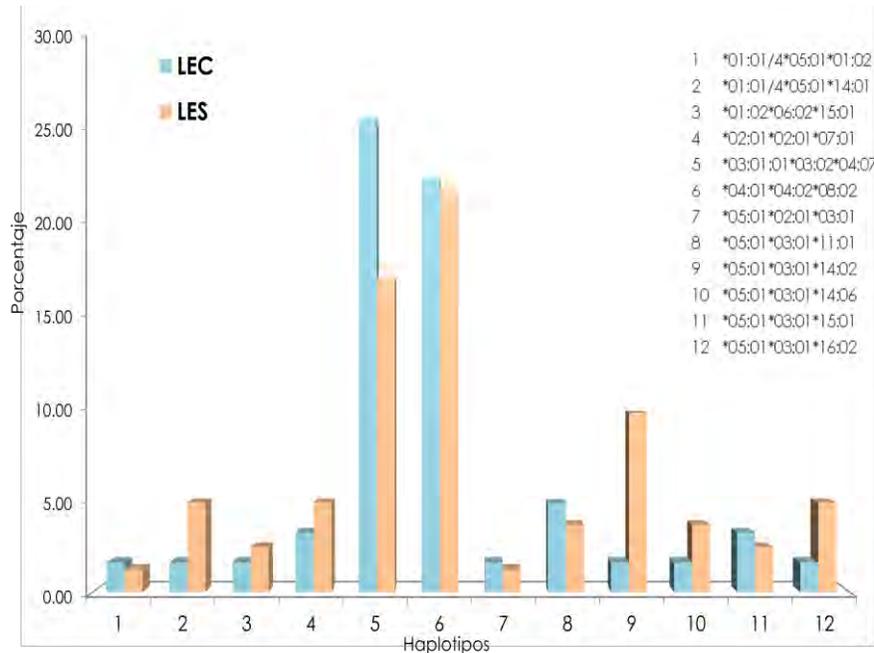


Gráfico 7. Representación gráfica de los haplotipos DQA1-DQB1-DRB1 en LEC y LES

Cuadro 8. Frecuencias haplotípicas de HLA-DQA1-DQB1-DRB1 en Lupus Eritematoso

Haplotipos DQA1-DQB1-DRB1	LEC		LES		Diferencia (IC**95%)	Fisher
	No. (n=62)	FH*	No. (n=82)	FH		
*01:01/4*05:01*01:02	1	0.016	1	0.012	0.004	NS
*01:01/4*05:01*14:01	1	0.016	4	0.049	0.033	NS
*01:02*06:02*15:01	1	0.016	2	0.024	0.008	NS
*02:01*02:01*07:01	2	0.032	4	0.049	0.017	NS
*03:01:01*03:02*04:07	16	0.258	14	0.171	0.087	NS
*04:01*04:02*08:02	14	0.226	18	0.220	0.006	NS
*05:01*02:01*03:01	1	0.016	1	0.012	0.004	NS
*05:01*03:01*11:01	3	0.048	3	0.037	0.012	NS
*05:01*03:01*14:02	1	0.016	8	0.098	0.08 (-0.392-0.554)	0.078
*05:01*03:01*14:06	1	0.016	3	0.037	0.020	NS
*05:01*03:01*15:01	2	0.032	2	0.024	0.008	NS
*05:01*03:01*16:02	1	0.016	4	0.049	0.033	NS

*FA = Frecuencia alélica, **IC = Intervalo de confianza.

Discusión

Los resultados de este estudio sugieren una clara diferencia entre LEC y LES, no sólo en el comportamiento clínico, sino también en el trasfondo genético, puesto que encontramos diferencias significativas en el HLA-DQA1*03:01:01, el HLA-DQB1*03:02, el HLA-DQB1*06, el HLA-DRB1*04 y el HLA-DRB1*06. Como los alelos del HLA forman haplotipos, también se compararon estos entre los grupos, resultando significativa la diferencia en el HLA-DQA1*03:01:01-DQB1*03:02, que tiene desequilibrio de ligamiento con el HLA-DR4, llamando la atención que tanto este haplotipo como los alelos diferenciales, son mexicanos.

Hasta ahora no existen muchos estudios que comparen los alelos del HLA entre LEC y LES, pues la mayoría se trata de estudios de casos y controles entre LES y controles sanos. Los alelos del HLA-DQA1 que se han asociado con LES son el HLA-DQA1*05:01 en España,⁴⁹ Reino Unido,⁹⁰ Noruega⁵⁴ y Dinamarca,⁵² además del HLA-DQA1*01:02 en Jalisco⁸¹ y China.⁹¹ Ambos alelos se han reportado en pacientes con LES de Túnez,⁹² y el HLA-DQA1*01:02 está descrito como protector contra daño renal en pacientes con LES de Italia.⁷⁴ Ninguno de esos alelos del HLA-DQA1 fueron diferentes entre nuestros casos con LEC y LES, aunque el HLA-DQA1*05:01, más frecuente en los pacientes con LES, mostró tendencia a la significancia estadística ($p=0.073$). El alelo que sí mostró diferencia significativa fue el HLA-DQA1*03:01:01, más frecuente en los pacientes con LEC, el cual no se había reportado previamente como alelo de riesgo ni en LEC ni en LES.

Los alelos del HLA-DQB1 que se han asociado con LES son el HLA-DQB1*04:02 en Jalisco,⁸¹ el HLA-DQB1*06:01 en Malasia⁹¹ e Irán,⁹⁴ el HLA-DQB1*06:02 en Japón,⁶⁸ el HLA-DQB1*06:09 en Irán,⁹⁴ el HLA-DQB1*02:01 en Noruega,⁵⁴ Alemania⁹⁵ y Hungría,⁶⁰ además del HLA-DQB1*05:01 en Tailandia,⁷³ Malasia⁹¹ y Taiwán.⁹³ Por otro lado, en comparación con

controles sanos, los pacientes con LES tienen disminución del HLA-DQB1*03:03, DQB1*05:01 (Jalisco),⁸¹ DQB1*03:01 y DQB1*03:04 (Irán).⁹⁴ En nuestro estudio no se observó diferencia en esos alelos, sino en el HLA-DQB1*03:02, que fue más frecuente en LEC, y en el HLA-DQB1*06, que fue mayor en los pacientes con LES. Hasta ahora no existían estudios de HLA-DQB1 en LEC y la mayor frecuencia de HLA-DQB1*06 en LES concuerda con lo reportado previamente en estudios asiáticos.^{68, 91, 94}

La mayoría de los estudios concuerdan que los principales alelos de riesgo para LES son el HLA-DR2 y DR3 (el DR2 principalmente en asiáticos⁶⁸⁻⁷³ y el DR3 en europeos,^{4,34,42,47,48-61} aunque también se han reportado en otras poblaciones debido al mestizaje, como los Estados Unidos,^{38,75-79} Sudáfrica,⁸⁰ la India,⁶⁶ México^{63, 81} y otros países latinoamericanos).⁶² Estos alelos fueron poco frecuentes en nuestros casos, en especial el DR3, que es de origen europeo, seguramente porque la mayoría de nuestros pacientes incluidos tienen un mayor componente amerindio en su mestizaje, a saber por la mayor frecuencia del HLA-DQ3 y DR8 en ambos grupos (cuadros 4 y 6), que son de los alelos más frecuentes en población mestiza mexicana.¹¹⁰

Otros alelos reportados en asociación con LES son el HLA-DR6,⁴⁹ DR9,⁷⁰ DR5 (HLA-DRB1*11:01),⁶³ DR7⁶⁷ y DR8 (HLA-DRB1*08:02), estos tres últimos reportados en México.^{63, 83} También se han comparado casos de LES con y sin nefropatía, afección de sistema nervioso y vasculitis, observando que el HLA-DR1 y DR2 se asocian más con formas graves, mientras que el HLA-DR4 y DR9 con formas leves de la enfermedad.^{44, 46, 70 y 84} Estos datos concuerdan con nuestros hallazgos en el HLA-DR, mostrando mayor frecuencia del HLA-DR4 en los pacientes con LEC, similar a la asociación de este alelo con formas leves de LES,^{44, 46, 51, 70, 84 y 87} y mayor frecuencia del HLA-DR6 en LES, el cual ya está reportado como alelo de riesgo para LES en estudios de casos y controles.⁴⁹

Respecto a los estudios precursores de HLA-DR en pacientes con LEC, los alelos de riesgo para LED, evidenciados mediante estudios de casos y controles, son el HLA-DRB1*16 (DR2) y DR4 en México,⁸⁷ el HLA-DR2 y DR3 en Alemania,⁸⁸ y el HLA-DR6 en individuos con ascendencia tanto europea como africana de los Estados Unidos.⁸⁹ Un estudio japonés que evaluó los alelos del HLA-DR entre LES y distintas formas clínicas de LEC, demostró que el HLA-DRB1*1501 (DR2) fue más frecuente tanto en LED como en LES, a diferencia del LECSA y el lupus tímido.^{85,86} Es importante recalcar que ninguno de esos estudios consideró la posibilidad de evolución a LES, por lo que existe el sesgo de heterogeneidad en los pacientes incluidos con LEC. Debido a que la mayoría de los pacientes con LEC que llegan a desarrollar LES lo hacen en los primeros cinco años de evolución, decidimos reducir ese sesgo al incluir solamente a pacientes con LEC con al menos cinco años con sólo manifestaciones cutáneas y que en ningún momento hubieran presentado los principales marcadores de evolución a LES (linfopenia $\leq 1500/\text{mm}^3$, títulos de anticuerpos antinucleares $\geq 1:320$, especialmente con patrón homogéneo o moteado fino, proteinuria de $\geq 0.5\text{g/día}$ o cilindruria ni datos francos de afección sistémica). Esto pudiera explicar las diferencias en nuestros resultados además de que no existen muchos estudios similares y las poblaciones tienen distinto componente en su mestizaje, por ejemplo el mestizaje en la ciudad de México, de donde provienen los pacientes estudiados en este trabajo, está conformado por 22% de haplotipos amerindios, 14% europeos, 4.9% africanos y 58.2% de haplotipos mixtos.¹¹⁰

Por otro lado, aunque el tamaño de muestra no fue calculado para el análisis de haplotipos, fue evidente la mayor frecuencia del HLA-DQA1*03:01:01-DQB1*03:02 en LEC, el cual no se había reportado previamente y está en desequilibrio de ligamiento con el HLA-DR4, que ya se había reportado previamente en pacientes mexicanos con LED⁸⁷ y que también demostró ser más frecuente en nuestros casos con LEC, sugiriendo

que este haplotipo se asocia con formas de LE menos severas, como las limitadas a la piel.

Este trabajo sugiere que la fisiopatogenia del LEC es diferente a la de LES, al menos en lo referente al papel del HLA, que es responsable de presentar antígenos a los linfocitos T y activar la respuesta inmunitaria adaptativa. De esta manera, el HLA participa en la resistencia y susceptibilidad a ciertas enfermedades.¹⁹

Como los agentes patógenos son distintos en cada región geográfica y presentan variaciones en sus aminoácidos, dichas variaciones son capaces de inducir cambios conformacionales en el dominio β -1 de las moléculas del HLA, ya que éste es el sitio que une a los péptidos antigénicos, explicando así por qué es éste el sitio de mayor variabilidad en el HLA. Este fenómeno de variabilidad en los agentes patógenos también explica la variabilidad del HLA en las poblaciones, ya que la selección natural permite la supervivencia de quienes resisten procesos infecciosos mediante mecanismos de adaptación, los cuales son distintos entre los individuos; de tal forma que en una población dada, ciertos HLA son capaces de unir péptidos antigénicos de un microorganismo y presentarlos a las células T, pero otros no, por lo que sólo algunos individuos son susceptibles a una enfermedad inducida por microorganismos.^{20, 31}

Algunas enfermedades autoinmunes se asocian con ciertos alelos del HLA, pero el mecanismo aún no se entiende por completo.²⁰ Una hipótesis atribuye una mayor o menor afinidad a ciertos péptidos, facilitando o dificultando su entrada a las células; otra es la intervención temprana del HLA en el timo al determinar qué antígenos serán presentados a los linfocitos T y finalmente, el mecanismo de tolerancia de las células T hacia agentes patógenos y el mimetismo molecular entre los agentes infecciosos y los antígenos del hospedero.¹⁹ Una vez desencadenada la respuesta inmunitaria, ésta se propaga hasta que entran en juego factores

reguladores que limitan o aumentan el proceso, produciendo daño tisular.^{4,12,32}

Este estudio puede considerarse el antecedente a otros que incluyan casos tanto de LES, en sus distintas formas de afección orgánica, como de LEC, también con sus distintas formas de presentación clínica, y compararlos con controles sanos para confirmar nuestros hallazgos e identificar alelos de susceptibilidad y de protección, de utilidad al momento de establecer el diagnóstico.

Conclusión

Este estudio sugiere que LEC y LES siguen mecanismos fisiopatogénicos distintos, en donde un HLA de origen mexicano participa en la distinción de las formas de presentación clínica del lupus eritematoso hacia la forma cutánea de la enfermedad.

Bibliografía

1. Hannahs B. Systemic lupus erythematosus. In: Kasper, Braunwald, Fauci, Hauser, Longo and Jameson. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17th edition. USA: McGraw Hill; 2009. p. 2075-83.
2. Costner MI, Sontheimer RD. Lupus erythematosus. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SA, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 7th edition, USA: Mc Graw Hill, 2008: 1515-1535.
3. Sontheimer RD, McCauliffe DP. Lupus-Specific Skin Disease (Cutaneous LE). In: Wallace D, Hannahs B. Dubois' Lupus Erythematosus. 7th edition. USA: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. p 576-613.

4. Graham RR, Ortmann W, Rodine P, Espe K, Langefeld C, Lange E, Williams A, Beck S, Kyogoku C, Moser K, Gaffney P, Gregersen PK, Criswell LA, Harley JB, Behrens TW. Specific combinations of HLA-DR2 and DR3 class II haplotypes contribute graded risk for disease susceptibility and autoantibodies in human SLE. *Eur J Hum Genet* 2007; 15(8):823-30.
5. Gilliam JN. The cutaneous signs of lupus erythematosus. *Cont Educ Fam Physician* 1977; 6: 34-70.
6. Arenas R. *Dermatología atlas, diagnóstico y tratamiento*. 4ª edición. México: McGraw-Hill Interamericana; 2009.
7. Lee L. Lupus erythematosus. In: Bologna J, Jorizzo J and Rapini R. *Dermatology*. 2nd edition. Spain: Mosby Elsevier; 2008. p 561-74.
8. Crowson AN. Superficial and deep perivascular dermatitis. In: Barnhill RL and Crowson AN. *Textbook of Dermatopathology*. 2nd edition. USA: McGraw-Hill; 2004. P 89-92.
9. Ackerman AB. Histologic diagnosis of inflammatory skin diseases. Williams and Wilkins, 1997. 525-546.
10. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9):1725.
11. Tebbe B, Orfanos CE. Epidemiology and socioeconomic impact of skin disease in lupus erythematosus. *Lupus* 1997; 6(2):96-104.
12. Le Bozec P, La Guyadec T, Crickx B, Grossin M, Belaich S. Chronic lupus erythematosus in lupus disease. Retrospective study of 136 patients. *Presse Med* 1994; 23(35):1598-602.
13. Rosen A. Mechanisms of autoimmunity. In: Rose N. *The autoimmune diseases*. 4th edition. USA: Elsevier; 2006. p. 739-47.
14. Patel RM, Marfatia YS. Lupus panniculitis as an initial manifestation of systemic lupus erythematosus. *Indian J Dermatol*. 2010; 55(1):99-101.

15. Strober BE. Lupus panniculitis (lupus profundus). *Dermatol Online J* 2001; 7(2):20.
16. Tebbe B, Mansmann U, Wollina U, Auer-Grumbach P, Licht-Mbalyohere A, Arensmeier M, Orfanos CE. Markers in cutaneous lupus erythematosus indicating systemic involvement. A multicenter study on 296 patients. *Acta Derm Venereol* 1997; 77(4):305-8.
17. Tebbe B. Clinical course and prognosis of cutaneous lupus erythematosus. *Clin Dermatol*. 2004; 22(2):121-4.
18. Corzo D, Salazar M, Granja CB, Yunis EJ. Advances in HLA genetics. *Exp Clin Immunogenet* 1995; 12(3):156-70.
19. Alves C, Souza T, Meyer I, Betânia M, Brites C. Immunogenetics and Infectious Diseases: Special Reference to the Mayor Histocompatibility Complex. *The Braz J Infect Dis* 2006; 10(2):122-31.
20. Choo SY. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical testing and Clinical implications. *Yonsei Med J* 2007; 48(1):11-23.
21. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000; 343(10):702-9.
22. Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunol Today* 1993; 14: 349-352.
23. Gao GF, Willcox BE, Wyer JR, Boulter JM, O'Callaghan CA, Maenaka K, Stuart DI, Jones EY, Van Der Merwe PA, Bell JI, Jakobsen BK. Classical and non classical class I major histocompatibility complex molecules exhibit subtle conformational differences that affect binding to CD8 alpha. *J Biol Chem* 2000; 275(20):15232-8.
24. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364:33-39.
25. Madden DR. The three dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 1995; 12:181-208.

26. Cresswell P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:259-294.
27. Brodsky F, Lem L, Bresnahan P. Antigen processing and presentation. *Tissue Antigens* 1996; 47:464-471.
28. Stratikos E, Wiley DC and Stern LJ. Enhanced Catalytic Action of HLA-DM on the Exchange of Peptides Lacking Backbone Hydrogen Bonds between their N-Terminal Region and the MHC Class II β -Chain. *J Immunol* 2004; 172: 1109-1117.
29. Zhou Z, Callaway KA, Weber DA and Jensen PE. HLA-DM functions through a mechanism that does not require specific conserved hydrogen bonds in class II MHC-peptide complexes. *J Immunol* 2009; 183(7): 4187–4191.
30. Rothbard JB, Geffer ML. Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:527-65.
31. Nairn R, Helbert M. *Immunology for medical students*. 2nd edition. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier; 2002.
32. Hewagama A, Richardson B. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2009; 33(1):3-11.
33. Deng Y and Tsao B. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6(12): 683–692.
34. Criswell LA. The genetic contribution to systemic lupus erythematosus. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2008; 66(3):176-83.
35. Moser KL, Kelly JA, Lessard CJ, Harley JB. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2009; 10(5):373-9.
36. Harley I, Kaufman K, Langefeld C, Harley J, Kelly J. Genetic Susceptibility to Lupus: New insights from fine mapping and genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 2009; 10(5): 285–290.

37. Graham RR, Cotsapas C, Davies L, Hackett R, Lessard CJ. Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2008; 40:1059-61.
38. Bronson PG, Komorowski LK, Ramsay PP, May SL, Noble J, Lane JA, Thomson G, Claas FH, Seldin MF, Kelly JA, Harley JB, Moser KL, Gaffney PM, Behrens T, Criswell LA, Barcellos LF. Analysis of maternal-offspring HLA compatibility, parent-of-origin effects, and non inherited maternal antigen effects for HLA-DRB1 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2010; 62(6):1712-7.
39. Musone SL. Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2008; 40:1062-64.
40. International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN). Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITAGM, P XK, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet* 2008; 40: 204-10.
41. Hom G. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITAGM-ITAX. *N Engl J Med* 2008; 358: 900-9.
42. Fernando MM, Stevens C, Sabeti P, Walsh E, McWhinnie AJM, Shah A. Identification of two independent risk factors for lupus within the MHC in United Kingdom families. *PLoS Genet* 2007; 3(11): e192.
43. Lulli P, Sebastiani GD, Trabace S, Passiu G, Cappellacci S, Porzio F. HLA antigens in Italian patients with systemic lupus erythematosus: evidence for the association of DQw2 with the autoantibody response to extractable nuclear antigens. *Clin Exp Rheumatol* 1991; 9 (5): 475-9.
44. Kelly JA, Moser KL and Harley JB. The genetics of systemic lupus erythematosus; putting the pieces together. *Genes Immun* 2002; 3(Suppl 1): S71-S85.
45. Nishimura Y, Kanai T, Oiso M, Tabata H, Ito H, Kira J, Chen YZ, Matsushita S. Molecular analyses of HLA class II-associated

- susceptibility to subtypes of autoimmune diseases unique to Asians. *Int J Cardiol* 1998; 66 Suppl 1:S93-105.
46. Reveille JD, Moulds JM, Ahn C, Friedman AW, Baethge B, Roseman J, Straaton KV, Alarcón GS. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: I. The effects of HLA class II, C4, and CR1 alleles, socioeconomic factors, and ethnicity at disease onset. LUMINA Study Group. *Lupus in minority populations, nature versus nurture. Arthritis Rheum* 1998; 41(7):1161-72.
 47. Schotte H, Willeke P, Tidow N, Domschke W, Assmann G, Gaubitz M, Schlüter B. Extended haplotype analysis reveals an association of TNF polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus beyond HLA-DR3. *Scand J Rheumatol* 2005; 34(2):114-21.
 48. Smerdel-Ramoya A, Finholt C, Lilleby V, Gilboe LM, Harbo HF, Maslinski S, Forre O, Thorsby E and Lie BA. Systemic Lupus erythematosus and the extended major histocompatibility complex –evidence for several predisposing loci. *Rheumatology* 2005; 44: 1368-73.
 49. Martín-Villa JM, Martínez-Laso J, Moreno-Pelayo M, Castro-Panete MJ, Martínez-Quiles N, Álvarez M. Differential contribution of HLA-DR, DQ and TAP2 alleles to systemic lupus erythematosus susceptibility in Spanish patients: role of TAP2*01 alleles in Ro autoantibody production. *Ann Rheum Dis* 1998; 57: 214-9.
 50. Campos MT, Ocón P, Alonso A, Belmonte MA, García R, Frutos MA. Class I and II HLA antigens in patients with systemic lupus erythematosus in the south of Spain. *Med Clin* 1994; 102 (18): 688-93.
 51. Gladman DD, Urowitz MB, Darlington GA. Disease expression and class II HLA antigens in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1999; 8(6):466-70.
 52. Cowland JB, Andersen V, Halberg P, Morling N. DNA polymorphism of HLA class II genes in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1994; 43(1):34-7.

53. Tjernström F, Hellmer G, Nived O, Truedsson L, Sturfelt G. Synergetic effect between interleukin-1 receptor antagonist allele (IL1RN*2) and MHC class II (DR17, DQ2) in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1999; 8(2):103-8.
54. Skarsvåg S, Hansen KE, Holst A, Moen T. Distribution of HLA class II alleles among Scandinavian patients with systemic lupus erythematosus (SLE): an increased risk of SLE among non [DRB1*03, DQA1*0501, DQB1*0201] class II homozygotes? *Tissue Antigens* 1992; 40(3):128-33.
55. Reinharz D, Tiercy JM, Mach B, Jeannet M. Absence of DRw15/3 and of DRw15/7 heterozygotes in Caucasian patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1991; 37(1):10-5.
56. Dunckley H, Gatenby PA, Serjeantson SW. DNA typing of HLA-DR antigens in systemic lupus erythematosus. *Immunogenetics* 1986; 24(3):158-62.
57. Vasconcelos C, Carvalho C, Leal B, Pereira C, Bettencourt A, Costa PP, Marinho A, Barbosa P, Almeida I, Farinha F, Mendonça T, Correia JA, Mendonça D, Martins B. HLA in Portuguese systemic lupus erythematosus patients and their relation to clinical features. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1173: 575-80.
58. Hartung K, Baur MP, Coldewey R, Fricke M, Kalden JR, Lakomek HJ, Peter HH, Schendel D, Schneider PM, Seuchter SA, et al. Major histocompatibility complex haplotypes and complement C4 alleles in systemic lupus erythematosus. Results of a multicenter study. *J Clin Invest* 1992; 90(4):1346-51.
59. So AK, Fielder AH, Warner CA, Isenberg DA, Batchelor JR, Walport MJ. DNA polymorphism of major histocompatibility complex class II and class III genes in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1990; 35(3):144-7.
60. Kapitany A, Tarr T, Gyetvai A, Szodoray P, Tumpek J, Poor G, Szegedi G, Sipka S, Kiss E. Human leukocyte antigen-DRB1 and -DQB1

- genotyping in lupus patients with and without antiphospholipid syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1173: 545-51.
61. McHugh NJ, Owen P, Cox B, Dunphy J, Welsh K. MHC class II, tumor necrosis factor alpha, and lymphotoxin alpha gene haplotype associations with serological subsets of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(4):488-94.
 62. Castaño-Rodríguez N, Díaz-Gallo LM, Pineda-Tamayo R, Rojas-Villarraga A, Anaya JM. Meta-analysis of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 polymorphisms in Latin American patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2008; 7 (4): 322-30.
 63. Vargas-Alarcón G, Salgado N, Granados J, Gómez-Casado E, Martínez-Laso J, Alcocer-Varela J. Class II allele and haplotype frequencies in Mexican systemic lupus erythematosus patients: the relevance of considering homologous chromosomes in determining susceptibility. *Hum Immunol* 2001; 62 (8): 814-20.
 64. Goldstein R, Sengar DP. Comparative studies of the major histocompatibility complex in French Canadian and non-French Canadian Caucasians with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1993; 36(8):1121-7.
 65. Kachru RB, Sequeira W, Mittal KK, Siegel ME, Telischi M. A significant increase of HLA-DR3 and DR2 in systemic lupus erythematosus among blacks. *J Rheumatol* 1984; 11(4):471-4.
 66. Shankarkumar U, Ghosh K, Badakere SS, Mohanty D. HLA-DRB1*03 and DQB1*0302 associations in a subset of patients severely affected with systemic lupus erythematosus from western India. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 92-3.
 67. Granados J, Vargas-Alarcón G, Andrade F, Melín-Aldana H, Alcocer-Varela J, Alarcón-Segovia D. The role of HLA-DR alleles and complotypes through the ethnic barrier in systemic lupus erythematosus in Mexicans. *Lupus* 1996;5(3):184-9.

68. Hashimoto H, Nishimura Y, Dong RP, Kimura A, Sasazuki T, Yamanaka K. HLA antigens in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 1994; 23 (4): 191-6.
69. Lee HS, Chung YH, Kim TG, Kim TH, Jun JB, Jung S, Bae SC, Yoo DH. Independent association of HLA-DR and FC gamma receptor polymorphisms in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42(12):1501-7.
70. Hong GH, Kim HY, Takeuchi F, Nakano K, Yamada H, Matsuta K, Han H, Tokunaga K, Ito K, Park KS. Association of complement C4 and HLA-DR alleles with systemic lupus erythematosus in Koreans. *J Rheumatol* 1994; 21(3):442-7.
71. Tian W, Li LX, Guo SS. Correlative study on HLA-DR2 allelic polymorphism and systemic lupus erythematosus in the Han nationality in Hunan province. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2000; 25(1):15-7.
72. Hawkins BR, Wong KL, Wong RW, Chan KH, Dunckley H, Serjeantson SW. Strong association between the major histocompatibility complex and systemic lupus erythematosus in southern Chinese. *J Rheumatol* 1987; 14(6):1128-31.
73. Sirikong M, Tsuchiya N, Chandanayingyong D, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, Luangtrakool K. Association of HLA-DRB1*1502-DQB1*0501 haplotype with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens* 2002; 59 (2): 113-7.
74. Marchini M, Antonioli R, Lleò A, Barili M, Caronni M, Origgi L, Vanoli M, Scorza R. HLA class II antigens associated with lupus nephritis in Italian SLE patients. *Hum Immunol* 2003; 64(4):462-8.
75. Pan CF, Wu CJ, Chen HH, Dang CW, Chang FM, Liu HF, Chu CC, Lin M, Lee YJ. Molecular analysis of HLA-DRB1 allelic associations with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis in Taiwan. *Lupus* 2009; 18(8):698-704.

76. Howard PF, Hochberg MC, Bias WB, Arnett FC Jr, McLean RH. Relationship between C4 null genes, HLA-D region antigens, and genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in Caucasian and black Americans. *Am J Med* 1986; 81(2):187-93.
77. Suggs MJ, Majithia V, Lewis RE, Cruse JM. HLA DRB1*1503 allelic haplotype predominance and associated immunodysregulation in systemic lupus erythematosus. *Exp Mol Pathol* 2011; 91(2):548-62.
78. Tsuchiya N, Kawasaki A, Tsao BP, Komata T, Grossman JM, Tokunaga K. Analysis of the association of HLA-DRB1, TNF alpha promoter and TNFR2 (TNFRSF1B) polymorphisms with SLE using transmission disequilibrium test. *Genes Immun* 2001; 2(6):317-22.
79. Tarassi K, Carthy D, Papasteriades C, Boki K, Nikolopoulou N, Carcassi C, Ollier WE, Hajeer AH. HLA-TNF haplotype heterogeneity in Greek SLE patients. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16(1):66-8.
80. Rudwaleit M, Tikly M, Gibson K, Pile K, Wordsworth P. HLA class II antigens associated with systemic lupus erythematosus in black South Africans. *Ann Rheum Dis* 1995; 54(8):678-80.
81. Cortés LM, Baltazar LM, López-Cardona MG, Olivares N, Ramos C, Salazar M. HLA class II haplotypes in Mexican systemic lupus erythematosus patients. *Hum Immunol* 2004; 65 (12): 1469-76.
82. Ramal LM, López-Nevot MA, Sabio JM, Jáimez L, Paco L, Sánchez J, de Ramón E, Fernández-Nebro A, Ortego N, Ruiz-Cantero A, Rivera F, Martín J, Jiménez-Alonso J; Grupo Lupus Virgen de las Nieves. Systemic lupus erythematosus in southern Spain: a comparative clinical and genetic study between Caucasian and Gypsy patients. *Lupus* 2004; 13(12):934-40.
83. Calvo-Alén J, Reveille JD, Rodríguez-Valverde V, McGwin G Jr, Baethge BA, Friedman AW, Alarcón GS. Clinical, immunogenetic and outcome features of Hispanic systemic lupus erythematosus patients of different ethnic ancestry. *Lupus* 2003; 12(5):377-85.

84. Fronck Z, Timmerman LA, Alper CA, Hahn BH, Kalunian K, Peterlin BM, McDevitt HO. Major histocompatibility complex genes and susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1990; 33(10):1542-53.
85. Furukawa F, Muto M. Ethnic differences in immunogenetic features and photosensitivity of cutaneous lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res* 2009; 301:111-5.
86. Furukawa F, Yamamoto Y, Kanazawa N, Muto M. Race differences in immunogenetic features and photosensitivity of cutaneous lupus erythematosus from the aspect of Japanese studies. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1173: 552-6.
87. López-Tello A, Rodríguez-Carreón AA, Jurado F, Yamamoto-Furusho JK, Castillo-Vázquez M, Chávez-Muñoz. Association of HLA-DRB1*16 with chronic discoid lupus erythematosus in Mexican mestizo patients. *Clin Exp Dermatol* 2007; 32 (4): 435-8.
88. Knop J, Bonsmann G, Kind P, Doxiadis I, Vögeler U, Doxiadis G. Antigens of the major histocompatibility complex in patients with chronic discoid lupus erythematosus. *Br J Dermatol* 1990; 122 (6): 723-8.
89. Fowler JF, Callen JP, Stelzer GT, Cotter PK. Human histocompatibility antigen associations in patients with chronic cutaneous lupus erythematosus. *J Am Acad Dermatol* 1985; 12(1 Pt 1):73-7.
90. Davies EJ, Steers G, Ollier WE, Grennan DM, Cooper RG, Hay EM, Hillarby MC. Relative contributions of HLA-DQA and complement C4A loci in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1995; 34(3):221-5.
91. Azizah MR, Ainoi SS, Kuak SH, Kong NC, Normaznah Y, Rahim MN. The association of the HLA-class II antigens with the clinical and autoantibody expression in Malaysian Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2001; 19 (2): 93-100.

92. Ayed K, Gorgi Y, Ayed-Jendoubi S, Bardi R. The involvement of HLA - DRB1*, DQA1*, DQB1* and complement C4A loci in diagnosing systemic lupus erythematosus among Tunisians. *Ann Saudi Med* 2004; 24(1):31-5.
93. Lu LY, Ding WZ, Fici D, Deulofeut R, Cheng HH, Cheu CC. Molecular analysis of major histocompatibility complex allelic associations with systemic lupus erythematosus in Taiwan. *Arthritis Rheum* 1997; 40 (6): 1138-45.
94. Rezaieyazdi Z, Tavakkol-Afshari J, Esmaili E, Orouji E, Pezeshkpour F, Khodadoost M. Association of HLA-DQB1 allelic sequence variation with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2008; 7 (2): 91-5.
95. Yao Z, Kimura A, Hartung K, Haas PJ, Volgger A, Brännier G, Bönisch J, Albert ED. Polymorphism of the DQA1 promoter region (QAP) and DRB1, QAP, DQA1, DQB1 haplotypes in systemic lupus erythematosus. SLE Study Group members. *Immunogenetics* 1993; 38(6):421-9.
96. Fischer GF, Pickl WF, Faé I, Anegg B, Milota S, Volc-Platzer B. Association between chronic cutaneous lupus erythematosus and HLA class II alleles. *Hum Immunol* 1994; 41(4):280-4.
97. Jönsen A, Bengtsson AA, Sturfelt G, Truedsson L. Analysis of HLA DR, HLA DQ, C4A, Fc gamma RIIa, Fc gamma RIIIa, MBL, and IL-1Ra allelic variants in Caucasian systemic lupus erythematosus patients suggests an effect of the combined Fc gamma RIIa R/R and IL-1Ra 2/2 genotypes on disease susceptibility. *Arthritis Res Ther* 2004; 6(6):R557-62.
98. Bekker-Mendez C, Yamamoto-Furusho JK, Vargas-Alarcón G, Ize-Ludlow D, Alcocer-Varela J, Granados J. Haplotype distribution of class II MHC genes in Mexican patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 1998; 27 (5): 373-6.

99. Graham RR, Ortmann WA, Langefeld CD, Jawaheer D, Selby SA, Rodine PR, Baechler EC, Rohlf KE, Shark KB, Espe KJ, Green LE, Nair RP, Stuart PE, Elder JT, King RA, Moser KL, Gaffney PM, Bugawan TL, Erlich HA, Rich SS, Gregersen PK, Behrens TW. Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 2002; 71(3):543-53.
100. Chung SA, Taylor KE, Graham RR, Nititham J, Lee AT, Ortmann WA, Jacob CO, Alarcón-Riquelme ME, Tsao BP, Harley JB, Gaffney PM, Moser KL; SLEGEN, Petri M, Demirci FY, Kamboh MI, Manzi S, Gregersen PK, Langefeld CD, Behrens TW, Criswell LA. Differential genetic associations for systemic lupus erythematosus based on anti-dsDNA autoantibody production. *PLoS Genet* 2011; 7(3): e1001323.
101. Deligny C, Clyti E, Sainte-Marie D, Couppie P, Huong du LT, Piette JC, Arfi S, Pradinaud R. Incidence of chronic cutaneous lupus erythematosus in French Guiana: a retrospective population-based study. *Arthritis Care Res* 2010; 62(2):279-82.
102. Grönhagen CM, Fored CM, Granath F, Nyberg F. Cutaneous lupus erythematosus and the association with systemic lupus erythematosus: a population-based cohort of 1088 patients in Sweden. *Br J Dermatol* 2011; 164(6):1335-41.
103. Tebbe B, Orfanos CE. Lupus erythematosus of the skin. Analysis of 97 patients. *Z Hautkr* 1987; 62(22):1563-72, 1577-8, 1583-4.
104. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
105. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009:574398.
106. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient

- matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; 39: 225-35.
107. Saiki R. Rapid analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probe. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:6230.
108. Bignon JD, Fernández-Viña M. *HLA et médecine*. En: *Technical Handbook: Twelfth International Histocompatibility Workshop*. Paris, France: Publisher; 1995.
109. Rock KL. A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today* 1996; 17:131-137.
110. Barquera R, Zúñiga J, Hernández-Díaz R, Acuña-Alonzo V, Montoya-Gama K, Moscoso J, et al. HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico. *Mol Immunol* 2008; 45: 1171-8.
111. Schiaffino A, Rodríguez M, Pasarín MI, Regidor E, Borrell C, Fernández E. ¿*Odds ratio* o razón de proporciones? Su utilización en estudios transversales. *Gac Sanit* 2003; 17(1):70-4.
112. Hernández B, Velasco-Mondragón HE. Encuestas transversales. *Salud Pública de México* 2000; 42 (5): 447-55.