



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**POLIMORFISMOS DEL SISTEMA HLA Y RECEPTORES FC-GAMMA
EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
SUSANA MARICELA HERNÁNDEZ DOÑO**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN (INCMNSZ)**

**COMITÉ TUTOR:
DR. JOAQUÍN ZÚÑIGA RAMOS
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN, INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO
VILLEGAS (INER)**

**Dr. GILBERTO VARGAS ALARCÓN
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN, INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ**

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO DE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, especialmente a mi madre, a mis tutores y amigos tanto en México y mi país El Salvador, que me apoyaron durante todo este proceso, en todas las formas posibles. Estoy muy agradecida con Dios y el regalo de todas las personas que contribuyeron a este trabajo directa o indirectamente. No me atrevo a detallar nombre por nombre porque llenaría muchas muchas páginas y el orden sería complicado. Es parte de la riqueza que nos regala la vida: contar con tanta amistad, apoyo y compañía, es algo a lo que no puede ponerse valor, y no hay forma de pagarlo, solo podemos sentirnos afortunados y felices y dar de lo que hemos recibido.

Agradezco a todo el apoyo en México, al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Consejo Nacional de Ciencia e Investigación de México (CONACYT), que creen y apoyan al estudiante extranjero, contribuyendo al desarrollo y bienestar de sus países vecinos.

Contenidos

PRIMERA PARTE: POLIMORFISMOS DEL SISTEMA HLA CLASE I Y CLASE II	6
I. INTRODUCCIÓN	7
II. JUSTIFICACIÓN	9
III. OBJETIVOS	10
3.1. Objetivo General	10
3.2. Objetivos Específicos	10
IV. MARCO TEÓRICO	11
4.1. Lupus eritematoso generalizado	11
4.1.1. Mecanismo inmunopatogénico	11
4.1.2. Factores predisponentes	13
4.2. Complejo principal de histocompatibilidad.....	16
4.2.1. Organización genética de los genes MHC	16
4.2.2. Clasificación y funciones	16
4.2.3. Estructura de la Molécula de MHC humano	19
4.2.4. Correspondencia entre dominios y exones	20
4.3. HLA en LEG	22
V. METODOLOGÍA	23
5.1. Sujetos.....	23
5.2. Tipificación de HLA por Secuenciación Sanger	24
5.2.1. Obtención de ADN genómico.....	24
5.2.2. Amplificación	24
5.2.3. Secuenciación	25
5.2.4. Procesamiento de datos	25
5.3. Tipificación de HLA por secuenciación de última generación	25
5.3.1. Obtención de ADN genómico.....	26
5.3.2. Amplificación	26
5.3.3. Secuenciación	27
5.3.4. Procesamiento de datos	27
5.4. Análisis estadístico y procesamiento de resultados	28
5.4.1. Características clínicas y sociodemográficas.....	28
5.4.2. Alelos HLA clase I y clase II y frecuencias de haplotipos extendidos	28
5.4.3. Cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg	28
5.4.4. Estimación de mestizaje.....	29
5.4.5. Distancias genéticas	30
VI. RESULTADOS	30
6.1. Características clínicas y sociodemográficas	30
6.2. Mestizaje y diversidad genética	32

6.3. Distancias genéticas	34
6.3.1. Distancias de Nei y distancias por pares	34
6.3.2. Fst.....	37
6.3.3. Coeficiente de coancestría.....	39
6.3.4. Fst linealizado de Slatkin	40
6.3.5. Comparación de pacientes y controles a través de análisis de componentes principales	41
6.4. Haplotipos extendidos conservados de susceptibilidad.....	43
VII. DISCUSIÓN	54
VIII. CONCLUSIONES	59
SEGUNDA PARTE: POLIMORFISMOS DE RECEPTORES FC GAMMA	61
I. INTRODUCCIÓN	62
II. OBJETIVOS	63
2.1. Objetivo General	63
2.2. Objetivos Específicos	63
III. MARCO TEÓRICO	64
3.1. Receptores Fc gamma	64
3.1.1. Organización genómica de los genes Fc gamma.....	64
3.1.2. Receptores Fc gamma Clasificación y Funciones	65
3.1.3. Ligandos y afinidad de unión de FcgR	71
3.1.4. Receptores Fc gamma en LEG.....	72
IV. METODOLOGÍA	73
4.1. Sujetos.....	73
4.2. Tipificación de Receptores Fc gamma	74
4.2.1. Variantes de un solo nucleótido en receptor FcyRIIa	74
4.2.2. Variantes de un solo nucleótido en receptor FcyRIIb	75
4.3. Tipificación de Haplotipos Completos	82
4.4. Análisis estadístico y procesamiento de resultados	82
V. RESULTADOS	84
5.1. Variantes de un solo nucleótido en receptor FcyRIIa.....	84
5.2. Variantes de un solo nucleótido en receptor FcyRIIb	87
VI. DISCUSIÓN	91
VII. CONCLUSIONES	93
ANEXOS	95
REFERENCIAS	105

PRÓLOGO

El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune de alta prevalencia en México. Es muy heterogénea con fenotipos que varían en gravedad y manifestaciones clínicas. Actualmente muchos de los pacientes progresan a fenotipos graves de la enfermedad y una frecuencia alta de estos desarrollan nefritis lúpica. La cual es un tipo de glomerulonefritis con depósitos de complejos inmunes e infiltrados celulares que pueden deteriorar la función renal hasta ocasionar enfermedad renal crónica ¹.

El factor económico y acceso a servicios de salud se ha asociado directamente con el desarrollo de cuadros más graves. Sin embargo, se conoce que la susceptibilidad genética a la enfermedad también varía entre las diferentes poblaciones. Esto es totalmente aplicable a la población mexicana, ya que presenta alta heterogeneidad en las proporciones de mestizaje, lo cual podría contribuir al amplio espectro de fenotipos de la enfermedad en México. Esto es posible abordarlo estudiando el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC por siglas en Inglés de *Major Histocompatibility Complex*), ya que debido a su alto polimorfismo se emplea en estudios de ancestría y genética poblacional, pero además la función inmunológica del MHC Clase I y II es pertinente por su asociación a enfermedades autoinmunes como el lupus. Por lo que el MHC contribuirá a conocer las diferencias en el mestizaje de los individuos con lupus.

Por otro lado, sabiendo que el trasfondo genético poblacional contribuye a variación fenotípica de la enfermedad, es necesario sumar factores que permitan distinguir a los individuos que progresarán a cuadros como la nefritis lúpica para contribuir a la toma ágil de decisiones médicas e intervención oportuna.

Por lo cual este trabajo se divide en dos partes, la primera describe el estudio del MHC para conocer las diferencias en el mestizaje de individuos con LEG y sanos (controles). Y una segunda parte donde se describen las variantes de los receptores Fc gamma y su contribución a la discriminación del fenotipo renal y no renal en individuos con LEG.

PRIMERA PARTE: POLIMORFISMOS DEL SISTEMA HLA CLASE I Y CLASE II

I. INTRODUCCIÓN

El lupus eritematoso generalizado es una enfermedad autoinmune crónica caracterizada por la pérdida de tolerancia a los autoantígenos. Las manifestaciones del LEG son diversas. La enfermedad puede afectar a casi cualquier órgano del cuerpo². Los pacientes con ascendencia hispana, africana y asiática desarrollan LEG antes que las poblaciones europeas. Estos pacientes también tienen un inicio más agudo de la enfermedad, manifestaciones clínicas más graves, mayor actividad de la enfermedad, daño orgánico crónico y mayor mortalidad³. La prevalencia de LEG en Hispanos es ~ 138/100000 por habitantes por año, que es más alta que en las poblaciones asiáticas y europeas^{4,5}. Muchas diferencias en la presentación de la enfermedad a través de la barrera étnica se han explicado a través de la predisposición genética. Uno de los sistemas más estudiados son los genes del MHC de clase I y clase II, conocido como Antígeno Leucocitario Humano (HLA, por siglas en inglés de *Human Leukocyte Antigen*) de clase I y II. La variabilidad de HLA entre poblaciones es útil para explicar muchas características del LEG⁶, y continúa brindando más información sobre la predisposición genética y el mecanismo fisiopatológico de la enfermedad.

En estudios previos se ha demostrado que los haplotipos HLA confieren susceptibilidad o protección étnico-dependiente⁷⁻¹¹. En México, la susceptibilidad varía a medida que lo hace el mestizaje, el cual es muy heterogéneo en todo el país, lo que contribuye a la variabilidad de la enfermedad^{12,13}. Por tanto, la diversidad del mestizaje ha contribuido al enriquecimiento de marcadores de susceptibilidad y un amplio espectro de fenotipos de LEG en mexicanos¹⁴. Por ejemplo, el alelo de susceptibilidad más común, HLA-DRB1*03:01, identificado previamente en la Ciudad de México, no se encontró como factor de susceptibilidad en pacientes con LEG de Tapachula, Chiapas. Por el contrario, los pacientes con HLA-DR2 en Chiapas mostraron un mayor riesgo de desarrollar LEG una vez infectados con los virus Zika o Chikungunya, comunes en esa región, pero ausentes en la Ciudad de México¹⁵. Además, los estudios de genética poblacional revelaron estimaciones de mestizaje significativamente diferentes para la Ciudad de México y Tapachula, Chiapas^{16,17}. Lo que respalda la importancia del mestizaje en enfermedades con trasfondo genético.

Los haplotipos extendidos conservados (CEH, por siglas en inglés de *Conserved Extended Haplotypes*) de HLA han contribuido a las mediciones de la genética del MHC en condiciones autoinmunes. Estos bloques de ADN se definen como combinaciones de variantes de HLA-B, -DR, genes del sistema del complemento y otros genes relacionados con la inmunidad. Los CEH se conocen como tramos de ADN con alelos fijos, incluidos aquellos en loci no probados¹⁸. Por lo tanto, los CEH tienen una carga genética alta, por lo que la determinación de HLA CEH proporciona información sobre el riesgo agregado que confieren los genes no clásicos y no HLA vinculados a HLA. La frecuencia y la combinación de alelos de los CEH varía entre los principales grupos étnicos. De ahí que la determinación de CEH y la huella de mestizaje permita conocer variantes inmunogenéticas y bloques de origen y evolución antropológicos, pero de importancia biomédica en pacientes mestizos mexicanos.

Por lo tanto, este estudio tiene como objeto describir las proporciones de mestizaje de pacientes con LEG en comparación con individuos mestizos mexicanos sanos. Además de describir la distribución de bloques HLA clase I y clase II y CEH y sus orígenes ancestrales más probables utilizando tipificación de HLA de alta resolución en un grupo de pacientes mexicanos con LEG de ascendencia mestiza.

II. JUSTIFICACIÓN

Actualmente cerca de 5 millones de personas padecen lupus alrededor del Mundo. El LEG por ser una enfermedad multisistémica transcurre en más de la mitad de los casos afectando un órgano principal como el corazón, riñones, pulmones e incluso sistema nervioso central. El 20% de los pacientes tiene un pariente que también padece lupus o es susceptible de padecerlo¹⁹.

Aunque actualmente no existe cura para el LEG, la supervivencia y la esperanza de vida han aumentado en las últimas décadas como resultado de mejoras en el diagnóstico y el tratamiento. Sin embargo, el LEG puede causar daños considerables a los órganos, lo que puede conducir a una alta morbilidad y mortalidad. Como tal, los costos directos de la enfermedad pueden ser considerables hasta USD\$ 71334.00 por paciente por año, según estadísticas en Estados Unidos y se incrementan en condiciones como la nefritis lúpica, recaídas y alta actividad de la enfermedad. Más importante, la reducción en la calidad de vida, incluida la salud física y mental, la vitalidad, el dolor y el funcionamiento social y emocional y a pesar de los avances realizados en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, actualmente se presentan del 10 al 15% de muertes prematuras¹⁹.

Con todo lo anterior deben buscarse alternativas cuyo alcance se dirija a la mejora de la calidad de vida del paciente mediante un diagnóstico certero y efectivo, de manera que el abordaje sea el mejor para el paciente. Por lo que la búsqueda y definición de marcadores genéticos ha tomado prevalencia en los últimos años. Sin embargo, muchos de estos marcadores pierden utilidad de una población a otra, por lo que el estudio de marcadores en poblaciones específicas está justificado en poblaciones con una ancestría tan enriquecida como la de los mestizos mexicanos.

Entre los marcadores con más influencia en enfermedades autoinmunes, están los genes del Antígeno Leucocitario Humano (HLA, del inglés human leukocyte antigen) de clase I (A, B, C), clase II (DR, DP, DQ). Los cuales aportan información no solo de la susceptibilidad y protección de sus variantes, sino también del origen étnico de dichas variantes.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Determinar las proporciones de mestizaje en pacientes con lupus eritematoso generalizado y controles sanos mestizos mexicanos usando tipificación de alta resolución de HLA-Clase I y II.

3.2. Objetivos Específicos

1. Secuenciar alelos HLA clase I (A, C, B) y clase II (DRB1, DQB1) por secuenciación de siguiente generación en pacientes con LEG y controles.
2. Determinar las proporciones de mestizaje con base a poblaciones parentales amerindias mexicanas, europeas, africanas y asiáticas tanto en pacientes con LEG como en controles.
3. Calcular las distancias genéticas entre pacientes con LEG, controles y poblaciones parentales.
4. Identificar alelos y haplotipos HLA de susceptibilidad o protección en pacientes con LEG.
5. Identificar el origen étnico de los alelos y haplotipos de susceptibilidad o protección encontrados en pacientes con LEG.

IV. MARCO TEÓRICO

Hasta el momento se ha fundamentado la influencia genética en la susceptibilidad, desarrollo y gravedad del LEG. La enfermedad tiene una inmunopatogenia compleja que varía en cada individuo. Por lo que se abordan las características generales de la enfermedad para entender las bases inmunológicas y genéticas que en parte explican la patología y se detalla así también el sistema del HLA en el cromosoma 6, como el sistema más polimórfico en el genoma humano relacionado con el reconocimiento antigénico y por lo tanto es uno de los sistemas cuyas variaciones están fuertemente relacionadas con la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes. Finalmente, en esta sección se abordarán los antecedentes que han relacionado los polimorfismos del HLA con el LEG.

4.1. Lupus eritematoso generalizado

4.1.1. Mecanismo inmunopatogénico

El LEG es una enfermedad caracterizada por daño tisular, secundario a la producción de autoanticuerpos y el consecuente depósito de complejos inmunitarios. Se caracteriza por un proceso inflamatorio crónico y daño en diferentes órganos y sistemas debido, principalmente, al depósito de complejos inmunitarios y activación del sistema de complemento. Sin embargo, se han identificado una gran variedad de mecanismos de regulación de la respuesta inmunológica que son defectuosos en los individuos con LEG.

El mecanismo fisiopatogénico es heterogéneo, aunque se reconoce un factor de susceptibilidad genética; se han identificado una gran cantidad de genes involucrados; los estudios de mapeo genómico completo realizados en distintos grupos étnicos concuerdan en un papel directo de los genes del MHC, principalmente el locus para el HLA-DR, y cuya disfunción altera vías inmunitarias relacionadas con el sistema inmune adaptativo. El MHC está conformado por los genes del sistema HLA (Clases I y II), los genes del complemento (Factor B, C2, C4A y C4B) y los del factor de necrosis

Tumoral (TNF, siglas en inglés de *Tumor Necrosis Factor*), cuyas alteraciones incluyen anomalías en la respuesta inmunitaria, detonadas por factores ambientales y epigenéticos que contribuyen a la heterogeneidad de la expresión clínica del LEG como se observa en la [Figura 1](#). Los estudios genómicos diferentes del MHC demuestran que variantes de *PXK*, *ITGAM*, *KIAA1542*, *TNFAIP3*, *FAM167A-BLK*, *BANK1* contribuyen a la predisposición genética al LEG mediante un efecto epistático con los genes del MHC codificados en el brazo corto del cromosoma 6 humano^{20,21}.

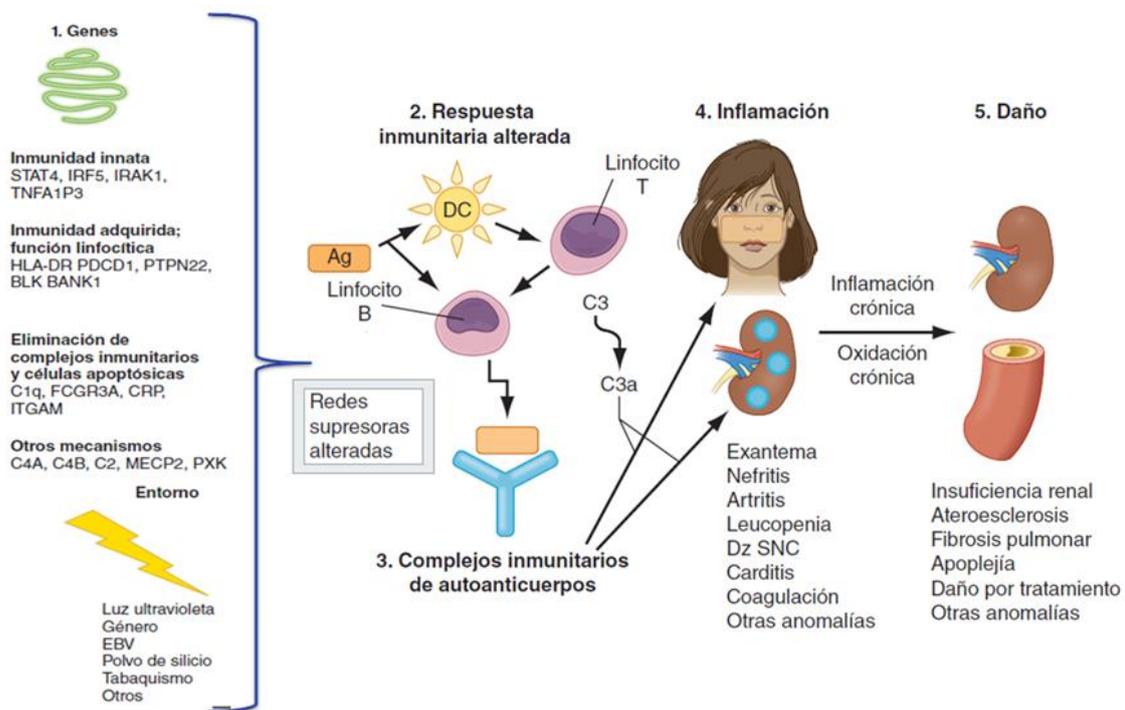


Figura 1. Patogénesis del lupus eritematoso generalizado. Tomado de: *Harrison. Principios de Medicina Interna. 19th edición, 2016*

Algunas de las vías inmunológicas afectadas en el LEG se resumen como sigue:

- Eliminación de complejos inmunitarios y células apoptóticas: Se presenta fagocitosis defectuosa, transporte por receptores del complemento y unión a receptores Fcγ. Puede ser debido a defectos en macrófagos, niveles bajos de receptores CR1 o receptores que permanezcan ocupados por algún mecanismo, FcγRs que están ocupados o poseen una alteración genética que provoca una baja unión a la inmunoglobulina G de los complejos inmunitarios. Los primeros componentes de las vías del complemento, como la lectina de unión a manosa (MBL, por siglas en inglés de *mannose-*

binding lectin) también participan en la solubilización y el transporte de inmunocomplejos, estos pueden faltar o estar defectuosos.

- Redes idiotípicas defectuosas: Esto debido a la baja producción de anticuerpos anti-idiotipo, la regulación defectuosa de linfocitos T cooperadores por linfocitos T reguladores que reconocen los idiotipos en sus receptores de linfocitos T (TCRs, por sus siglas en inglés *T-cell receptors*).
- Producción inadecuada y/o función alterada de linfocitos T reguladores que eliminan o suprimen linfocitos B autorreactivos, linfocitos T cooperadores y otras células efectoras. Esto incluye linfocitos citotóxicos T CD8+ que eliminan a linfocitos T CD4+ CD25+ Foxp3+ autorreactivos que regulan normalmente tanto a linfocitos T cooperadores como a linfocitos B autorreactivos. Posiblemente defectos en la función de células asesinas naturales (NK, por siglas en inglés *natural killer*).
- Baja producción de interleucina-2 (IL-2) por linfocitos T. La supervivencia de linfocitos T reguladores requiere IL-2, y los linfocitos T efectoras en el LEG producen cantidades disminuidas de ésta. Por otra parte, la disminución de la IL-2 y por lo tanto la captura insuficiente de la misma por los linfocitos activados induce su apoptosis.

Defectos en la apoptosis que permiten la supervivencia de linfocitos T efectoras y de linfocitos B autorreactivos, usualmente determinados genéticamente. Tal complejidad en los mecanismos inmunopatogénicos dificultó por mucho tiempo el diagnóstico y clasificación de la enfermedad, por lo que para el diagnóstico preciso de la enfermedad se requiere el cumplimiento de criterios específicos revisados recientemente por el Colegio Americano de Reumatología²². [Anexo 1](#) (Págs. 96-99)

4.1.2. Factores predisponentes

- *Susceptibilidad genética*: compleja participación de múltiples genes.

Genes humanos con polimorfismos que aumentan la susceptibilidad a LEG. Los genes presentes en las redes celulares conocidas por activar el LEG. En la [Figura 2](#) (pág. 14) en el panel A se muestran los

genes que afectan la apoptosis celular y los genes que influyen en la depuración de las células apoptóticas y de complejos inmunitarios. En el panel B muestra genes que influyen en la respuesta de las células dendríticas plasmocitoides (pDCs, por siglas en inglés de *plasmacytoid dendritic cells*) a la unión de los Receptores tipo toll (TLRs, por siglas en inglés de *toll-Like receptors*) superficiales y endosómicos mediante señales externas de peligro y por ARN y ADN en agentes infecciosos y en complejos inmunitarios con el consiguiente aumento de interferon α (IFN- α). El panel C muestra genes que influyen en la respuesta de linfocitos T, B y células plasmáticas. Se muestra la activación por células dendríticas (y otras células presentadoras de antígenos) con producción final de autoanticuerpos y los complejos inmunitarios que forman con antígenos propios.

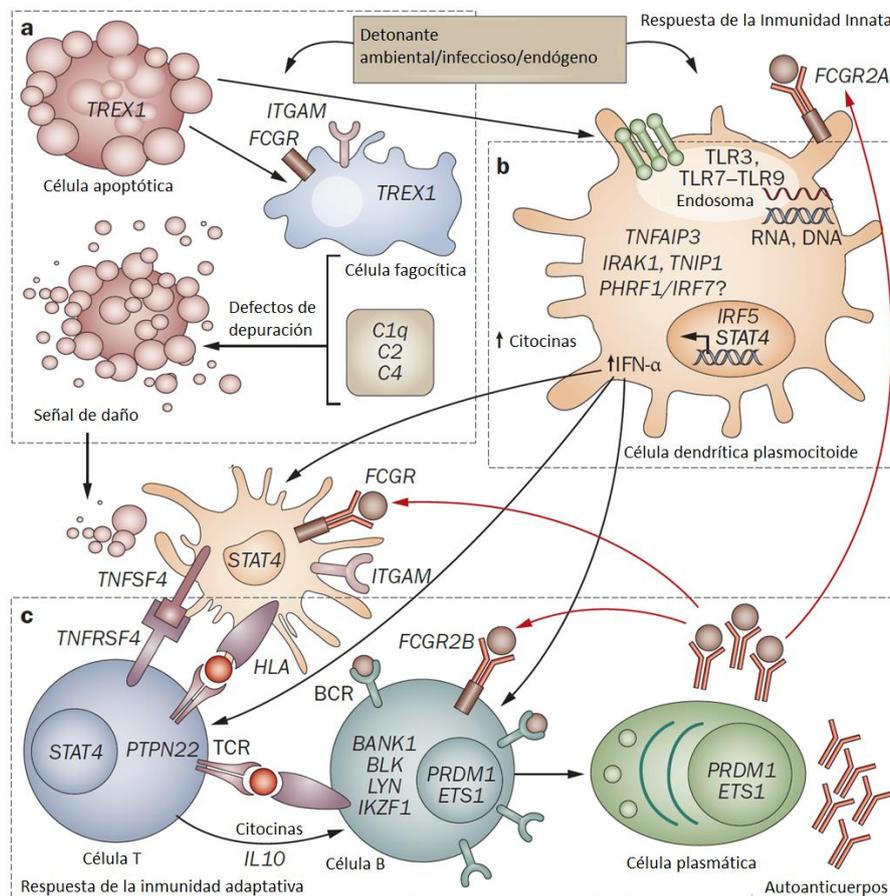


Figura 2. Genes implicados en la inmunopatología del lupus eritematoso generalizado. Tomado de: Deng Y, Tsao BP. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol.* 2010 Dec;6(12):683-92. doi: 10.1038/nrrheum.2010.176.

- Género; el género femenino es más susceptible en comparación con los hombres, en una relación

9:1²⁰.

- Diferencias étnicas; estudios comprueban que las personas con origen afroamericano son las más susceptibles, mientras le siguen en orden hispanos, asiáticos y europeos²⁰.
- *Factores medioambientales*; la exposición a contaminantes, exposición a rayos UV, dieta, infecciones, estrés. Los factores ambientales que predisponen al LEG son indudablemente importantes, aunque pocos se han identificado de manera definitiva. La luz ultravioleta (UVB en particular) exacerba la enfermedad, y en algunos, la aparición clínica de la enfermedad está precedida por una exposición inusualmente extendida en tiempo o intensidad. Los mecanismos incluyen la alteración de la estructura del ADN en la dermis para hacerla más inmunogénica (es decir, la formación de neoantígenos) y la inducción de apoptosis en queratinocitos y otras células dérmicas, presentando mayores cantidades de autoantígenos al sistema inmunitario²⁰.
- *Las infecciones* han sido sospechosas durante mucho tiempo como inductores y potenciadores del LEG. Varios trabajos han relacionado la infección del virus de Epstein-Barr (EBV, por siglas en inglés de *Epstein-Barr Virus*) con LEG. La infección por EBV activa los linfocitos B, lo que podría provocar que una persona genéticamente predispuesta produzca grandes cantidades de autoanticuerpos, lo que supone un abrumador mecanismo regulador. La EBNA-1 molécula de EBV tiene mimetismo molecular con una secuencia en la partícula Ro; la inmunización con esa secuencia puede inducir múltiples autoanticuerpos y generar un fenotipo similar a la enfermedad en animales de experimentación²⁰.
- *Exposición a sustancias químicas*. La evidencia ha implicado ahora la exposición al polvo de sílice como predisponente al LEG, especialmente en las mujeres afroamericanas. La exposición puede ocurrir en entornos agrícolas o industriales. Muchas toxinas potenciales en el medio ambiente pueden iniciar e influir en respuestas inmunitarias e inflamatorias, solventes orgánicos, contaminantes ambientales, asbesto entre otros forman parte de los posibles detonantes de la enfermedad²⁰.

4.2. Complejo principal de histocompatibilidad

4.2.1. Organización genética de los genes MHC

Los genes del MHC se encuentran ubicados en el brazo corto del cromosoma 6, banda 21.1-21.3, y posee alrededor de 4.5Mb. [Figura 3](#).

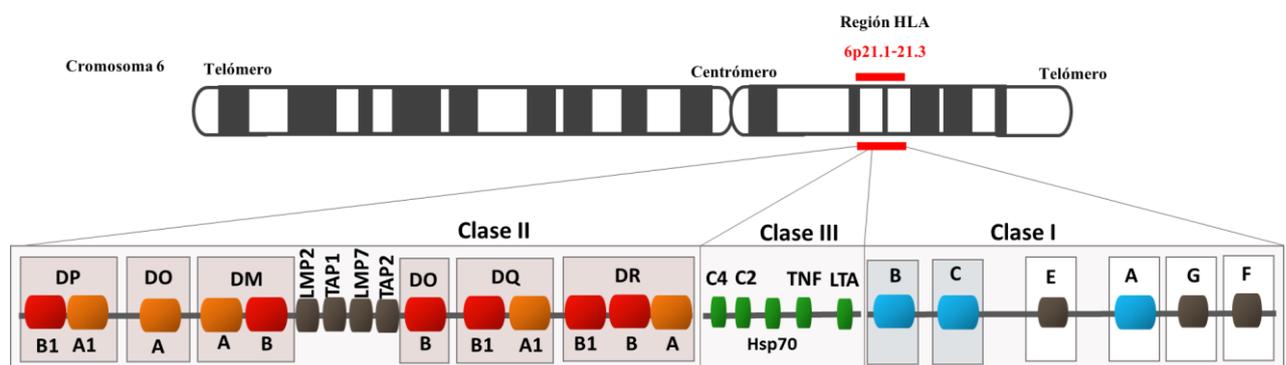


Figura 3. Ubicación del complejo principal de histocompatibilidad. Modificado de: Zakharova MY, et al. The Contribution of Major Histocompatibility Complex Class II Genes to an Association with Autoimmune Diseases. *Acta Naturae*. 2019;11(4):4-12.²³

4.2.2. Clasificación y funciones

El MHC es un sistema de genes, cuya existencia y función se ha conservado durante la evolución, lo que denota su importante papel. Se caracteriza por ser altamente polimórfico y poligénico y su patrón de herencia es mendeliano. El MHC codifica para proteínas asociadas con la inmunidad adquirida y participa directa o indirectamente en el procesamiento de péptidos y en la presentación antigénica. Este sistema es estrictamente regulado a nivel genético y sus componentes principales son las moléculas HLA de clase I y clase II, las cuales participan en la presentación de péptidos tanto intracelulares como extracelulares, respectivamente. Las moléculas HLA de clase I se expresan en la superficie celular de todas las células nucleadas humanas y presentan péptidos a los linfocitos T CD8+, mientras que las moléculas HLA clase II se encuentran expresadas constitutivamente en las células presentadoras de antígenos, aunque puedan ser inducidas en otros tipos de células, y su función primordial es la presentación de péptidos a los linfocitos T CD4+. La presentación antigénica por parte

de las moléculas es llevada a cabo por varias vías, denominadas vía endógena, vía exógena y presentación cruzada^{24,25}.

Las regiones clase I y clase II codifican los genes HLA clásicos (HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ y -DP) **Figura 4**, los cuales están implicados en la presentación de antígenos a los linfocitos T y la compatibilidad de trasplante. Debido a que estas moléculas conforman parte del repertorio inmunitario más importante de un individuo, se cree que el polimorfismo extremo ha evolucionado en respuesta a patógenos infecciosos. Tal vez esa es la razón por la que el MHC se asocia con más enfermedades que cualquier otra región del genoma humano y está vinculado a la mayoría, sino a todos, los trastornos autoinmunes. La región de clase III se encuentra entre las regiones de clase I y clase II y es la región más gen-densa en el genoma, codificando una variedad de moléculas incluyendo los componentes tempranos del complemento como C2, C4 y factor B, citocinas, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y linfotóxina- α , el grupo de proteínas de choque térmico y proteínas implicadas en el crecimiento y desarrollo.

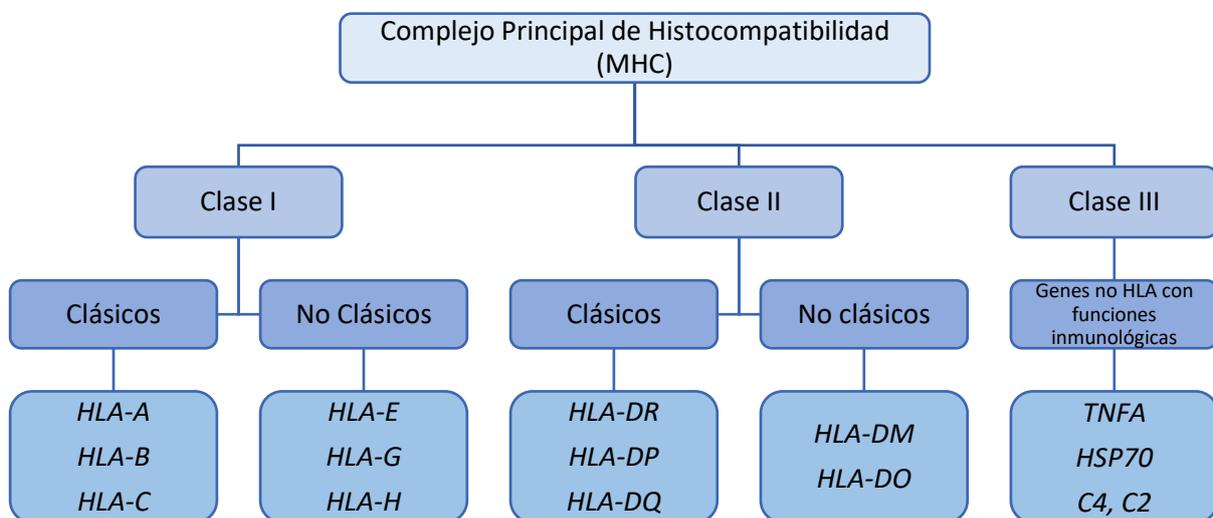


Figura 4. Complejo Principal de Histocompatibilidad. Genes clásicos, no clásicos y genes no HLA.

Los genes MHC clase I

Se encargan principalmente de la presentación de péptidos intracelulares, incluyendo péptidos endógenos provenientes de células en apoptosis, organelos defectuosos o aquellos foráneos provenientes de virus [Figura 5](#). La respuesta es citotoxicidad frente a la célula infectada, esto debido a que todas las células nucleadas pueden expresar MHC I y la presentación antigénica en este caso se hace frente a linfocitos T CD8+^{25,26}.

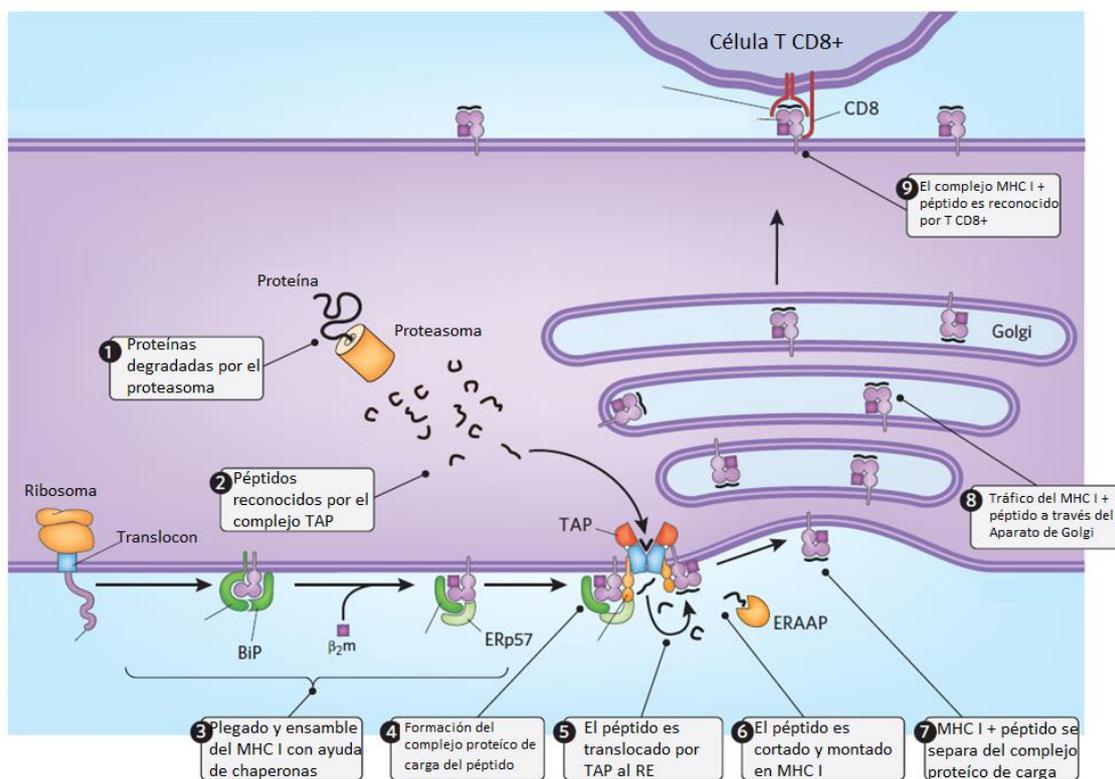


Figura 5. Mecanismo de presentación antigénica por moléculas del MHC de clase I. Tomado de²⁶: Parcej D, Tampé R. ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition. Nat Chem Biol. 2010;6(8):572-80.

Los genes MHC clase II

Se encargan principalmente de la presentación de péptidos procedentes de bacterias y antígenos extracelulares. Las células capaces de expresar MHC de tipo II son las células presentadoras de antígenos profesionales que incluyen células dendríticas y macrófagos. La respuesta en este caso es la activación de linfocitos T cooperadores CD4+ a través de la presentación antigénica por vía exógena^{25,27}. [Figura 6](#) (Pág 19).

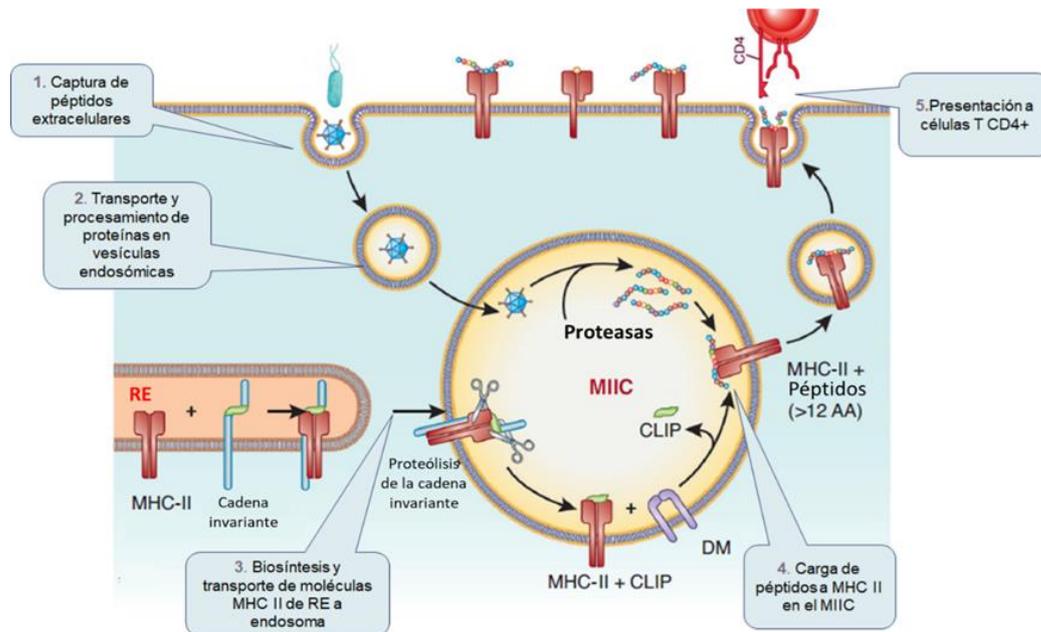


Figura 6. Mecanismo de presentación antigénica por el MHC de clase II. Modificado de²⁷: Neefjes J, Ovaa H. A peptide's perspective on antigen presentation to the immune system. *Nat Chem Biol.* 2013;9(12):769-75.

4.2.3. Estructura de la Molécula de MHC humano

Cada molécula MHC está conformada por una porción extracelular que corresponde a la cavidad de unión de péptidos, seguida de un par de dominios de tipo inmunoglobulina, anclados a la membrana celular y un dominio intracitoplasmático. Las moléculas HLA clase I están conformadas por una cadena α polipeptídica de 47 kDa codificada por un gen α perteneciente al MHC, la cual se une de forma no covalente a una cadena liviana de 12 kDa denominada β 2-microglobulina, la cual se codifica por un gen presente en el cromosoma 15 en humanos. Cada cadena α está conformada por un fragmento hidrofóbico (C-terminal) expandido al interior de la membrana celular, mientras que el otro extremo N-terminal conforma los dominios α 1 y α 2 que constituyen la fosa de anclaje para los péptidos, cada uno con una extensión aproximada de 90 residuos de aminoácidos; esta fosa está cerrada en su base por hélices tipo β , que aseguran que los péptidos encajen completamente en su porción media, mientras que los extremos del péptido quedan libres. Igualmente, la cadena α posee un tercer dominio denominado α 3, el cual tiene características de tipo inmunoglobulina y participa en el contacto entre las moléculas de clase I y el CD8 presente en el linfocito T; este dominio se extiende aproximadamente de 25 residuos de aminoácidos, conformando la porción hidrofóbica de la cadena, la cual atraviesa la bicapa lipídica de la membrana plasmática y es seguida por cerca de 30 residuos de aminoácidos más

que se ubican en el citoplasma, sirviéndole de anclaje a la molécula. Los residuos polimórficos de las moléculas de clase I están limitados al dominio $\alpha 1$ y $\alpha 2$, en respuesta a la variedad de péptidos que deben ser presentados por estas moléculas.

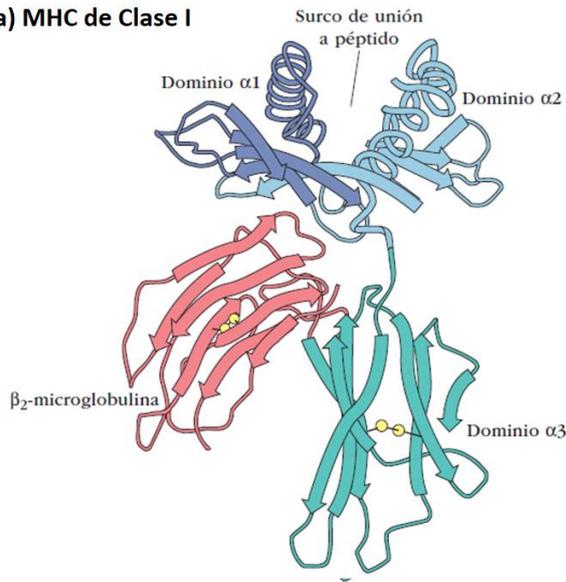
Las moléculas HLA clase II están compuestas de dos cadenas polipeptídicas, asociadas de manera no covalente, denominadas cadena α pesada, de 34 kDa y una cadena β o liviana con un peso aproximado de 29 KDa. Ambas cadenas son codificadas en el MHC y cada una de ellas posee dos dominios, denominados $\alpha 1$ y $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$. Los extremos N-terminal de las cadenas α y β , con sus dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ interactúan para formar la fosa de anclaje a péptidos, la cual es estructuralmente similar a la de las moléculas clase I, con la diferencia de que la fosa de clase II es abierta en su porción central, lo que le permite unir péptidos de mayor tamaño y pueden anclarse tanto al interior del péptido como en los extremos. Los residuos polimórficos de las moléculas clase II están localizados en los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$, sobre todo en la cadena β ^{24,28}. [Figura 7](#) (Pág 21).

4.2.4. Correspondencia entre dominios y exones

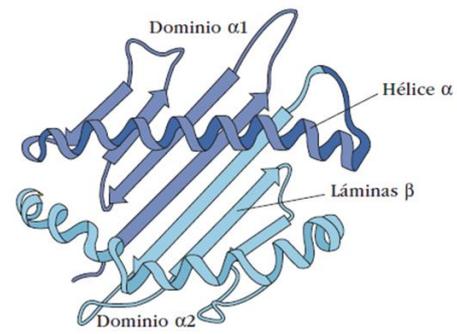
En la molécula de MHC clase I los exones 2 y 3 corresponden a las áreas codificantes para las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$, dominios que interactúan para formar la fosa de anclaje a péptidos, por lo que parte importante de la metodología es tipificar los alelos que representan las variaciones nucleotídicas presentes en estas regiones, ya que son las que generan una alteración de afinidad en la unión con el péptido para HLA A, B y C.

En la molécula de MHC Clase II el exón 2 corresponde a las áreas codificantes para las cadenas $\alpha 1$ y $\beta 1$, dominios que interactúan para formar la fosa de anclaje a péptidos, por lo que parte importante de la metodología es tipificar los alelos que representan las variaciones nucleotídicas presentes en esta región, ya que en esta se generan una alteración de afinidad en la unión con el péptido para HLA DQ, DR y DP. [Figura 8](#) (Pág 22).

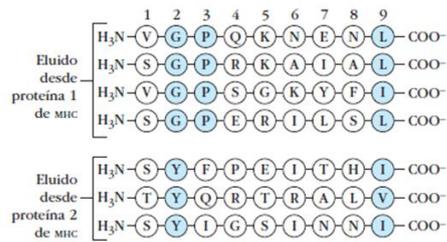
a) MHC de Clase I



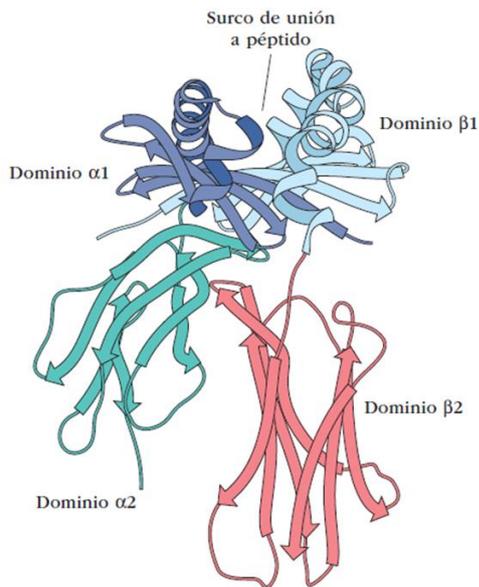
b) Surco de unión al péptido



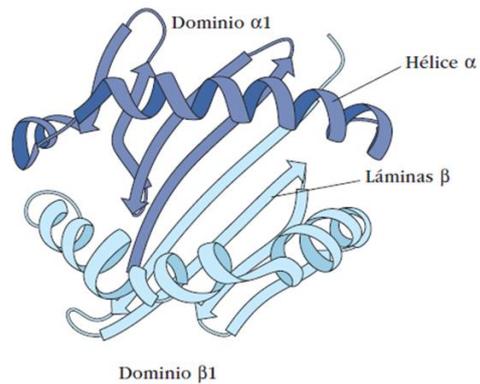
c) Sitios de interacción con el péptido



d) MHC de Clase II



e) Surco de unión al péptido



f) Sitios de interacción con el péptido

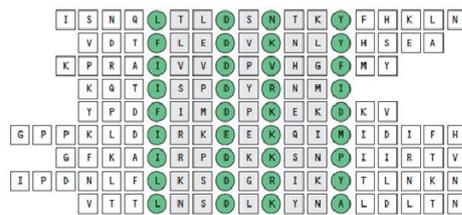


Figura 7. Estructura del MHC de clase I y II. Modificado de^{24,28}:Murphy, Kenneth;Weaver, Casey. Janeway's Immunobiology, 2017, Garland Science, Taylor & Francis Group, Ninth edition. ISBN: 978-0-8153-4505-3. Punt J, Stranford SA, Jones PP, Owen JA. Kuby Immunology. Eighth edition ed. New York : Macmillan Education; 2019.

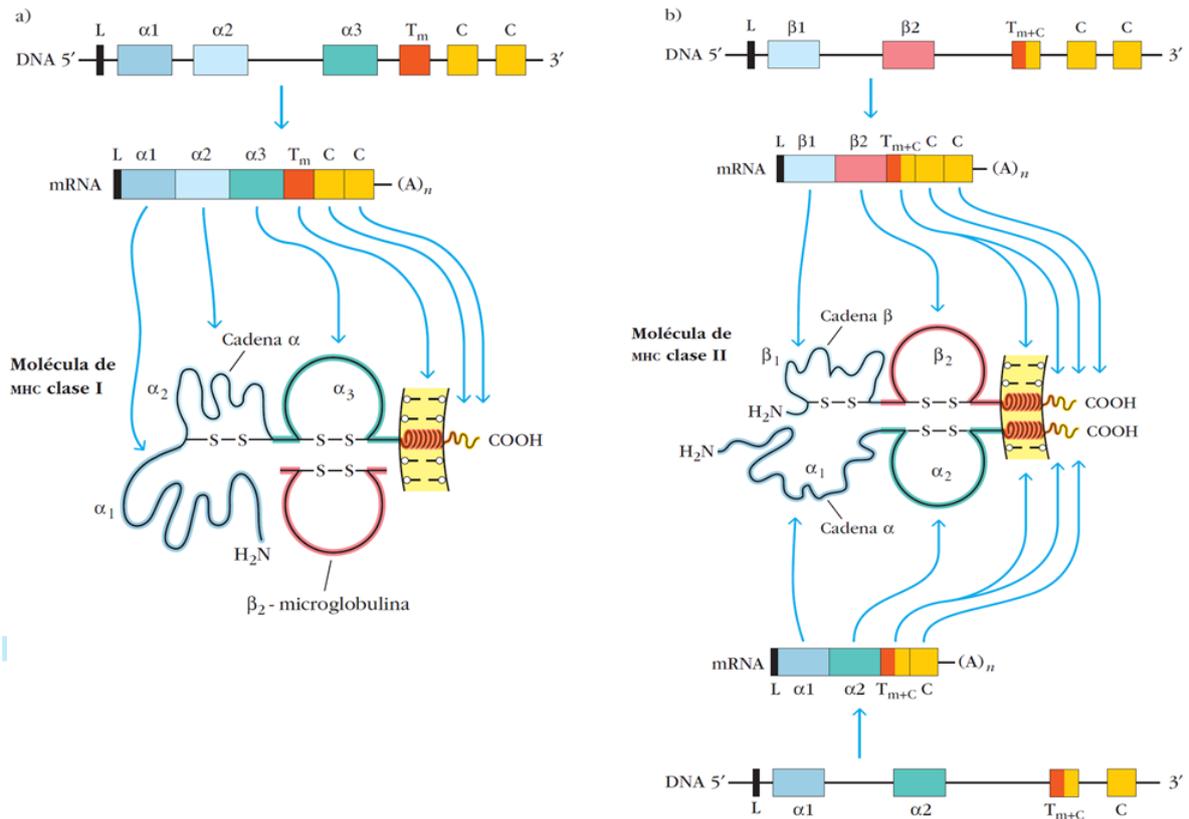


Figura 8. MHC estructura y correspondencia entre dominios y exones. Tomado de^{29,30}: Lefranc MP, Duprat E, Kaas Q, Tranne M, Thiriot A, Lefranc G. IMGT unique numbering for MHC groove G-DOMAIN and MHC superfamily (MhcSF) G-LIKE-DOMAIN. *Dev Comp Immunol.* 2005;29(11):917-38. doi:10.1016/j.dci.2005.03.003

4.3. HLA en LEG

Estudios anteriores han determinado la participación de los genes del sistema de HLA en la patología del LEG. Tanto en población mexicana como en otras poblaciones^{10,31-36}. Se han encontrado diversas asociaciones con el desarrollo de la enfermedad, sin embargo, varían de acuerdo con las poblaciones. En México se han asociado los alelos HLA-DRB1*03, -DRB1*15 con el desarrollo de LEG, mientras que HLA-DRB1*07 ha sido asociado con el Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos secundario a LEG^{10,37}. Estudios más amplios han asociado a la enfermedad haplotipos que incluyen loci de clase II como HLA-DR3~DQA1*05:01~DQB1*02:01 y HLA-DR1~DQA1*01:01~DQB1*05:01³⁸. En otras poblaciones también se han comprobado como alelos de susceptibilidad tanto al HLA-DR3 como al HLA-DR15^{33,39}.

V. METODOLOGÍA

5.1. Sujetos

Se reclutaron 146 pacientes consecutivos diagnosticados con LEG entre 2015 y 2019 de la Clínica Ambulatoria de Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) en la Ciudad de México. Los pacientes diagnosticados con LEG elegibles incluyeron a los nacidos en México, cuyos padres y abuelos también nacieron en México. Específicamente, los que nacieron en la Ciudad de México. A los pacientes se les explicó todo lo referente a su participación en el Consentimiento Informado revisado y autorizado por el Instituto. [Anexo 1](#) (Págs. 96-99).

El diagnóstico y la clasificación de los pacientes se basó tanto en las manifestaciones clínicas, las pruebas de laboratorio como en los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR por siglas en Inglés de *American College of Rheumatology*)²² [Anexo 2](#) (Pág. 100). Se evaluó el Índice de Actividad LEG (SLEDAI por siglas en Inglés de *Systemic lupus Erythematosus Disease Activity Index*)^{40,41}. [Anexo 3](#) (Pág. 101).

El servicio de trabajo social verificó el estrato socioeconómico de los pacientes mediante un instrumento validado aplicado a todas las instituciones pertenecientes a la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales y Hospitales Regionales de Alta Especialidad (CCIHSHAE). Este instrumento tiene siete niveles de clasificación (1-7) y uno exento de pago (Cero). Las variables con valor numérico para asignar el nivel socioeconómico son: el ingreso familiar mensual, la ocupación del principal proveedor económico, los gastos familiares mensuales, la vivienda y el estado de salud de la familia. La suma de estas variables es un número que determina uno de los rangos ya establecidos de 1 a 7. La distribución de los estratos fue aproximadamente el 50% entre 1 a 3, y el otro 50% entre 4 a 6. Esta verificación fue realizada para coincidir las condiciones socioeconómicas de los pacientes y los controles. Como grupo de control, incluimos 234 individuos mestizos mexicanos sanos no relacionados. Los criterios de inclusión de este grupo fueron diseñados para cumplir con las características de un grupo control de

la Ciudad de México. El lugar de nacimiento, nivel socioeconómico y características sociodemográficas fueron corroboradas y registradas. [Anexo 4](#) (Pág. 102).

5.2. Tipificación de HLA por Secuenciación Sanger

Con el objetivo de obtener alta resolución, las tipificaciones se realizaron por secuenciación, para conocer a detalle de cuatro dígitos como mínimo se empleó secuenciación capilar.

5.2.1. Obtención de ADN genómico

El ADN genómico se obtuvo de sangre total utilizando el mini kit de ADN QIAamp (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos). La calidad del ADN se evaluó utilizando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, MA, Estados Unidos) y Qubit Fluorometric Quantification (Invitrogen). La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

5.2.2. Amplificación

La tipificación de HLA se realizó mediante un método basado en secuencia (SBM por siglas en Inglés de *Sequence Based Typing*) como se ha descrito en estudios previos⁴².

La tipificación de HLA de clase I se realizó mediante amplificación de los exones 2, 3 y 4 de cada gen. Para HLA de clase II, los exones 2 y 3 de los genes HLA-DRB1 y -DQB1 se amplificaron utilizando pares de iniciadores específicos.

Para la amplificación de los productos de reacción se empleó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por siglas en inglés de *polymerase chain reaction*). Los reactivos utilizados se detallan como sigue: KCl 1,5 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), dNTP 200 mM, 10 pM de cada cebador, 30 ng de ADN y 0,5 U de Taq ADN polimerasa, la reacción se preparó para un volumen final de 25 µl.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador PE9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Las condiciones se detallan como sigue para cada ciclo: 95°C durante 30s, 65°C durante 30s, 72°C durante 1 min, precedido por 5 min a 95°C y seguido de un paso de alargamiento final a 72°C durante 5 min.

5.2.3. Secuenciación

Los productos amplificados se secuenciaron de forma independiente en ambas direcciones utilizando el kit de secuenciación de ciclos BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems™) en el analizador genético ABI PRISM® 3730xl (Applied Biosystems). Los productos de secuenciación se purificaron con el kit de purificación BigDye XTerminator® (Applied Biosystems™) para eliminar las sales y los terminadores BigDye® no incorporados.

5.2.4. Procesamiento de datos

Los datos se analizaron con un software de asignación de alelos coincidentes (Applied Biosystems) mediante la herramienta de alineación de la base de datos de secuencias de IMGT/HLA <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/align.html>⁴³. Resolvimos ambigüedades utilizando cebadores de secuenciación específicos de grupo (GSSP, por siglas en inglés de *Group Specific Sequencing Primers*) que han sido previamente validados⁴⁴.

5.3. Tipificación de HLA por secuenciación de última generación

Este tipo de secuenciación se realizó para confirmar la tipificación a nivel de alelo HLA. Se utilizó el panel de secuenciación Illumina® TruSight® HLA v2 para secuenciación de siguiente generación (NGS, por siglas en Inglés de *Next Generation Sequencing*) (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos). El proceso se realizó como recomienda el fabricante. Los pasos se detallan en las siguientes secciones.

5.3.1. Obtención de ADN genómico

El proceso de extracción y control de calidad del material genómico se realizó como se ha descrito en la sección 4.2.1. Posteriormente, las muestras de ADN genómico se ajustaron a una concentración de trabajo de 10 ng/ μ L utilizando un equipo Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos)

5.3.2. Amplificación

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa larga. Los loci HLA-A, -B, -C, -DRB1 y -DQB1 se prepararon utilizando cebadores específicos incluidos en el kit de muestras TruSight HLA Pre-24 (Illumina) y MasterAmpTM Extra-Long DNA Polymerase (Lucien Corporation, Middleton, WI, Estados Unidos). Las reacciones de PCR se realizaron en una placa de 96 pocillos en el termociclador 9700 PE (Applied Biosystems / Thermo Fisher Scientific) utilizando las siguientes proporciones de reactivos: 25 μ L de HPM (HLA-PCR Mix), 2 μ L de MasterAmpTM Extra-Long DNA Polymerase, 13 μ L de agua y 5 μ L de ADN genómico (10 ng/ μ L). Se realizaron dos programas de PCR para la amplificación de fragmentos de los loci HLA. El primero para la amplificación de los loci HLA-A, -B, -C y -DRB1, en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, 30 ciclos a 94°C durante 30 seg, 60°C durante 2 min, 68°C durante 15 min, 68°C durante 10 min, y un mantenimiento final a 10°C. El segundo programa de PCR para el locus HLA-DQB1 se realizó en las siguientes condiciones: 94°C durante 3 min; seguido de 10 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante un minuto, 72°C durante 15 minutos; 20 ciclos de 94°C durante 30 seg, 60°C durante 2 minutos, 72°C durante 15 min, 72°C durante 10 min; y una retención final a 10°C. Los productos de la PCR se confirmaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. También se realizó la limpieza de PCR.

5.3.3. Secuenciación

Normalización y etiquetado

Todas las concentraciones de productos de PCR de loci se normalizaron utilizando perlas magnéticas (LNA1, LNB1, TruSight HLA, Illumina). Este proceso se realiza para la preparación y secuenciación de bibliotecas multiplex.

Fragmentación

Después de la normalización, se usaron 40 µl de cada producto de PCR para la fragmentación (800 y 1200 pb), y se agregaron tampones de fragmentación HTM y HTB (TruSight HLA Pre-PCR 24, Illumina) a la reacción (10 µl cada uno) y se incubaron a 58°C durante 12 min en presencia de cebadores de secuenciación. Los productos de PCR fragmentados purificados se combinaron y la adición de adaptador se realizó utilizando el kit de preparación de muestras de ADN Nextera XT (Illumina).

La amplificación de los productos fragmentados purificados se realizó con base en el siguiente programa de PCR: desnaturalización a 72°C durante 3 min y 98°C durante 30 seg, seguido de 10 ciclos a 98°C durante 10 seg, 60°C durante 30 seg, 72°C durante 5 min y una retención final a 10°C. Se realizó una limpieza adecuada.

Secuenciación. Se desnaturalizaron (siete microlitros) los productos de secuenciación de PCR con 10 µl de NaOH 0,1 N y se secuenciaron en un instrumento MiSeq utilizando el kit de reactivos MiSeq de 300 ciclos (2 x 150 pb de extremos emparejados) (Illumina) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.3.4. Procesamiento de datos

Después de la secuenciación, los archivos de secuencia FASTQ y los archivos de alineación BAM generados por el software de análisis de informes MiSeq fueron utilizados para realizar el llamado de alelos (por su traducción del inglés *allele calling*, se refiere a la identificación de un alelo sobre la base

de información molecular⁴⁵, en este caso las secuencias de nucleótidos obtenidas). utilizando el software Assign 2.0™ TruSight HLA Analysis, Illumina, el cual es un software descargable de acceso libre, sin embargo, el pin de acceso temporal se obtiene con la adquisición del kit de secuenciación. El software utilizó secuencias de referencia de la base de datos IMGT/HLA (versión 3.23.0.0).

5.4. Análisis estadístico y procesamiento de resultados

5.4.1. Características clínicas y sociodemográficas

Analizamos las variables clínicas y demográficas con el programa IBM SPSS Statistics 26.

5.4.2. Alelos HLA clase I y clase II y frecuencias de haplotipos extendidos

Las diferencias en los alelos HLA de clase I y II y las frecuencias de haplotipos entre pacientes y controles se analizaron utilizando chi cuadrada, y los valores de P inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los valores de P se corrigieron utilizando el método de Bonferroni (para las frecuencias de los alelos, multiplicando el valor de p original por el número de alelos). Se calcularon los riesgos relativos (OR, por sus siglas en Inglés *odds ratio*) y los intervalos de confianza del 95% (IC del 95%) para medir la fuerza de la asociación con el programa Epi Info™ versión 7.2⁴⁶. Se generó un Forest plot de alelos y haplotipos HLA que mostraron significancia estadística utilizando R versión 4.0.3 (2020).

5.4.3. Cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg

Se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE, por siglas en Inglés de *Hardy Weinberg Equilibrium*) a nivel locus por locus. Los datos de los alelos HLA se enfrentaron a la hipótesis de que los genotipos diploides observados son el producto de una unión aleatoria de gametos. Para detectar una desviación significativa de HWE se siguió una prueba exacta de Fisher análoga en una tabla de contingencia de

dos por dos, pero se extendió a una tabla de contingencia triangular de tamaño arbitrario. La prueba se realizó utilizando una versión modificada de la cadena de Markov con el programa de genética de poblaciones Arlequin versión 3.5.2.2^{47,48}. Además, se calcularon los valores de diversidad: heterocigosidad observada (OH), heterocigosidad esperada (EH) y el contenido de información polimórfica (PIC) para cada locus (HLA-A, -C, -B, -DRB1 y -DQB1). A los haplotipos extendidos conservados se les asignó su origen como : mexicano nativo americano, europeo, africano o asiático según las frecuencias previamente reportadas en diferentes grupos étnicos⁴². El desequilibrio de ligamiento (LD por siglas en inglés de *linkage disequilibrium*) entre pares de loci HLA se calculó en base a delta (Δ), el coeficiente de desequilibrio de ligamiento clásico, que mide la desviación de una asociación aleatoria entre alelos de diferentes loci. Los resultados se han informado como valores delta relativos (Δ'). Δ' oscila entre -1 y 1. 1 representa la probabilidad más alta de que un par de alelos o segmentos de ADN se segreguen como un bloque, mientras que -1 representa la probabilidad de una asociación aleatoria total⁴⁷.

5.4.4. Estimación de mestizaje

Se utilizó el método de máxima verosimilitud para estimar las proporciones de mestizaje de los pacientes con LEG y de los individuos sanos mediante el software LEADMIX de genética de poblaciones⁴⁹. Se evaluaron cuatro poblaciones parentales ($k=4$), incluidos nativos americanos mexicanos, europeos, africanos y asiáticos. Se utilizaron HLA-B y -DRB1 como estimadores genéticos en las poblaciones incluidas. Estimamos la contribución de los nativos americanos mexicanos a partir de datos de mixtecos de Oaxaca, una población del sureste de México ($n=151$)⁵⁰, y tarahumaras de Chihuahua⁵¹, una población del norte de México ($n=44$). Asimismo, se estimó la contribución de las poblaciones parentales no autóctonas con datos obtenidos de componentes europeos de una muestra representativa de España (Cataluña, Navarra, Extremadura, Aragón y Cantabria) ($n=4335$)⁵²,

componentes africanos de Zimbabwe Harare Shona (n=230)⁵³, y componentes asiáticos de población Han de China (n=264)⁵⁴.

5.4.5. Distancias genéticas

Las distancias genéticas se evaluaron para las poblaciones parentales evaluadas en la estimación de mestizaje (k=4) (nativo americano mexicano, europeo, africano y asiático). Además, incluimos otros grupos de nativos americanos mexicanos para profundizar la comparación; los grupos agregados fueron: mayas lacandones¹⁸, mixe de Oaxaca^{55,56}, zapotecos⁵⁵ y seri⁵³. El análisis de la distancia genética incluyó la distancia de Nei obtenida con el programa de población genética de Arlequin. Generamos gráficos con una extensión de R en Arlequin. Además, se realizó un análisis de componentes principales basado en HLA-B y -DRB1, incluidas las cuatro poblaciones parentales. Se utilizó el software del programa de construcción BioVinci.

VI. RESULTADOS

6.1. Características clínicas y sociodemográficas

Las características clínicas y demográficas de los pacientes con LEG se resumen en la [Tabla 1](#) (Pág 31). Los pacientes fueron 89% mujeres y tenían una edad media de 39.7 ± 14.5 años. Mientras que los controles eran 51% mujeres y tenían una edad media de 38.0 ± 15.0 años. La mayoría de los pacientes presentaba más de un fenotipo clínico. Los más frecuentes fueron articular (79.8%), renal (65.6%) y hematológico (64.8%). La edad media de aparición de la enfermedad fue de 24.5 ± 11.2 años y el 34.5% de los pacientes presentó una enfermedad autoinmune concomitante. Los más frecuentes fueron la enfermedad de Graves y el hipotiroidismo. Otras condiciones menos frecuentes fueron el síndrome de Sjögren, hemofilia adquirida autoinmune, neuromielitis óptica, vitíligo y esclerodermia.

Tabla 1. Características clínicas y sociodemográficas de pacientes y controles

Variable	LEG	Controles
Edad de diagnóstico (X ± DS)	24.5 ± 11.2	-
Edad (X ± DS)	39.7 ± 14.5	38 ± 15.3
Femenino	104 (89%)	120 (51%)
Masculino	13 (11%)	114 (49%)
Familia	Abuelos y padres nacieron en la misma localidad	Abuelos y padres nacieron en la misma localidad
Latitud (Lugar de habitación)	19º 25' N	19º 26' N
Longitud (Lugar de habitación)	99º 7' W	99º 8' W
Urbano/rural (Lugar de habitación)	Urbano	Urbano
Estatus socioeconómico	Bajo a medio	Bajo a medio
Estado de salud		
Enfermedades crónicas (Diabetes, hipertensión)	6%	0%
SLEDAI, % de individuos (score)	64% Enfermedad inactiva (0-2) 36% Actividad leve (3-4)	NA
SDI* % de individuos (score)	84.6% (0-1) 13.67% (2-4) 1.73% (5-8)	NA
LupusQoL % de individuos (score)	68% (>60)	NA

NA : No aplica

Fenotipo de lupus y manifestaciones clínicas	
Articular	79.8%
Serositis	29.7%
Renal	65.6%
Neurológico	16.4%
Hematológico	64.8%
Síndrome Antifosfolípido	30.4%
Otras enfermedades autoinmunes	34.5%
ANAs (Anticuerpos antinucleares)	86%
Información de los parientes	
Pariente con LEG	18.6%
Pariente con enfermedad autoinmune	29.4%

6.2. Mestizaje y diversidad genética

Los pacientes con LEG tienen una carga de genes HLA no autóctonos más alta, mientras que los controles tienen una carga de genes HLA nativos americanos mexicanos más alta.

Los loci HLA-B y HLA-DRB1 fueron los más polimórficos en ambos grupos, mientras que HLA-DQB1 fue el locus menos polimórfico. Los parámetros de diversidad: contenido de información polimórfica y los valores de heterocigosidad esperados y observados se muestran en la [Tabla 2](#) (pág 33). Además, se muestra el análisis de equilibrio de Hardy Weinberg, con el valor de p corregida para cada locus. En los controles se muestra desviación del equilibrio de Hardy Weinberg en el locus HLA-DRB1, para lo cual se necesitan análisis adicionales para explicar este fenómeno. En este análisis de diversidad genética se encontró que los pacientes con LEG tienen una carga de genes HLA no autóctonos más alta, mientras que los controles tienen una carga mayor de genes HLA nativos americanos mexicanos. Lo que fue congruente con una primera publicación en la que se trabajó solo con HLA-DRB1 y permitió diferenciar alelos de susceptibilidad y protección categorizando a los pacientes según su estrato socioeconómico¹⁴. [Anexo 5](#) (Pág. 103).

Las estimaciones de mestizaje se basaron en HLA-B y -DRB1, debido a que HLA-B es el locus HLA más polimórfico, mientras que HLA-DRB1 es el locus más asociado a autoinmunidad. Los análisis con ambos loci conducen a la misma conclusión: los pacientes con LEG tienen una mayor proporción de ascendencia europea ($48 \pm 8\%$) (porcentaje medio entre HLA-B y HLA-DRB1 \pm desviación estándar) que los individuos sanos ($30 \pm 7\%$). En cambio, los pacientes con LEG tienen una proporción menor de ascendencia indígena mexicana ($44 \pm 1\%$) que los individuos sanos ($63 \pm 4\%$). Los datos detallados se muestran en la [Tabla 3](#) y [Figura 9](#) (Pág 33).

Tabla 2. Estimaciones de la diversidad genética de los loci HLA clase I y clase II en pacientes con LEG e individuos sanos.

HLA-Locus	LEG				Controles			
	HE	HO	Pc	CIP	EH	OH	Pc	CIP
A	0.9060	0.9697	0.201	0.9002	0.8919	0.8718	0.531	0.9761
C	0.8922	0.9571	0.352	0.8879	0.8947	0.9009	0.196	0.9907
B	0.9654	0.9929	0.833	0.9608	0.9668	0.9487	0.216	0.9767
DRB1	0.9249	0.9489	0.080	0.9190	0.9193	0.9013	0.010	0.0835
DQB1	0.8610	0.9203	0.696	0.8600	0.8256	0.8205	0.269	0.9447

Pc: valor corregido de p después de la corrección de Bonferroni, O.H.: Heterocigosidad observada, E.H.: Heterocigosidad esperada. CIP: Contenido de Información polimórfica.

Tabla 3. Estimación de mestizaje en pacientes mexicanos con LEG e individuos sanos.

Población parental	LEG			Controles		
	HLA-B	HLA-DRB1	Media ± DS	HLA-B	HLA-DRB1	Media ± DS
Nativa americana mexicana	0.45	0.43	0.44±0.01	0.66	0.61	0.63±0.04
Europea	0.42	0.54	0.48±0.08	0.25	0.34	0.30±0.07
Africana	0.13	0.01	0.07±0.08	0.09	0.04	0.06±0.07

La estimación de mestizaje se realizó utilizando el programa de genética de poblaciones LEADMIX, basado en HLA-B y -DRB1. Los resultados se presentan como frecuencias relativas basadas en k=4 poblaciones parentales, nativo americana mexicana, Europea, africana y asiática (los componentes asiáticos fueron mínimos y no se presentan).

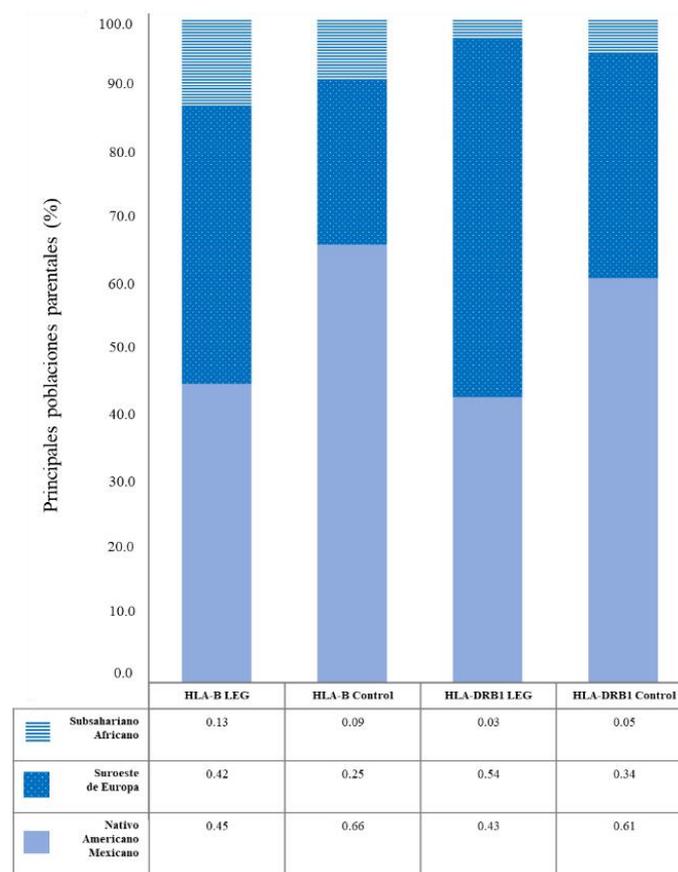


Figura 9. Estimaciones de mestizaje. Las estimaciones de mestizaje revelaron diferencias en los componentes nativos americano mexicano y europeo entre pacientes y controles. Se analizó mediante aproximación de máxima verosimilitud utilizando HLA-B y HLA-DRB1. Los valores presentados en el eje Y son los porcentajes de las principales poblaciones parentales incluidas (nativo americano mexicano, europeo y africano). La tabla muestra las frecuencias relativas de 0 a 1. El componente Africano se muestra en líneas horizontales azules, el componente europeo se muestra en azul con puntos blancos y el componente Nativo Americano Mexicano se muestra en azul claro continuo. La ascendencia asiática fue mínima y no está representada en el gráfico.

6.3. Distancias genéticas

6.3.1. Distancias de Nei y distancias por pares

Se ha demostrado con las distancias de Nei (d) que los pacientes con LEG muestran distancias genéticas más cercanas a poblaciones no autóctonas (europea, africana y asiática) que los individuos sanos, mientras que los individuos sanos están genéticamente más cercanos a poblaciones autóctonas.

Las variaciones son consistentes con el análisis de mestizaje y mostraron significancia estadística ($P < 0.05$). Las distancias de Nei (d) (número neto de diferencias de nucleótidos entre poblaciones) [Figura 10](#) (paneles en azul) (pág. 35), han demostrado que los pacientes con LEG están más cerca de las poblaciones no autóctonas (europea, africana y asiática) que los individuos sanos, mientras que los individuos sanos están más cerca de las poblaciones autóctonas que el grupo con LEG. Además, el cálculo de la distancia media corregida por pares entre poblaciones, [Figura 10](#) (paneles en verde) brindó información que lleva a la misma conclusión. Además, se consideró el número promedio de diferencias por pares dentro de las poblaciones para validar la riqueza de la estructura genética de cada población incluida en el análisis, [Figura 10](#) (paneles en naranja). Los valores de distancias genéticas correspondientes a todas las casillas de la [Figura 10](#), se muestran en la [matriz 1](#) (Pág. 36); mientras, en la [matriz 2](#) (Pág. 36) muestra los valores de P para cada cálculo por pares y a continuación la [matriz 3](#) (Pág. 36) muestra los valores de P corregidos.

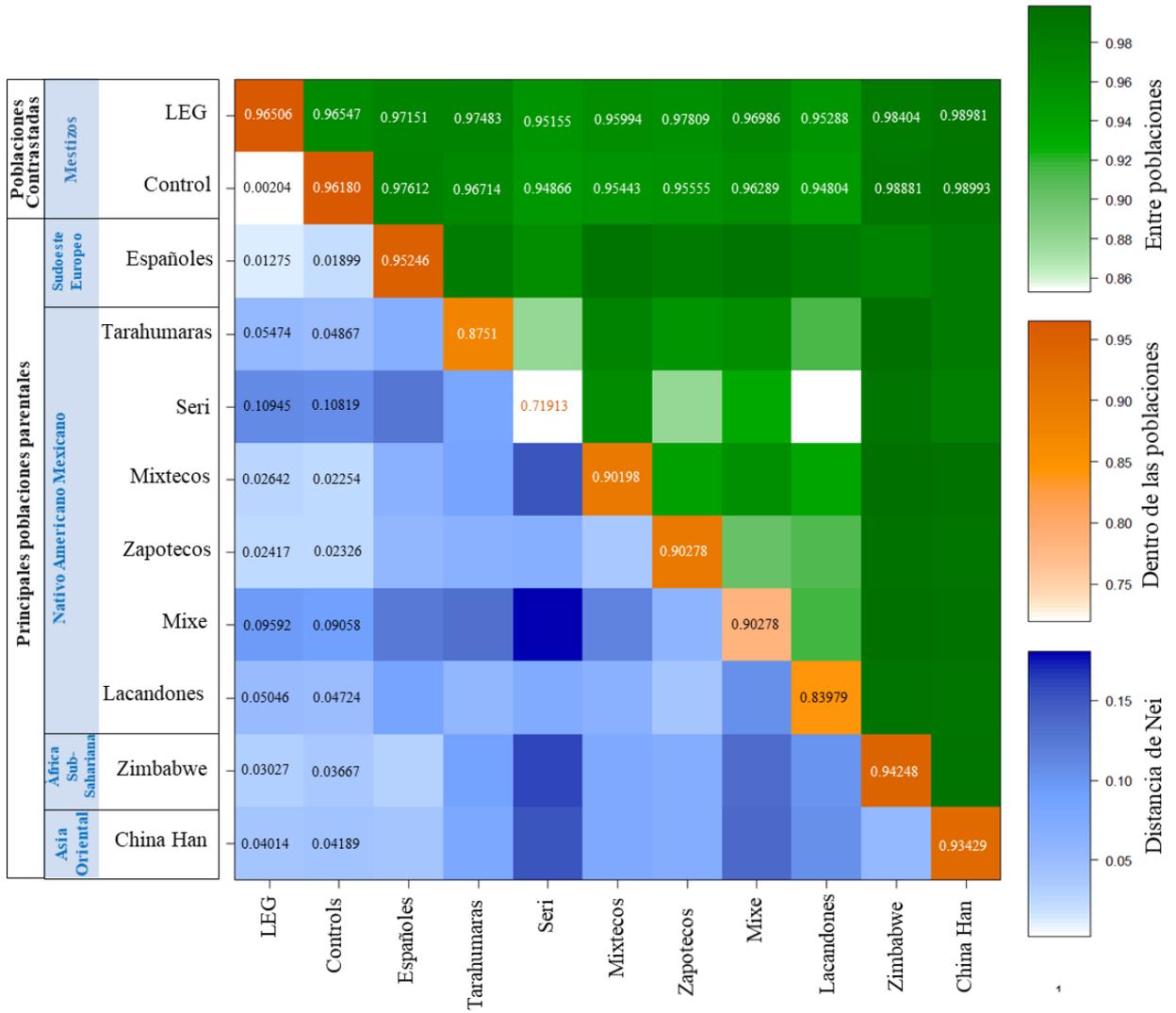


Figura 10. Distancias Genéticas. Las distancias genéticas revelaron diferencias de ascendencia mexicana amerindia y europea entre pacientes mexicanos con LEG e individuos sanos. En este gráfico, se representan en tres escalas de color el número promedio de diferencias por pares (π) entre las poblaciones muestreadas. Naranja en diagonal: π dentro de las poblaciones; verde sobre la diagonal: π_{xy} entre pares de poblaciones; azul debajo de la diagonal: número neto de diferencias de nucleótidos entre poblaciones (distancia de Nei). La interpretación es la misma para las tres escalas; se muestra en las barras de color de la derecha. Para > valor > distancia genética. A > intensidad color > distancia genética.

Lista de etiquetas usadas en las matrices:

Etiqueta	Nombre de la población
1:	LEG
2:	Individuos control
3:	Españoles
4:	Tarahumaras
5:	Seri
6:	Mixtecos
7:	Zapotecos
8:	Mixe
9:	Lacandon
10:	Zimbabwe Harare
11:	China Han

Matriz 1. Diferencias medias por parejas de la población (π) (Valores correspondientes a la figura 10)

Por encima de la diagonal: Número promedio de diferencias por pares entre poblaciones ($PiXY$)

Elementos en la diagonal: Número promedio de diferencias por pares dentro de la población (PiX)

Por debajo de la diagonal: Diferencia por pares promedio corregida ($(PiXY - (PiX + PiY) / 2)$)

	LEG 1	Control 2	Español 3	Tarahumara 4	Seri 5	Mixtecos 6	Zapotecos 7	Mixe 8	Lacandon 9	Africano 10	Asiático 11
1	0.96506	0.96547	0.97151	0.97483	0.95155	0.95994	0.95809	0.96986	0.95288	0.98404	0.98981
2	0.00204	0.96180	0.97612	0.96714	0.94866	0.95443	0.95555	0.96289	0.94804	0.98881	0.98993
3	0.01275	0.01899	0.95246	0.98158	0.96188	0.99166	0.98369	0.99218	0.98044	0.97549	0.98393
4	0.05474	0.04867	0.06779	0.87513	0.87941	0.97311	0.95257	0.96159	0.91410	0.99691	0.98284
5	0.10945	0.10819	0.12609	0.08228	0.71913	0.96269	0.87998	0.93204	0.85290	0.99087	0.97913
6	0.02642	0.02254	0.06444	0.08456	0.15213	0.90198	0.93965	0.95907	0.93548	0.99766	0.99484
7	0.02417	0.02326	0.05607	0.06362	0.06902	0.03727	0.90278	0.90139	0.91009	0.99412	0.99016
8	0.09592	0.09058	0.12455	0.13262	0.18106	0.11667	0.05859	0.78282	0.91625	0.99844	0.99567
9	0.05046	0.04724	0.08432	0.05664	0.07344	0.06460	0.03881	0.10495	0.83979	0.99346	0.99048
10	0.03027	0.03667	0.02802	0.08810	0.16006	0.07543	0.07149	0.13579	0.10233	0.94248	0.99214
11	0.04014	0.04189	0.04056	0.07813	0.15242	0.07670	0.07162	0.13712	0.10345	0.05376	0.93429

Matriz 2. PXY P-valores para las comparaciones por parejas de población

	LEG 1	Control 2	Español 3	Tarahumara 4	Seri 5	Mixtecos 6	Zapotecos 7	Mixe 8	Lacandon 9	Africano 10	Asiático 11
2	0.00909										
3	0.0000	0.0000									
4	0.0000	0.0000	0.0000								
5	0.5636	0.9272	0.0000	0.0000							
6	0.0000	0.1454	0.0000	0.0000	0.0000						
7	0.0272	0.5000	0.0000	0.0000	0.2909	0.0000					
8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000				
9	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1091	0.0000	0.0000	0.0000			
10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
11	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	

Matriz 3. PXY P-valores corregidos para las comparaciones por parejas de población corregidos

	LEG 1	Control 2	Español 3	Tarahumara 4	Seri 5	Mixtecos 6	Zapotecos 7	Mixe 8	Lacandon 9	Africano 10	Asiático 11
2	0.01818										
3	0.0000	0.0000									
4	0.0000	0.0000	0.0000								
5	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000							
6	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000						
7	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000					
8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000				
9	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000			
10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
11	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	

6.3.2. Fst

Al realizar el análisis de distancias genéticas por pares utilizando Fst se llegó a las mismas conclusiones con los otros análisis de distancias genéticas, se observan diferencias significativas entre los pacientes y controles sanos. Lo cual puede apreciarse en la [Figura 11](#).

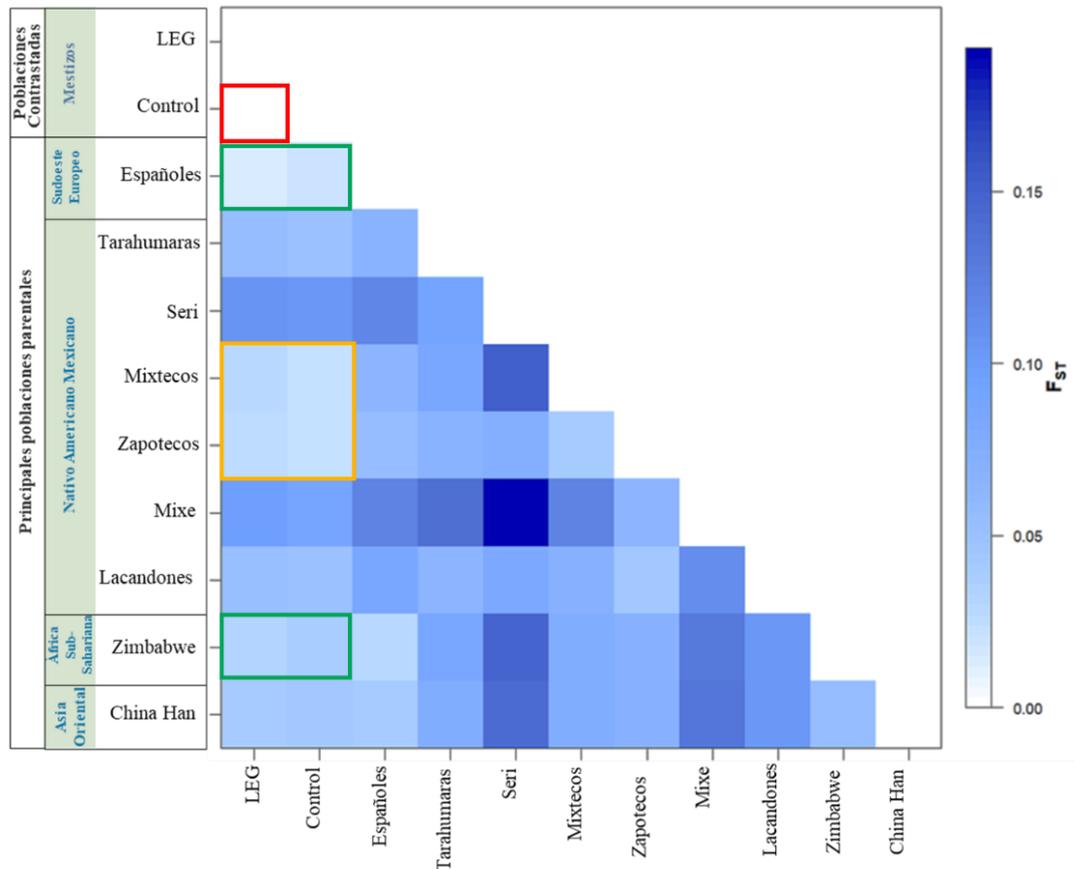


Figura 11. Fst para poblaciones por pares. La diferenciación de los pacientes con LEG de los controles no es evidente en el panel de colores □, se observa en color blanco denotando que son muy semejantes. Sin embargo, en la [Matriz 4](#) (Pág. 38) pueden observarse los valores de distancias genéticas basados en Fst siendo de 0.00211, para la comparación por pares entre pacientes y controles, mientras que en la [Matriz 5](#) (Pág. 38) se observan los Fst P valores (0.018±0.0121), finalmente la significancia estadística se muestra en la [Matriz 6](#) (Pág. 38). Otros fenómenos importantes que destacar en la figura son la diferencia existente entre LEG y controles comparados con españoles, es notable la cercanía del grupo de pacientes a españoles más que los controles. Lo mismo sucede al comparar ambos grupos con la población africana de Zimbabwe□. Al contrario, es notable como el grupo control muestra una tonalidad más leve al compararse con mixtecos y zapotecos que el grupo LEG□, lo que significa que están genéticamente más cercanos que los pacientes. La diferencia es leve pero estadísticamente significativa y consistente con los otros cálculos de distancias genéticas.

Lista de etiquetas usadas en las matrices:

Etiqueta	Nombre de la población
1:	LEG
2:	Individuos control
3:	Españoles
4:	Tarahumaras
5:	Seri
6:	Mixtecos
7:	Zapotecos
8:	Mixe
9:	Lacandon
10:	Zimbabwe Harare
11:	China Han

Matriz 4. FSTs para poblaciones por pares. Cálculo de estadísticas F convencionales a partir de frecuencias de haplotipos.

	LEG	Control	Español	Tarahumara	Seri	Mixtecos	Zapotecos	Mixe	Lacandon	Africano	Asiático
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0.0000										
2	0.00211	0.0000									
3	0.01316	0.01946	0.0000								
4	0.05447	0.04849	0.06688	0.0000							
5	0.10524	0.10291	0.11871	0.09215	0.0000						
6	0.02730	0.02324	0.06419	0.08636	0.15024	0.0000					
7	0.02485	0.02383	0.05611	0.06649	0.07479	0.03966	0.0000				
8	0.09584	0.08963	0.11970	0.13987	0.19151	0.12060	0.06511	0.0000			
9	0.05378	0.04984	0.08569	0.06293	0.08106	0.07004	0.04356	0.11271	0.0000		
10	0.03086	0.03709	0.02871	0.08612	0.14787	0.07493	0.07109	0.13040	0.10288	0.0000	
11	0.04076	0.04237	0.04123	0.07756	0.14229	0.07648	0.07161	0.13180	0.10395	0.05420	0.0000

Matriz 5. FST P valores

	LEG	Control	Español	Tarahumara	Seri	Mixtecos	Zapotecos	Mixe	Lacandon	Africano	Asiático
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	*										
2	0.018±0.0121	*									
3	0.00±0.00	0.00±0.00	*								
4	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	*							
5	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	*						
6	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	*					
7	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	*				
8	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	*			
9	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	*		
10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	*	
11	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	*

Número de permutaciones: 110

Matriz 6. Valores de P significativos para FST

Nivel de significancia=0.0500

Número de permutaciones: 110

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1											
2	+										
3	+	+									
4	+	+	+								
5	+	+	+	+							
6	+	+	+	+	+						
7	+	+	+	+	+	+					
8	+	+	+	+	+	+	+				
9	+	+	+	+	+	+	+	+			
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

6.3.3. Coeficiente de coancestría

Considerando dos alelos en un locus que se extraen al azar de dos individuos i y j . La probabilidad de que los dos alelos sean idénticos por descendencia se define como el coeficiente de coancestría o coeficiente de parentesco y a menudo se representa como θ_{ij} . El análisis obtenido mediante los coeficientes de ancestría (Figura 12) reporta conclusiones semejantes obtenidas con el análisis de distancias de Nei, F_{st} y F_{st} linealizado de Slatkin, Figura 13 (Pág. 40).

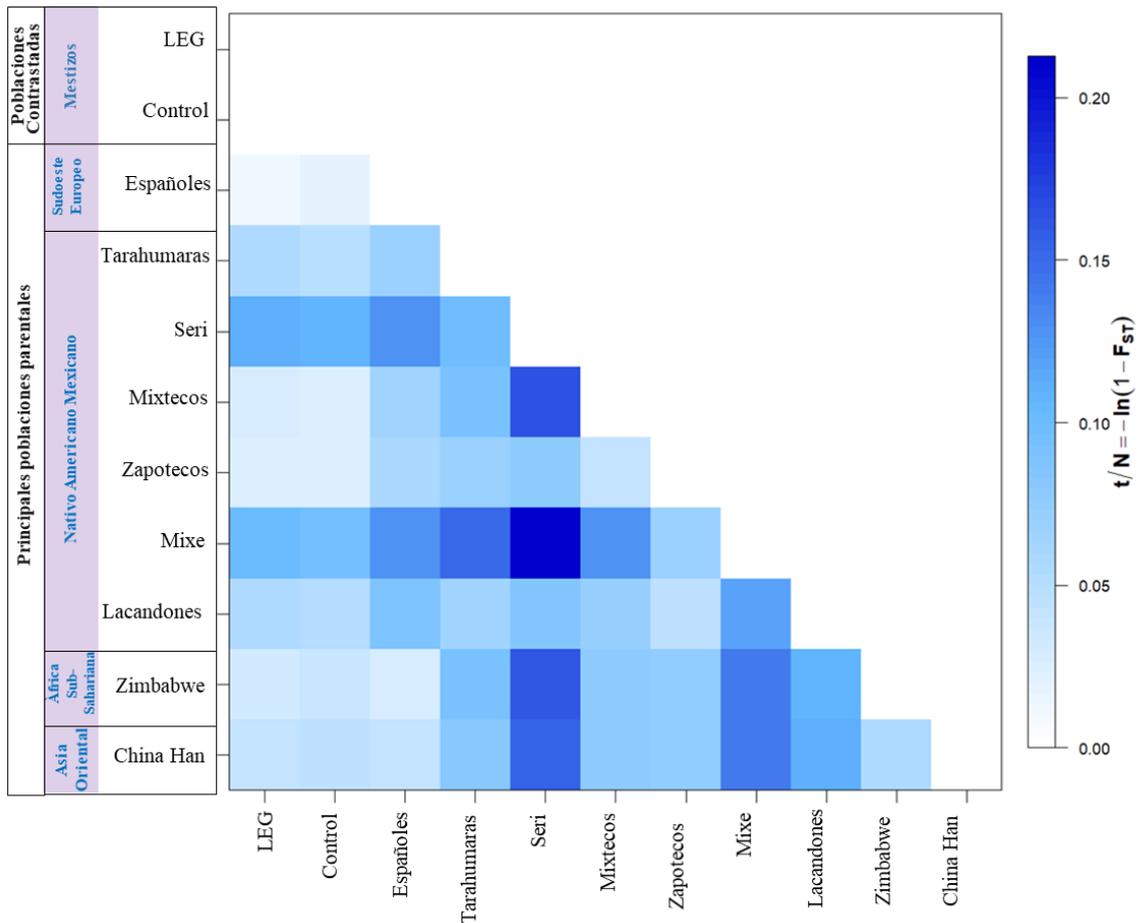


Figura 12. Coeficientes de coancestría. La diferenciación de los pacientes con LEG de los controles no es evidente en el panel de colores, se observa en color blanco denotando que son muy semejantes. En la Matriz 7 (Pág 40) pueden observarse los valores de distancias genéticas basados en coeficientes de coancestría siendo de 0.00212, para la comparación por pares entre pacientes y controles. Importante es observar la diferencia existente entre LEG y controles comparados con los Españoles, es notable la cercanía del grupo de pacientes a Españoles más que los controles. Lo mismo sucede al comparar ambos grupos LEG y controles con la población africana de Zimbabwe. Las diferencias con los grupos indígenas de México no son tan evidentes en el panel de color, pero si se denotan en los valores de la matriz, concluyendo de la misma manera que los controles se encuentran más cercanos a los grupos indígenas de México, especialmente mixtecos y zapotecos. Mientras que los LEG se encuentran más cercanos a grupos no autóctonos como europeos y africanos.

Matriz 7. Coeficientes de coancestría como $t/M = -\ln(1-F_{ST})$
(M=N Para datos haploides, M=2N para datos diploides)

	LEG 1	Control 2	Español 3	Tarahumara 4	Seri 5	Mixtecos 6	Zapotecos 7	Mixe 8	Lacandon 9	Africano 10	Asiático 11
1	-0.00000										
2	0.00212	-0.00000									
3	0.01324	0.01966	-0.00000								
4	0.05601	0.04971	0.06922	-0.00000							
5	0.11120	0.10860	0.12637	0.09668	-0.00000						
6	0.02768	0.02352	0.06634	0.09032	0.16280	-0.00000					
7	0.02517	0.02412	0.05774	0.06880	0.07773	0.04047	-0.00000				
8	0.10075	0.09391	0.12750	0.15067	0.21259	0.12852	0.06732	-0.00000			
9	0.05528	0.05112	0.08958	0.06500	0.08454	0.07261	0.04453	0.11958	-0.00000		
10	0.03134	0.03780	0.02913	0.09005	0.16001	0.07789	0.07374	0.13973	0.10856	-0.00000	
11	0.04162	0.04330	0.04211	0.08073	0.15349	0.07956	0.07430	0.14134	0.10976	0.05573	-0.00000

6.3.4. Fst linealizado de Slatkin

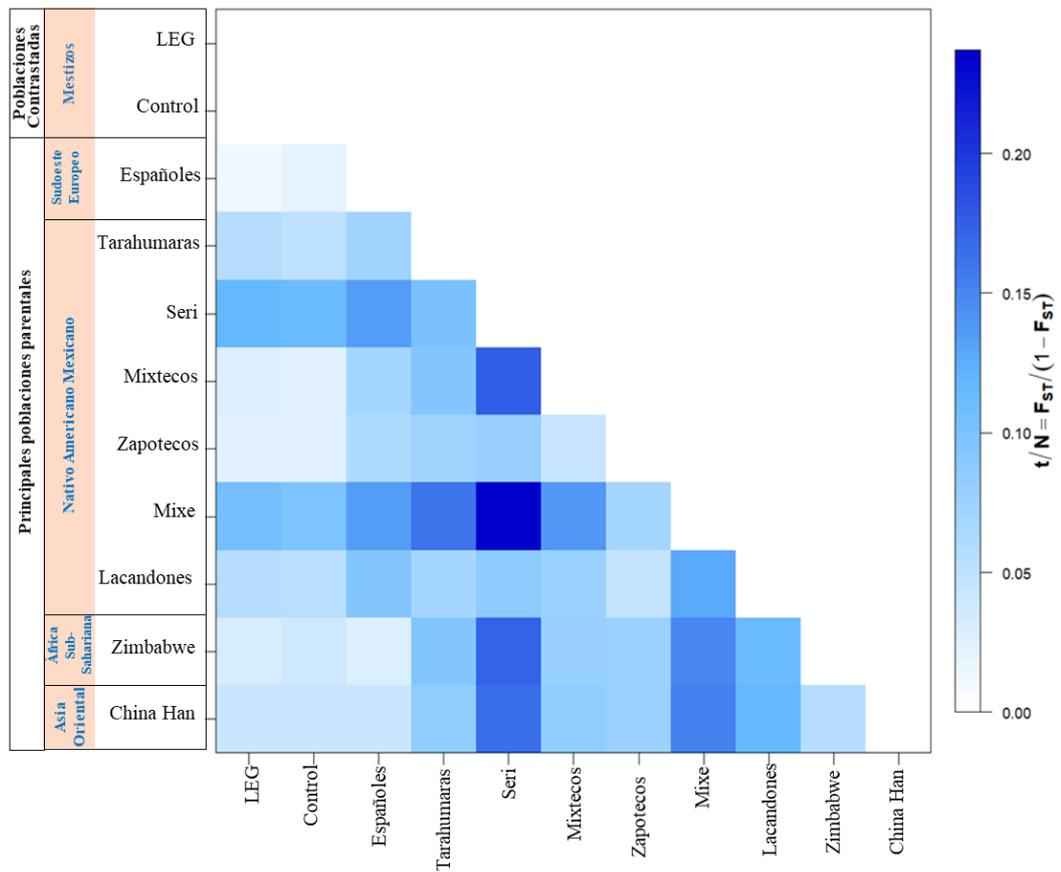


Figura 13. Fst linealizado de Slatkin. La diferenciación de los pacientes con LEG de los controles no es evidente en el panel de colores como se observó en los análisis de Fst y Coeficiente de coancestría, se observa en color blanco denotando que son muy semejantes. Sin embargo, en la **Matriz 8** (Pág 41) pueden observarse los valores de distancias genéticas basados en los Fst de Slatkin siendo de **0.00212**, para la comparación por pares entre pacientes y controles. Las comparaciones para cada uno de los grupos son semejantes a las realizadas para Fst y Coeficientes de coancestría, se ha llegado a la misma conclusión a través de tres cálculos distintos.

Matriz 8. Matriz de FSTs linealizados de Slatkin como $t/M=FST/(1-FST)$
(M=N para datos haploides , M=2N para datos diploides)

	LEG 1	Control 2	Español 3	Tarahumara 4	Seri 5	Mixtecos 6	Zapotecos 7	Mixe 8	Lacandon 9	Africano 10	Asiático 11
1	0.00000										
2	0.00212	0.00000									
3	0.01333	0.01985	0.00000								
4	0.05761	0.05097	0.07167	0.00000							
5	0.11762	0.11472	0.13470	0.10150	0.00000						
6	0.02807	0.02380	0.06860	0.09453	0.17680	0.00000					
7	0.02549	0.02441	0.05944	0.07123	0.08083	0.04130	0.00000				
8	0.10600	0.09846	0.13598	0.16262	0.23688	0.13714	0.06964	0.00000			
9	0.05684	0.05245	0.09372	0.06716	0.08822	0.07532	0.04554	0.12702	0.00000		
10	0.03184	0.03852	0.02956	0.09423	0.17353	0.08100	0.07653	0.14996	0.11467	0.00000	
11	0.04250	0.04425	0.04301	0.08408	0.16590	0.08281	0.07713	0.15181	0.11601	0.05731	

6.3.5. Comparación de pacientes y controles a través de análisis de componentes principales

Se realizó un análisis de componentes principales teniendo en cuenta dos loci HLA Clase I y Clase II, incluyendo los alelos del HLA-B y HLA-DRB1. Se incluyeron grupos europeos, grupos de mestizos mexicanos de diferentes Estados de México, grupos de nativos americanos mexicanos y grupos africanos, no se incluyeron grupos Asiáticos debido al poco porcentaje de ancestría asiática encontrada en los grupos de pacientes y controles. En la [Figura 14](#) (Pág. 42) se puede observar como el grupo de pacientes (LEG) se encuentra alejado del grupo control (Cont) . Se esperaría que ambos grupos estuviesen eclipsados entre sí en el gráfico ya que ambos grupos son individuos mestizos mexicanos de la Ciudad de México. Es necesario tener en consideración que los individuos en la Ciudad de México son HLA variables dependiendo de la zona de la Ciudad de México que se trate, por lo cual también se incluyeron mestizos mexicanos (autodenominados como tal por cuestionario) de la Ciudad de México del Centro (MxCC), Sur (MxCS), Norte (MxCN), Oeste (MxCW) y este (MxCE). Puede observarse una variación considerable entre estos grupos de mestizos pertenecientes a la misma zona geográfica, respecto del componente principal 1 que representa más del 51% de la varianza entre grupos. Incluso mayor que la presentada en grupos de países como lo son los grupos de países europeos y africanos. Puede observarse que en efecto el grupo de pacientes se encuentra considerablemente alejado del grupo control y de los otros grupos de la Ciudad de México, enfatizando en la diferenciación de la carga HLA-B y HLA-DRB1 en estos individuos.

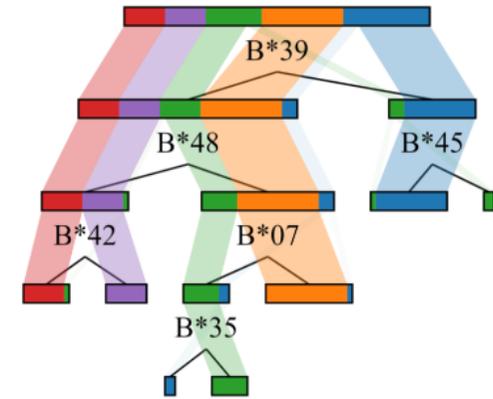
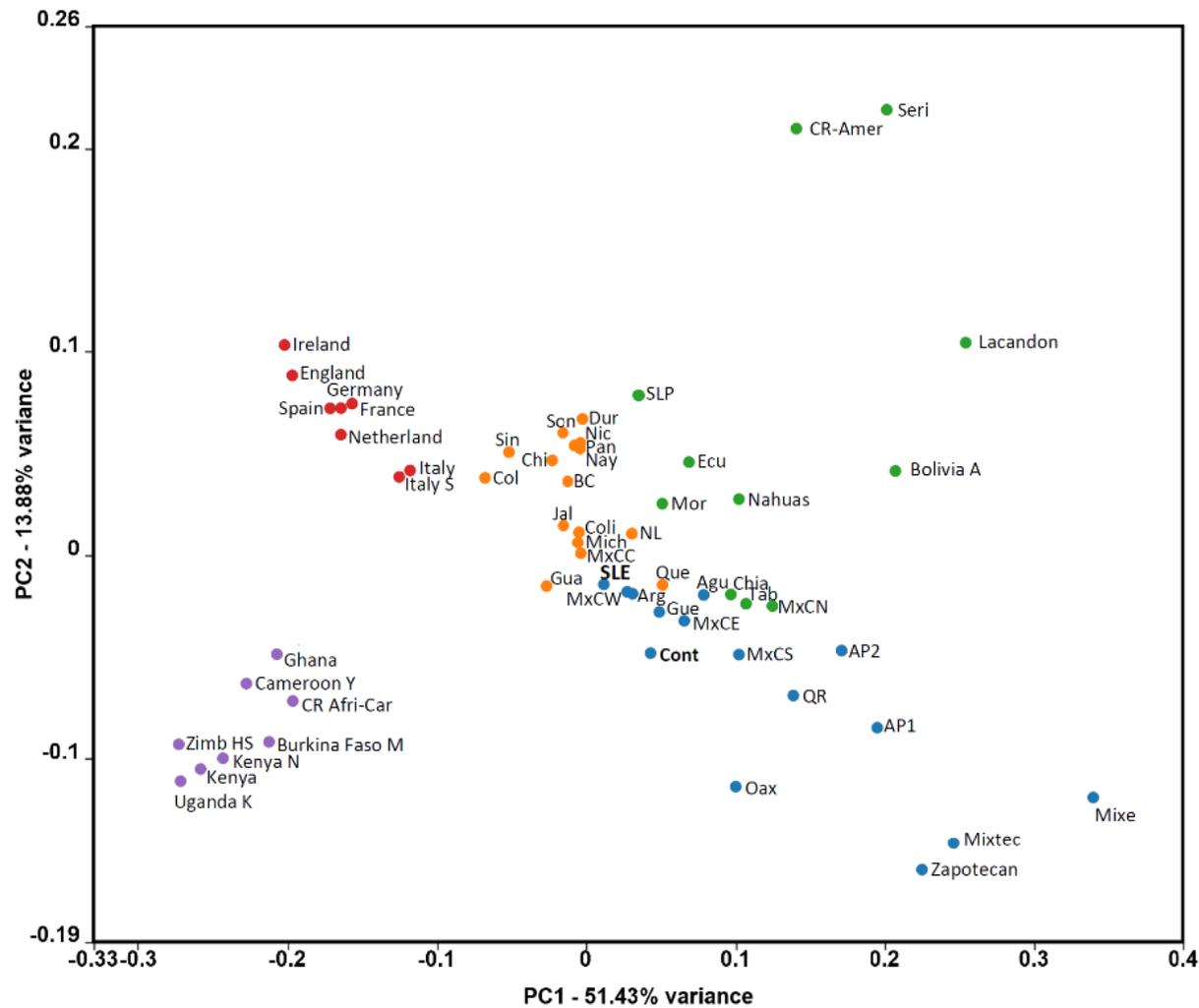


Figura 14. La gráfica del análisis de componentes principales (PCA) muestra las particularidades del LEG de la Ciudad de México. Las poblaciones están coloreadas por características de alta varianza representadas por los alelos en el árbol de decisión que se muestra a la derecha. Algunas poblaciones coinciden en color y ubicación continental con la discriminación de frecuencia de alelos HLA. Puntos morados representan africanos y el rojo representa a europeos. Los puntos naranjas, azules y verdes representan poblaciones mestizas y nativas de los Estados de México, Centro y Suramérica, debidamente descrita en la sección "Materiales y métodos". Abreviaturas: Burkina Faso M: Burkina Faso Mossi, Uganda K: Uganda Kampala, Camerún Y: Camerún Yaundé, Kenia N: Kenia Nandi, Ghana: Ghana Ga-Adangbe, Italia S: Cerdeña, BC: Baja California, Coli: Colima, Sin: Sinaloa, Dur: Durango, Son: Sonora y NL: Nuevo León, Nic: Nicaragua, Pan: Panamá, Col: Colombia, Que: Querétaro, Gua: Guanajuato, Mich: Michoacán, MxCC: Centro Ciudad de México. Agua: Aguascalientes, Gua: Guanajuato, Que: Querétaro, Gue: Guerrero, Mich: Michoacán, SLP: San Luis Potosí, Nay: Nayarit, Jal: Jalisco, MxCC: Centro Ciudad de México, MxCW: México Ciudad Oeste, MxCE: Ciudad de México Este, MxCS: Ciudad de México Sur, MxCN: Ciudad de México Norte. Chi: Chiapas, Tab: Tabasco, Oax: Oaxaca, QR: Quintana Roo. AP1: Amerindios agrupados 1, AP2: Amerindios agrupados 2, CR-Amer: Costa Rica Amerindios, CR Afri-Car: Costa Rica Afrocaribeños. Ecu: Ecuador, Mor: Morelos, SLP: San Luis Potosí, Bolivia A: Bolivia Aymaras.

6.4. Haplotipos extendidos conservados de susceptibilidad

*“HLA-A*29:02~C*16:01~B*44:03~DRB1*07:01~DQB1*02:02 como un nuevo haplotipo extendido de susceptibilidad identificado en pacientes mestizos mexicanos con LEG”*

La determinación de las frecuencias y el riesgo o protección conferidos por los alelos y haplotipos HLA se muestran en las [Tablas 4-12](#) (Págs. 45-53). Se encontró que la frecuencia de un nuevo haplotipo de susceptibilidad aumentó en pacientes con LEG. El bloque europeo HLA-A*29:02~C*16:01~B*44:03~DRB1*07:01~DQB1*02:02 con $P_c=0.02$, $OR=6.7$, [Tabla 12](#) (Pág. 53). Recientemente se describió este haplotipo en pacientes mexicanos de acalasia⁵⁷. Ninguno de los alelos individuales que componen este haplotipo extendido mostró significancia estadística en análisis de alelos aislados.

*El haplotipo HLA-A*01:01~C*07:01~B*08:01~DRB1*03:01~DQB1*02:01 es el factor de mayor riesgo para desarrollar LEG en pacientes mestizos mexicanos de la Ciudad de México.*

Como se ha mostrado en estudios anteriores, el haplotipo extendido conservado europeo HLA-A*01:01~C*07:01~B*08:01~DRB1*03:01~DQB1*02:01 ($P_c = 0.0004$, $OR = 18$) se ha encontrado como el factor de alto riesgo para desarrollar LEG en mexicanos de la Ciudad de México, [Tabla 12](#) (Pág. 53). El análisis estadístico de loci individuales ha identificado riesgos relativos dados para cada uno de los alelos que componen este haplotipo, [Figura 15](#) (Pág. 44). El riesgo relativo observado está fuertemente influenciado por el desequilibrio de ligamiento con genes de riesgo vecinos, tanto HLA como no HLA, [Figura 16](#) (Pág. 44). Además, se encontró que la frecuencia de HLA-DRB1*15:01 aumentó sin alcanzar significancia estadística y el alelo HLA-A*11:01 se encontró como un factor de riesgo, con $P_c=0.035$, $OR=2.5$. Ver en [Figura 15](#) (Pág. 44) y [Tabla 4](#) (Pág. 45).

En cuanto al MHC de clase II la frecuencia de los haplotipos protectores de nativos americanos mexicanos HLA-DRB1*14:06~DQB1*03:01 ($P_c=0.007$, $OR=0.4$) y HLA-DRB1*16:02~DQB1*03:01 ($P_c=0.006$, $OR=0.3$), [Tabla 10](#) (Pág. 51), cuya frecuencia está disminuida en pacientes con LEG de la Ciudad de México presentaron significancia estadística al compararse con individuos sanos. Mientras

que los alelos individuales de clase II HLA-DRB1*14:06 ($P_c = 0.006$, OR = 0.4) y HLA-DRB1*16:02 ($P_c = 0.006$, OR = 0.3) presentaron significancia estadística también. Ver [Tabla 7](#) (Pág. 48).

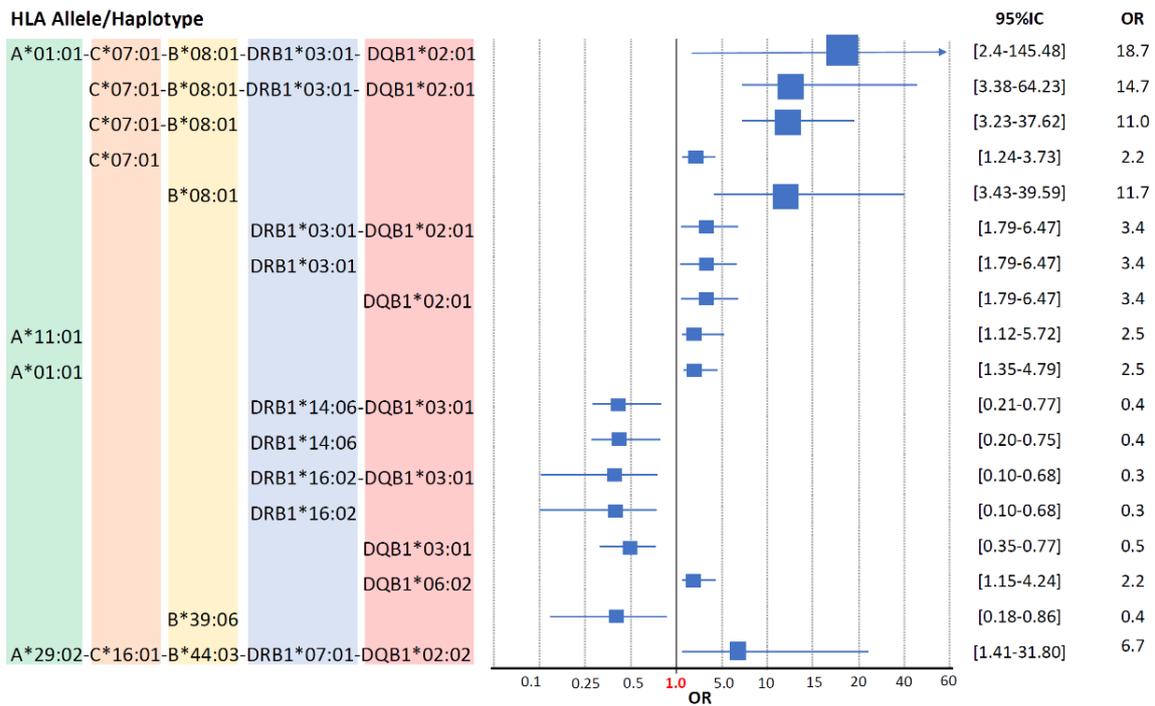


Figura 15. Alelos y haplotipos HLA de susceptibilidad y protección en pacientes mestizos Mexicanos con LEG. Los alelos y haplotipos, que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con LEG e individuos sanos ($P_c < 0,05$), se muestran en el diagrama de bosque. Las razones de probabilidad y el intervalo de confianza del 95% se incluyen en el gráfico. Los cuadros azules no se muestran a escala.

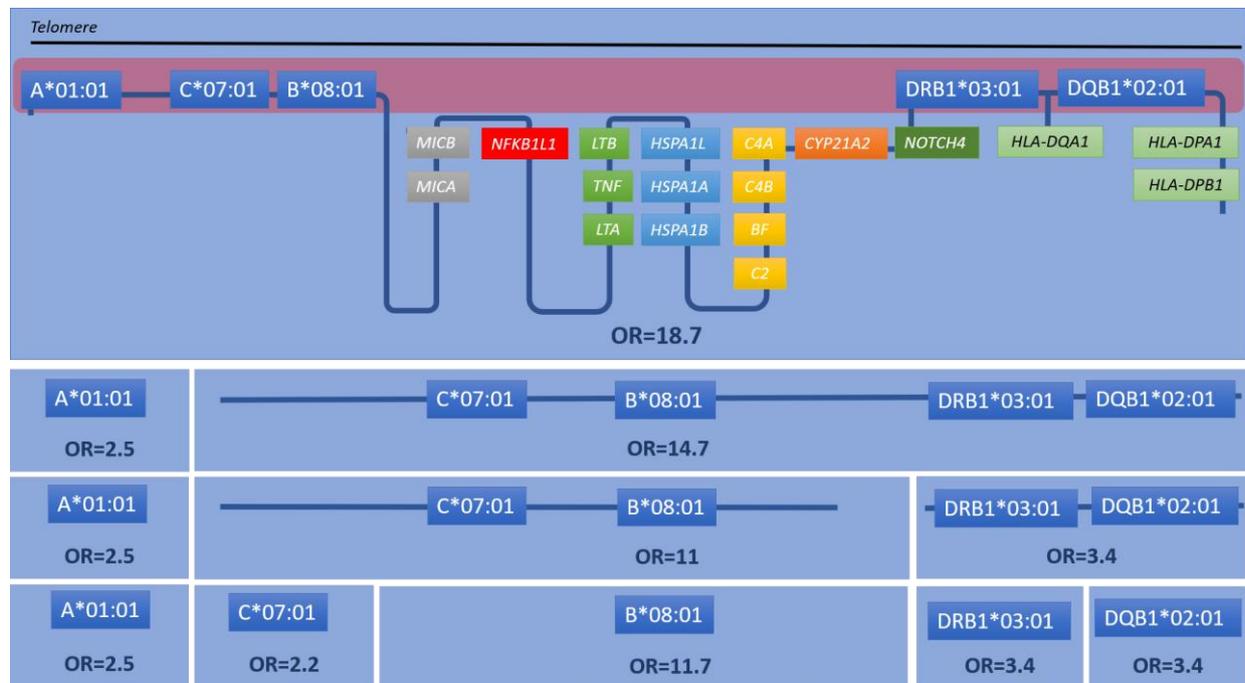


Figura 16. Haplotype Extendido Conservado de mayor riesgo para desarrollar LEG en Ciudad de México. Se detallan los riesgos relativos para el haplotipo completo y los riesgos relativos de los alelos individuales.

Tabla 4. Frecuencias de alelos HLA-A en pacientes con LEG e individuos sanos.

<i>HLA-A</i>	LEG		Controles		<i>Pc</i>	OR	IC 95%	
	N=143 (286 alelos)		N=234 (468 alelos)					
	<i>n</i>	<i>FA</i>	<i>n</i>	<i>FA</i>				
A*02:01	58	0.2028	107	0.2286	ns			
A*24:02	41	0.1434	79	0.1688	ns			
A*01:01	25	0.0874	17	0.0363	0.005	2.5	1.35	4.79
A*31:01	20	0.0699	37	0.0791	ns			
A*02:06	17	0.0594	45	0.0962	ns			
A*68:01	14	0.0490	37	0.0791	ns			
A*03:01	15	0.0524	15	0.0321	ns			
A*11:01	15	0.0524	10	0.0214	0.035	2.5	1.12	5.72
A*29:02	11	0.0385	12	0.0256	ns			
A*68:03	12	0.0420	16	0.0342	ns			
A*68:02	8	0.0280	14	0.0299	ns			
A*74:01	1	0.0035	1	0.0021	ns			
A*32:01	4	0.0140	4	0.0085	ns			
A*23:01	3	0.0105	8	0.0171	ns			
A*26:01	3	0.0105	9	0.0192	ns			
A*30:01	3	0.0105	6	0.0128	ns			
A*68:05	2	0.0070	3	0.0064	ns			
A*33:03	2	0.0070	2	0.0043	ns			
A*33:01	2	0.0070	6	0.0128	ns			
A*34:02	2	0.0070	1	0.0021	ns			
A*02:02	1	0.0035	1	0.0021	ns			
A*02:05	1	0.0035	8	0.0171	ns			
A*66:01	1	0.0035	6	0.0128	ns			
A*30:02	8	0.0280	7	0.0150	ns			
Otros alelos	27							

Abreviaturas: ns: no significativo, FA: frecuencia alélica (las frecuencias se presentan como frecuencias relativas y pueden encontrarse entre valores de 0 a 1), IC 95%: Intervalo de confianza al 95%, OR: Odds ratio o riesgo relativo, *Pc*: Valor de p corregido, N: número total de individuos en el grupo, n: número de alelos.

Tabla 5. Frecuencias alélicas HLA-C en pacientes con LEG y controles.

HLA-C	LEG		Controles		Pc	OR	IC 95%	
	N=143 (286 alelos)		N=234 (468 alelos)					
	n	FA	n	FA				
C*04:01	62	0.2168	87	0.1859	ns			
C*07:02	51	0.1783	97	0.2073	ns			
C*07:01	31	0.1084	25	0.0534	0.008	2.2	1.24	3.73
C*03:04	20	0.0699	31	0.0662	ns			
C*01:02	16	0.0559	42	0.0897	ns			
C*16:01	12	0.0420	12	0.0256	ns			
C*08:02	10	0.0350	19	0.0406	ns			
C*08:01	11	0.0385	22	0.0470	ns			
C*06:02	10	0.0350	28	0.0598	ns			
C*03:03	9	0.0315	14	0.0299	ns			
C*05:01	7	0.0245	10	0.0214	ns			
C*12:03	6	0.0210	12	0.0256	ns			
C*14:02	8	0.0280	4	0.0085	ns			
C*02:10	5	0.0175	2	0.0043	ns			
C*17:01	3	0.0105	1	0.0021	ns			
C*02:02	2	0.0070	6	0.0128	ns			
C*12:02	2	0.0070	2	0.0043	ns			
C*15:09	2	0.0070	11	0.0235	ns			
C*07:04	2	0.0070	1	0.0021	ns			
C*15:02	2	0.0070	9	0.0192	ns			
C*03:02	2	0.0070	2	0.0043	ns			
C*04:07	1	0.0035	2	0.0043	ns			
C*08:03	1	0.0035	4	0.0085	ns			
C*15:05	1	0.0035	1	0.0021	ns			
C*16:02	1	0.0035	1	0.0021	ns			
Otros alelos	9							

Abreviaturas: ns: no significativo, FA: frecuencia alélica (las frecuencias se presentan como frecuencias relativas y pueden encontrarse entre valores de 0 a 1), IC 95%: Intervalo de confianza al 95%, OR: Odds ratio o riesgo relativo, Pc: Valor de p corregido, N: número total de individuos en el grupo, n: número de alelos.

Tabla 6. Frecuencias alélicas HLA-B en pacientes con LEG y controles.

<i>HLA-B</i>	LEG		Controles		<i>Pc</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>	
	N=143 (286 alelos)		N=234 (468 alelos)					
	<i>n</i>	<i>AF</i>	<i>n</i>	<i>AF</i>				
B*08:01	20	0.0699	3	0.0064	0.000003	11.7	3.43	39.59
B*39:05	24	0.0839	37	0.0791	ns			
B*35:01	19	0.0664	27	0.0577	ns			
B*51:01	16	0.0559	28	0.0598	ns			
B*35:17	15	0.0524	18	0.0385	ns			
B*07:02	13	0.0455	19	0.0406	ns			
B*44:03	13	0.0455	13	0.0278	ns			
B*35:12	13	0.0455	18	0.0385	ns			
B*40:02	10	0.0350	25	0.0534	ns			
B*18:01	10	0.0350	8	0.0171	ns			
B*39:06	8	0.0280	32	0.0684	0.03	0.4	0.18	0.86
B*52:01	8	0.0280	10	0.0214	ns			
B*48:01	9	0.0315	20	0.0427	ns			
B*14:02	7	0.0245	15	0.0321	ns			
B*15:15	6	0.0210	15	0.0321	ns			
B*15:03	6	0.0210	2	0.0043	ns			
B*49:01	6	0.0210	9	0.0192	ns			
B*35:02	5	0.0175	2	0.0043	ns			
B*15:01	5	0.0175	10	0.0214	ns			
B*37:01	4	0.0140	4	0.0085	ns			
B*14:01	3	0.0105	4	0.0085	ns			
B*38:01	4	0.0140	6	0.0128	ns			
B*35:14	3	0.0105	7	0.0150	ns			
B*39:01	3	0.0105	5	0.0107	ns			
B*57:03	3	0.0105	1	0.0021	ns			
B*35:16	2	0.0070	3	0.0064	ns			
B*15:16	2	0.0070	1	0.0021	ns			
B*15:17	2	0.0070	3	0.0064	ns			
B*15:30	2	0.0070	8	0.0171	ns			
B*13:02	2	0.0070	6	0.0128	ns			
B*35:43	3	0.0105	9	0.0192	ns			
B*39:02	2	0.0070	10	0.0214	ns			
B*41:01	2	0.0070	5	0.0107	ns			
B*44:02	2	0.0070	5	0.0107	ns			
B*50:01	2	0.0070	4	0.0085	ns			
B*57:01	2	0.0070	7	0.0150	ns			
B*58:01	2	0.0070	3	0.0064	ns			
B*39:08	1	0.0035	3	0.0064	ns			
Otros alelos	27							

Abreviaturas: ns: no significativo, FA: frecuencia alélica (las frecuencias se presentan como frecuencias relativas y pueden encontrarse entre valores de 0 a 1), IC 95%: Intervalo de confianza al 95%, OR: Odds ratio o riesgo relativo, Pc: Valor de p corregido, N: número total de individuos en el grupo, n: número de alelos.

Tabla 7. Frecuencias alélicas HLA-DRB1 en pacientes con LEG y controles.

<i>HLA-DRB1</i>	LEG		Controles		<i>Pc</i>	<i>OR</i>	<i>IC 95%</i>
	N=143 (286 alelos)		N=234 (468 alelos)				
	<i>n</i>	<i>AF</i>	<i>n</i>	<i>AF</i>			
DRB1*08:02	52	0.1818	91	0.1944	ns		
DRB1*04:07	27	0.0944	55	0.1175	ns		
DRB1*03:01	29	0.1014	15	0.0321	0.0002	3.4	1.79 6.47
DRB1*07:01	24	0.0839	33	0.0705	ns		
DRB1*15:01	20	0.0699	17	0.0363	ns		
DRB1*04:04	17	0.0594	31	0.0662	ns		
DRB1*11:04	10	0.0350	8	0.0171	ns		
DRB1*13:01	11	0.0385	12	0.0256	ns		
DRB1*14:06	12	0.0420	47	0.1004	0.006	0.4	0.20 0.75
DRB1*01:01	8	0.0280	9	0.0192	ns		
DRB1*04:11	7	0.0245	9	0.0192	ns		
DRB1*16:02	5	0.0175	30	0.0641	0.006	0.3	0.10 0.68
DRB1*04:01	3	0.0105	3	0.0064	ns		
DRB1*11:02	4	0.0140	4	0.0085	ns		
DRB1*13:03	5	0.0175	3	0.0064	ns		
DRB1*14:02	5	0.0175	11	0.0235	ns		
DRB1*04:05	3	0.0105	1	0.0021	ns		
DRB1*08:04	3	0.0105	2	0.0043	ns		
DRB1*15:03	4	0.0140	1	0.0021	ns		
DRB1*01:02	4	0.0140	11	0.0235	ns		
DRB1*01:03	3	0.0105	3	0.0064	ns		
DRB1*04:02	4	0.0140	10	0.0214	ns		
DRB1*08:01	2	0.0070	1	0.0021	ns		
DRB1*09:01	2	0.0070	1	0.0021	ns		
DRB1*12:01	1	0.0035	2	0.0043	ns		
DRB1*13:04	2	0.0070	1	0.0021	ns		
DRB1*04:03	1	0.0035	10	0.0214	ns		
DRB1*04:08	2	0.0070	1	0.0021	ns		
DRB1*04:10	1	0.0035	2	0.0043	ns		
DRB1*11:01	1	0.0035	6	0.0128	ns		
DRB1*13:02	3	0.0105	10	0.0214	ns		
DRB1*13:05	1	0.0035	1	0.0021	ns		
DRB1*16:01	1	0.0035	2	0.0043	ns		
DRB1*12:02	1	0.0035	3	0.0064	ns		
DRB1*14:01	1	0.0035	8	0.0171	ns		
Otros alelos	7						

Abreviaturas: ns: no significativo, FA: frecuencia alélica (las frecuencias se presentan como frecuencias relativas y pueden encontrarse entre valores de 0 a 1), IC 95%: Intervalo de confianza al 95%, OR: Odds ratio o riesgo relativo, *Pc*: Valor de p corregido, N: número total de individuos en el grupo, n: número de alelos.

Tabla 8. Frecuencias alélicas HLA-DQB1 en pacientes con LEG y controles.

HLA-DQB1	LEG		Controles		Pc	OR	IC 95%	
	N=143 (286 alelos)		N=234 (468 alelos)					
	<i>n</i>	<i>FA</i>	<i>n</i>	<i>FA</i>				
DQB1*03:02	60	0.2098	115	0.2457	ns			
DQB1*04:02	59	0.2063	96	0.2051	ns			
DQB1*03:01	42	0.1469	116	0.2479	0.001	0.5	0.35	0.77
DQB1*02:01	29	0.1014	15	0.0321	0.0002	3.4	1.79	6.47
DQB1*02:02	25	0.0874	28	0.0598	ns			
DQB1*06:02	22	0.0769	17	0.0363	0.02	2.2	1.15	4.24
DQB1*05:01	21	0.0734	32	0.0684	ns			
DQB1*06:03	8	0.0280	7	0.0150	ns			
DQB1*03:19	4	0.0140	5	0.0107	ns			
DQB1*03:03	3	0.0105	10	0.0214	ns			
DQB1*03:04	2	0.0070	0	0.0000	ns			
DQB1*05:02	2	0.0070	3	0.0064	ns			
DQB1*05:03	2	0.0070	8	0.0171	ns			
DQB1*06:04	1	0.0035	10	0.0214	ns			
DQB1*06:09	1	0.0035	0	0.0000	ns			
Otros alelos	5							

Abreviaturas: ns: no significativo, FA: frecuencia alélica (las frecuencias se presentan como frecuencias relativas y pueden encontrarse entre valores de 0 a 1), IC 95%: Intervalo de confianza al 95%, OR: Odds ratio o riesgo relativo, Pc: Valor de p corregido, N: número total de individuos en el grupo, n: número de alelos.

Tabla 9. Frecuencias haplotípicas HLA-C/~B en pacientes con LEG y controles.

HLA-C/~B Haplotipos	LEG N=286			Controles N=468			Pc	OR	IC 95%
	n	FH	Δ'	n	FH	Δ'			
Africano									
C*02:10~B*15:03	5	0.0175	1.000	1	0.0021	0.4978	ns		
C*14:02~B*15:16	2	0.0070	1.000	1	0.0021	1.0000	ns		
C*04:01~B*53:01	1	0.0035	1.000	6	0.0128	1.0000	ns		
C*07:01~B*57:01	1	0.0035	0.438	3	0.0064	0.3960	ns		
C*16:01~B*51:01	1	0.0035	0.028	1	0.0021	0.0245	ns		
Amerindio									
C*07:02~B*39:05	26	0.0909	1.000	34	0.0726	0.8975	ns		
C*04:01~B*35:17	15	0.0524	1.000	17	0.0363	1.0000	ns		
C*04:01~B*35:12	13	0.0455	1.000	16	0.0342	0.8632	ns		
C*03:04~B*40:02	9	0.0315	0.892	11	0.0235	0.4196	ns		
C*07:02~B*39:06	8	0.0280	1.000	29	0.0620	0.8025	ns		
C*08:01~B*48:01	8	0.0280	0.884	15	0.0321	0.7376	ns		
C*01:02~B*15:01	3	0.0105	0.576	7	0.0150	0.6701	ns		
C*03:04~B*35:01	2	0.0070	0.037	1	0.0021	-0.4456	ns		
C*07:01~B*15:17	2	0.0070	1.000	3	0.0064	1.0000	ns		
C*03:04~B*40:05	1	0.0035	1.000	3	0.0064	0.5714	ns		
C*04:01~B*35:03	1	0.0035	1.000	4	0.0085	0.7538	ns		
C*08:01~B*51:02	1	0.0035	1.000	2	0.0043	1.0000	ns		
C*08:03~B*48:01	1	0.0035	1.000	3	0.0064	0.7387	ns		
C*07:02~B*39:01	3	0.0105	1.000	4	0.0085	0.7471	ns		
C*01:02~B*15:30	2	0.0070	1.000	8	0.0171	1.0000	ns		
Asiático									
C*03:02~B*58:01	2	0.0070	1.000	1	0.0021	0.4967	ns		
C*04:01~B*35:16	2	0.0070	1.000	3	0.0064	1.0000	ns		
C*03:03~B*35:01	1	0.0035	0.047	1	0.0021	0.0141	ns		
C*14:02~B*51:01	0	0.0000	0.735	3	0.0064	0.7339	ns		
Europeo									
C*07:01~B*08:01	19	0.0664	0.944	3	0.0064	1.0000	0.000006	11.0	3.23 37.62
C*07:02~B*07:02	11	0.0385	0.812	15	0.0321	0.7893	ns		
C*16:01~B*44:03	10	0.0350	0.825	8	0.0171	0.6571	ns		
C*05:01~B*18:01	4	0.0140	0.556	5	0.0107	0.6167	ns		
C*06:02~B*37:01	4	0.0140	1.000	3	0.0064	0.7339	ns		
C*04:01~B*44:03	3	0.0105	0.014	3	0.0064	0.0533	ns		
C*12:03~B*38:01	3	0.0105	0.745	6	0.0128	1.0000	ns		
C*05:01~B*44:02	2	0.0070	1.000	4	0.0085	0.7956	ns		
C*06:02~B*50:01	2	0.0070	1.000	4	0.0085	1.0000	ns		
C*12:03~B*18:01	2	0.0070	0.378	2	0.0043	0.2301	ns		
C*03:04~B*15:01	1	0.0035	0.139	2	0.0043	0.1427	ns		
C*06:02~B*57:01	1	0.0035	0.482	2	0.0043	0.2398	ns		
Europeo compartido con otras poblaciones									
C*04:01~B*35:01	15	0.0524	0.730	15	0.0321	0.4530	ns		
C*08:02~B*14:02	7	0.0245	1.000	11	0.0235	0.7219	ns		
C*15:02~B*51:01	7	0.0245	0.470	9	0.0192	1.0000	ns		
C*07:01~B*49:01	4	0.0140	1.000	6	0.0128	0.6477	ns		
C*08:02~B*14:01	3	0.0105	1.000	4	0.0085	1.0000	ns		
C*06:02~B*13:02	2	0.0070	1.000	5	0.0107	0.8226	ns		
C*12:02~B*52:01	2	0.0070	1.000	2	0.0043	1.0000	ns		
C*02:02~B*40:02	1	0.0035	0.482	1	0.0021	0.1212	ns		
C*07:01~B*41:01	1	0.0035	0.438	4	0.0085	0.7886	ns		
Origen Desconocido									
C*03:03~B*52:01	7	0.0245	0.742	6	0.0128	0.5876	ns		
C*01:02~B*15:15	6	0.0210	1.000	13	0.0278	0.8534	ns		
C*01:02~B*35:43	3	0.0105	1.000	9	0.0192	1.0000	ns		
C*04:01~B*35:14	3	0.0105	1.000	6	0.0128	1.0000	ns		
C*15:09~B*51:01	2	0.0070	1.000	9	0.0192	0.8065	ns		
C*03:03~B*15:01	1	0.0035	0.174	1	0.0021	0.0720	ns		
C*03:04~B*40:20	1	0.0035	1.000	1	0.0021	1.0000	ns		
C*04:01~B*35:08	1	0.0035	1.000	3	0.0064	1.0000	ns		
C*04:07~B*15:31	1	0.0035	1.000	2	0.0043	1.0000	ns		
C*08:01~B*51:01	1	0.0035	0.036	1	0.0021	-0.2468	ns		

Tabla 10. Frecuencias haplotípicas HLA-DRB1/~DQB1 en pacientes con LEG y controles.

HLA-DRB1/~DQB1	LEG N=286			Controles N=468			Pc	OR	IC 95%	
	n	FH	Δ'	n	FH	Δ'				
Africano										
DRB1*13:01~DQB1*05:01	5	0.0175	0.410	1	0.0021	0.0159	ns			
DRB1*08:04~DQB1*03:01	1	0.0035		2	0.0043	1.0000	ns			
DRB1*12:01~DQB1*05:01	1	0.0035	1.000	1	0.0021	0.4632	ns			
Amerindio										
DRB1*08:02~DRB1*04:02	52	0.1818	1.000	89	0.1902	0.9723	ns			
DRB1*04:07~DQB1*03:02	27	0.0944	1.000	53	0.1132	0.9518	ns			
DRB1*14:06~DQB1*03:01	12	0.0420	1.000	46	0.0983	0.9717	0.007	0.4	0.21	0.77
DRB1*16:02~DQB1*03:01	5	0.0175	1.000	30	0.0641	1.0000	0.006	0.3	0.10	0.68
DRB1*14:02~DQB1*03:01	4	0.0140	0.765	11	0.0235	1.0000	ns			
DRB1*04:11~DQB1*04:02	1	0.0035	0.818	1	0.0021	-0.4595	ns			
Asiático										
DRB1*11:02~DQB1*03:01	2	0.0070	0.412	3	0.0064	0.6674	ns			
DRB1*09:01~DQB1*03:03	1	0.0035	0.216	1	0.0021	1.0000	ns			
DRB1*13:02~DQB1*05:01	1	0.0035	0.279	1	0.0021	0.0338	ns			
Europeo										
DRB1*03:01~DQB1*02:01	29	0.1014	1.000	15	0.0321	1.0000	0.0002	3.4	1.79	6.47
DRB1*15:01~DQB1*06:02	18	0.0629	0.891	15	0.0321	0.8779	ns			
DRB1*11:04~DQB1*03:01	8	0.0280	0.765	8	0.0171	0.0171	ns			
DRB1*13:01~DQB1*06:03	6	0.0210	0.740	6	0.0128	1.0000	ns			
DRB1*04:01~DQB1*03:02	2	0.0070	0.576	3	0.0064	1.0000	ns			
DRB1*07:01~DQB1*03:03	2	0.0070	0.635	5	0.0107	0.4620	ns			
DRB1*11:01~DQB1*03:01	1	0.0035	1.000	2	0.0043	0.1130	ns			
DRB1*04:02~DQB1*03:02	4	0.0140	1.000	10	0.0214	1.0000	ns			
Europeo compartido con otras poblaciones										
DRB1*07:01~DQB1*02:02	22	0.0769	0.908	28	0.0598	1.0000	ns			
DRB1*04:04~DQB1*03:02	17	0.0594	1.000	29	0.0620	0.9144	ns			
DRB1*01:02~DQB1*05:01	12	0.0420	1.000	11	0.0235	1.0000	ns			
DRB1*13:03~DQB1*03:01	3	0.0105	0.529	3	0.0064	1.0000	ns			
DRB1*01:03~DQB1*05:01	2	0.0070	0.640	3	0.0064	1.0000	ns			
DRB1*04:05~DQB1*03:02	2	0.0070	0.576	1	0.0021	1.0000	ns			
DRB1*08:01~DQB1*04:02	2	0.0070	1.000	1	0.0021	1.0000	ns			
DRB1*11:02~DQB1*03:19	2	0.0070	0.493	1	0.0021	0.2419	ns			
DRB1*04:03~DQB1*03:02	1	0.0035	1.000	10	0.0214	1.0000	ns			
DRB1*12:02~DQB1*03:01	1	0.0035	1.000	3	0.0064	1.0000	ns			
DRB1*13:02~DQB1*06:04	1	0.0035	1.000	9	0.0192	0.8978	ns			
DRB1*13:05~DQB1*03:01	1	0.0035	1.000	1	0.0021	1.0000	ns			
DRB1*14:01~DQB1*05:03	1	0.0035	1.000	8	0.0171	1.0000	ns			
DRB1*16:01~DQB1*05:02	1	0.0035	1.000	1	0.0021	0.4968	ns			

Abreviaturas: ns: no significativo, FH frecuencia haplotípica, IC 95%: Intervalo de confianza al 95%, OR: Odds ratio o riesgo relativo, Pc: Valor de p corregido, N: número total de individuos en el grupo, n: número de alelos.

Tabla 11 . Frecuencias haplotípicas HLA-C/~B/~DRB1/~DQB1 en pacientes con LEG y controles.

HLA-C~B~DRB1~DQB1	LEG N=286			Healthy Controles N=468			Pc	OR	IC %95
	n	HF	Δ'	n	HF	Δ'			
Amerindio									
C*07:02~B*39:05~DRB1*04:07~DQB1*03:02	16	0.0559	0.663	19	0.0406	0.502	ns		
C*04:01~B*35:12~DRB1*08:02~DQB1*04:02	10	0.0350	0.717	7	0.0150	0.305	ns		
C*04:01~B*35:17~DRB1*08:02~DQB1*04:02	10	0.0350	0.591	14	0.0299	0.726	ns		
C*01:02~B*15:15~DRB1*08:02~DQB1*04:02	5	0.0175	0.795	8	0.0171	0.525	ns		
C*03:03~B*52:01~DRB1*14:06~DQB1*03:01	5	0.0175	0.826	3	0.0064	0.446	ns		
C*07:02~B*39:06~DRB1*14:06~DQB1*03:01	4	0.0140	0.478	16	0.0342	0.548	ns		
C*03:04~B*40:02~DRB1*08:02~DQB1*04:02	3	0.0105	0.181	2	0.0043	-0.044	ns		
C*01:02~B*15:30~DRB1*08:02~DQB1*04:02	2	0.0070	1.000	4	0.0085	0.383	ns		
C*08:01~B*48:01~DRB1*08:02~DQB1*04:02	2	0.0070	1.000	8	0.0171	1.000	ns		
C*01:02~B*15:01~DRB1*16:02~DQB1*03:01	1	0.0035	0.321	2	0.0043	0.237	ns		
C*01:02~B*35:43~DRB1*08:02~DQB1*04:02	1	0.0035	0.181	2	0.0043	0.040	ns		
C*07:02~B*39:01~DRB1*08:02~DQB1*04:02	1	0.0035	0.181	2	0.0043	0.383	ns		
C*15:02~B*51:01~DRB1*08:02~DQB1*04:02	1	0.0035	1.000	4	0.0085	0.314	ns		
Europeo									
C*07:01~B*08:01~DRB1*03:01~DQB1*02:01	17	0.0594	0.883	2	0.0043	1.000	0.00001	14.7	3.38 64.23
C*16:01~B*44:03~DRB1*07:01~DQB1*02:02	9	0.0315	0.891	6	0.0128	0.734	ns		
C*07:02~B*07:02~DRB1*15:01~DQB1*06:02	6	0.0210	0.514	7	0.0150	0.448	ns		
C*05:01~B*18:01~DRB1*03:01~DQB1*02:01	4	0.0140	1.000	3	0.0064	0.587	ns		
C*08:02~B*14:02~DRB1*01:02~DQB1*05:01	4	0.0140	1.000	5	0.0107	0.441	ns		
C*05:01~B*44:02~DRB1*04:02~DQB1*03:02	2	0.0070	1.000	2	0.0043	0.489	ns		
C*06:02~B*13:02~DRB1*07:01~DQB1*02:02	2	0.0070	1.000	4	0.0085	0.787	ns		
C*07:01~B*57:01~DRB1*07:01~DQB1*03:03	1	0.0035	1.000	3	0.0064	1.000	ns		
Europeo compartido con otras poblaciones									
C*04:01~B*35:01~DRB1*04:04~DQB1*03:02	2	0.0070	0.077	3	0.0064	0.147	ns		
C*03:03~B*52:01~DRB1*08:02~DQB1*04:02	1	0.0035	~0.103	2	0.0043	0.176	ns		
C*06:02~B*50:01~DRB1*03:01~DQB1*02:01	1	0.0035	0.442	2	0.0043	0.483	ns		
C*08:02~B*14:01~DRB1*07:01~DQB1*02:02	1	0.0035	0.276	3	0.0064	0.734	ns		
C*08:02~B*14:02~DRB1*03:01~DQB1*02:01	1	0.0035	0.044	2	0.0043	0.155	ns		
Origen desconocido									
C*04:01~B*35:01~DRB1*08:02~DQB1*04:02	4	0.0140	0.099	3	0.0064	0.012	ns		
C*07:02~B*39:05~DRB1*08:02~DQB1*04:02	4	0.0140	~0.064	5	0.0107	-0.227	ns		
C*08:01~B*48:01~DRB1*04:04~DQB1*03:02	3	0.0105	0.335	3	0.0064	0.147	ns		
C*04:01~B*35:14~DRB1*16:02~DQB1*03:01	2	0.0070	0.661	4	0.0085	0.644	ns		
C*07:02~B*39:06~DRB1*04:07~DQB1*03:02	2	0.0070	0.170	4	0.0085	0.039	ns		
C*01:02~B*15:01~DRB1*08:02~DQB1*04:02	1	0.0035	0.181	3	0.0064	0.294	ns		
C*06:02~B*37:01~DRB1*01:03~DQB1*05:01	1	0.0035	0.493	2	0.0043	0.665	ns		

Tabla 12. Frecuencias de haplotipos HLA~A/~C/~B/~DRB1/~DQB1 en pacientes con LEG y controles.

HLA~A/~C/~B/~DRB1/~DQB1	LEG N=286			Controles N=468			Pc	OR	IC 95%	
	n	FH	Δ'	n	FH	Δ'				
Amerindio										
A*02:01~C*04:01~B*35:12~DRB1*08:02~DQB1*04:02	6	0.0210	0.493	4	0.0085	0.444	ns			
A*68:03~C*07:02~B*39:05~DRB1*04:07~DQB1*03:02	5	0.0175	0.380	5	0.0107	0.283	ns			
A*02:06~C*07:02~B*39:05~DRB1*04:07~DQB1*03:02	4	0.0140	0.203	5	0.0107	0.185	ns			
A*02:01~C*01:02~B*15:15~DRB1*08:02~DQB1*04:02	3	0.0105	0.239	3	0.0064	0.190	ns			
A*02:01~C*04:01~B*35:17~DRB1*08:02~DQB1*04:02	2	0.0070	0.013	7	0.0150	0.352	ns			
A*02:06~C*04:01~B*35:17~DRB1*08:02~DQB1*04:02	2	0.0070	0.174	2	0.0043	0.517	ns			
A*24:02~C*04:01~B*35:12~DRB1*08:02~DQB1*04:02	2	0.0070	0.059	2	0.0043	0.141	ns			
A*24:02~C*07:02~B*39:06~DRB1*14:06~DQB1*03:01	2	0.0070	0.412	12	0.0256	0.699	ns			
A*31:01~C*04:01~B*35:17~DRB1*08:02~DQB1*04:02	2	0.0070	0.161	2	0.0043	0.069	ns			
A*68:01~C*01:02~B*15:15~DRB1*08:02~DQB1*04:02	2	0.0070	0.368	3	0.0064	0.321	ns			
A*02:01~C*08:01~B*48:01~DRB1*08:02~DQB1*04:02	1	0.0035	0.366	3	0.0064	0.190	ns			
Europeo										
A*01:01~C*07:01~B*08:01~DRB1*03:01~DQB1*02:01	11	0.0385	0.656	1	0.0021	0.481	0.0004	18.7	2.40	145.48
A*29:02~C*16:01~B*44:03~DRB1*07:01~DQB1*02:02	8	0.0280	0.884	2	0.0043	0.316	0.02	6.7	1.41	31.80
A*02:01~C*07:02~B*07:02~DRB1*15:01~DQB1*06:02	3	0.0105	0.366	4	0.0085	0.444	ns			
A*30:02~C*05:01~B*18:01~DRB1*03:01~DQB1*02:01	3	0.0105	0.742	3	0.0064	1.000	ns			
A*02:01~C*16:01~B*44:03~DRB1*07:01~DQB1*02:02	1	0.0035	-0.475	2	0.0043	0.135	ns			
Origen desconocido										
A*02:01~C*03:03~B*52:01~DRB1*14:06~DQB1*03:01	4	0.0140	0.746	2	0.0043	0.568	ns			
A*02:01~C*07:02~B*39:05~DRB1*04:07~DQB1*03:02	3	0.0105	-0.114	6	0.0128	0.113	ns			
A*02:01~C*01:02~B*15:30~DRB1*08:02~DQB1*04:02	2	0.0070	1.000	3	0.0064	0.676	ns			
A*02:01~C*01:02~B*35:43~DRB1*08:02~DQB1*04:02	1	0.0035	1.000	2	0.0043	1.000	ns			
A*02:01~C*04:01~B*35:01~DRB1*08:02~DQB1*04:02	1	0.0035	0.049	2	0.0043	0.568	ns			
A*24:02~C*07:02~B*39:06~DRB1*04:07~DQB1*03:02	1	0.0035	0.412	2	0.0043	0.399	ns			
A*30:01~C*06:02~B*13:02~DRB1*07:01~DQB1*02:02	1	0.0035	0.494	4	0.0085	1.000	ns			
A*68:01~C*07:02~B*39:01~DRB1*08:02~DQB1*04:02	1	0.0035	1.000	2	0.0043	1.000	ns			

VII. DISCUSIÓN

La secuenciación de HLA ha llevado tanto a identificar un nuevo bloque de susceptibilidad HLA-A*29:02~C*16:01~B*44:03~DRB1*07:01~DQB1*02:02, como a determinar la firma de mestizaje que distingue a pacientes con LEG e individuos sanos en la Ciudad de México.

El haplotipo extendido conservado asociado por primera vez al desarrollo de LEG en individuos mexicanos HLA-A*29:02~C*16:01~B*44:03~DRB1*07:01~DQB1*02:02; este haplotipo ha sido catalogado en estudios previos como europeo⁵⁸, y solo el alelo aislado HLA-DRB1*07 se ha asociado previamente con el síndrome de anticuerpos antifosfolípido en pacientes con LEG de la Ciudad de México³⁷. Sin embargo, este haplotipo extendido conservado ha sido un factor de riesgo en pacientes mexicanos diagnosticados con acalasia⁵⁷. Esta afección es un trastorno de la motilidad del esófago con anomalías en las neuronas que controlan los movimientos peristálticos, cuya causa subyacente se desconoce. En particular, estudios previos realizados en otras poblaciones sugirieron que los pacientes con acalasia tienen una mayor frecuencia de alelos HLA-DRB1*15 y -DQB1 (inserción de ocho aminoácidos en la cola citoplásmica de HLA-DQβ1) de una manera étnica específica. Este hecho propone un mecanismo inmunogenético^{59,60}. Sin embargo, en este estudio, ningún paciente con LEG portador de este haplotipo mostró alguna sintomatología de acalasia. Probablemente, el tratamiento inmunosupresor podría enmascarar los síntomas de la acalasia o prevenir el desarrollo en individuos predispuestos, tal presunción está basada en que los individuos reportados con ambas enfermedades desarrollan primero acalasia y posteriormente LEG, casos contrarios no se encontraron en la literatura⁶¹. Una razón congruente podría ser que la edad promedio de aparición de acalasia en mexicanos (42.3 ± 15.8 años), es levemente superior al LEG (26.5 ± 12.2 años). Los datos obtenidos necesitan más investigación porque la susceptibilidad compartida conferida por este haplotipo podría significar un mecanismo inmunopatológico compartido según el origen étnico. La aparición de lupus o acalasia podría depender de los desencadenantes, que pueden diferir para cada afección.

El origen étnico y el mestizaje influyen en el desarrollo del LEG y la autoinmunidad en los mexicanos. Esta suposición se introdujo porque el haplotipo HLA-B8-DR3 se encuentra en altas frecuencias en la población europea y tiene una prevalencia considerablemente alta en pacientes con LEG y otras enfermedades autoinmunes como diabetes mellitus tipo I, enfermedad celíaca, miastenia gravis^{58,62-}
⁶⁵En contraste, las poblaciones de nativos americanos mexicanos carecen tanto del haplotipo HLA-B8-DR3 como de casos de LEG. Por tanto, la presencia de HLA-B8-DR3 y su haplotipo extendido en pacientes mexicanos con LEG se ha explicado como producto de los alelos y haplotipos introducidos durante la llegada de los españoles a las Américas. Curiosamente, el LEG es más frecuente y agresivo en los mexicanos que en los europeos. Dado que el origen de los alelos de susceptibilidad es europeo, se esperaría que la gravedad de la enfermedad y los fenotipos fueran similares. Sin embargo, muchos elementos pueden intervenir para generar un escenario único en México. Por ejemplo, la interacción específica de genes de poblaciones amerindias, europeas y de otras poblaciones influidas por la arquitectura y la disposición tridimensional de los genes en cada población mestizada. No menos importante, la presión ejercida por los desencadenantes locales y el medio ambiente.

Otro hecho que contribuye a la tesis de que el mestizaje influye en la susceptibilidad/protección a desarrollar LEG en mexicanos es que dicha susceptibilidad varía a medida que lo hace el patrón de mestizaje. Diferentes estudios en pacientes con LEG de diversos Estados de México permiten tener evidencia para respaldar esta afirmación. Los pacientes con LEG mestizos en Guadalajara tienen el haplotipo HLA-DRB1*15~DQA1*01:02~DQB1*06:02 como factor de susceptibilidad. Aun así, ni el HLA-DRB1*03:01 ni ningún haplotipo que contenga este alelo se ha identificado como factor de riesgo en esta población⁶⁶. Pacientes con LEG en Tapachula, Chiapas, no portan el HLA-DRB1*03:01 como alelo de susceptibilidad, y más bien se ha identificado como factor de riesgo el HLA-DR2 (HLA-DRB1*15 y -DRB1*16)¹⁵. De manera congruente, los estudios de genética de poblaciones en estas localidades han demostrado de manera contundente la variabilidad del mestizaje. Las proporciones de mestizaje de

individuos mestizos de Guadalajara son las siguientes: nativo americano mexicano ~44%, europeo ~48% y africano ~8% ⁶⁷. En comparación, en los individuos de la Ciudad de México, las proporciones son nativo americano mexicano ~64%, europeo ~28% y africano ~8% ¹⁷. En los individuos de Tapachula, Chiapas, la representación del mestizaje es nativo americano mexicano ~ 72%, europeo ~ 26% y africano ~ 2% ¹⁶.

El hecho de que encontremos algunos hechos que apoyan que la variabilidad de la susceptibilidad al LEG en México varía tanto como el mestizaje nos lleva a preguntarnos si los pacientes con LEG tienen una carga étnica diferente en comparación con los individuos sanos de la misma región. En efecto, los análisis de mestizaje revelaron una diferencia en la proporción de mestizaje entre los grupos. Los pacientes con LEG tienen una representación Europea más alta que los individuos sanos, los cuales tienen más carga de Nativa. Esta diferencia en las proporciones de ancestría presentada por los pacientes con LEG podría aumentar la probabilidad de portar un haplotipo de susceptibilidad y disminuir las probabilidades de portar haplotipos de protección. Teniendo en cuenta que los haplotipos de susceptibilidad identificados en este grupo son europeos, y los de protección son de origen local.

Adicionalmente, los datos de distancia de Nei son congruentes con la información proporcionada por los haplotipos de susceptibilidad y protección y el análisis de mestizaje. Se encontró que el grupo LEG está más cerca de las poblaciones parentales no autóctonas (europea, africana y asiática) que los individuos sanos. En contraste, los individuos sanos están más cerca de todas las poblaciones Nativas Americanas Mexicanas evaluadas (mixtecos, zapotecos, tarahumaras, lacandones, mixe y seri). Como se esperaba para el análisis intra-especie para la misma área geográfica, la variabilidad de la distancia genética es baja, pero las diferencias son consistentes. Las diferencias promedio corregidas por pares confirmaron la información obtenida con las distancias de Nei.

Finalmente, el haplotipo extendido conservado descrito como un factor de susceptibilidad en europeos, HLA-A*01:01~C*07:01~B*08:01~DRB1*03:01~DQB1*02:01 se ha encontrado como un factor de riesgo para desarrollar LEG en individuos de la Ciudad de México. Este haplotipo tiene una

poderosa influencia en el desarrollo del LEG y otras enfermedades autoinmunes en individuos mestizos mexicanos de la Ciudad de México. A primera vista, el riesgo relativo de este haplotipo parece tener un efecto sumativo de los alelos que lo componen; a medida que se agregan más alelos HLA al haplotipo, aumenta el riesgo. Sin embargo, el riesgo relativo conferido solo por HLA-B*08:01, HLA-DRB1*03:01 y los haplotipos que los contienen confirma que el riesgo no es sumativo, sino que lo confieren los genes en desequilibrio de ligamiento con estas variantes. Además, este vínculo se ha vuelto más complicado durante el curso de investigación de HLA. Al principio del estudio de HLA se describió un fuerte desequilibrio de ligamiento no solo entre los genes HLA del haplotipo HLA-B8-DR3 sino entre HLA y el complemento (C2, C4a, C4b y Factor B)⁶⁸⁻⁷⁰. Actualmente, se sabe que un número considerable de variantes, principalmente de MHC clase tres, se encuentran en desequilibrio de ligamiento con las variantes de HLA-B y -DR indicadas anteriormente, que aumentan la carga genética del individuo con lupus.

Se han desarrollado modelos para confirmar la susceptibilidad conferida por genes en la región MHC III (genes HLA no clásicos y no HLA) ligados a HLA-B y -DRB1. Los genes ligados más importantes que utilizan HLA-DRB1*03:01 como covariante son: el protooncogén Notch homólogo 4 (*NOTCH4*), la secuencia A y B relacionada con el polipéptido MHC de clase I (*MIC-A* y *MIC-B*), la 21-hidroxilasa (*CYP21A2*)^{71,72}, las tres proteínas de choque térmico (*HSPA1A*, *HSPA1B*, *HSPA1L*)⁷³, el receptor 3 desencadenante de citotoxicidad natural (*NCR3*); el potenciador del gen de la cadena ligera kappa del factor nuclear en linfocitos B tipo inhibidor 1 (*NFKBIL1*), factor inflamatorio de aloinjerto 1 (*AIF1*)⁷⁴; y los tres genes del factor de necrosis tumoral (Linfotoxina-beta, Linfotoxina-alfa y *TNF-α*)^{75,76}. Se han estudiado a fondo variantes importantes de los genes mencionados anteriormente en Europeos, y se ha confirmado el desequilibrio de ligamiento con HLA-B*08:01 y -DRB1*03:01⁷⁴. Este tipo de estudio es una perspectiva para realizar en la población mexicana para determinar la integridad de los bloques de MHC conservados en mestizos mexicanos y cómo se podrían haber arreglado o descartado las variantes, dando las características específicas del LEG en mexicanos. Estos datos se encuentran publicados. [Anexo 6](#) (Pág. 104).

Finalmente, es necesario mencionar tanto los alcances como las limitaciones puntuales de este estudio. Dentro de los alcances se ha logrado y se puede seguir desarrollando la determinación de alelos de susceptibilidad o protección propios de las población. Además de describir alelos o haplotipos asociados que proyectan parte de la huella local de detonantes de LEG. La determinación de la ancestría de los sujetos caso ha permitido determinar la exclusividad de un alelo de susceptibilidad a una población determinada y esto permitirá orientar la búsqueda misma de detonantes locales.

En cuanto a las limitantes de este estudio. Una de ellas es el uso de datos no convencionales (HLA) para el cálculo de ancestría, ya que hay metodologías diseñadas para este propósito como estudios de genoma completo con enfoque poblacional y STRs. Estos enfoques incluyen determinaciones distribuidas en todo el genoma, mientras que el HLA muestra un segmento específico del cromosoma 6.

Además, el hecho de utilizar el HLA para el cálculo de ancestría puede redundar en remarcar la ancestría de alelos de ventaja de alta frecuencia en la población parental y de susceptibilidad en la población mestizada. Aunque este factor puede tornarse una ventaja ya que el uso del HLA para encontrar susceptibilidad y ancestría al mismo tiempo puede focalizar aún más el origen de las variantes de susceptibilidad. Por otro lado, el coste económico de las tipificaciones de HLA es una verdadera limitante, sin embargo, las asociaciones de SNP no transmiten la relevancia inmunobiológica que tienen los alelos HLA específicos e incluso se vuelve más informativo cuando se incluyen haplotipos extendidos y desequilibrios de ligamiento, esto permite obtener información incluso de genes no tipificados.

VIII. CONCLUSIONES

En conclusión, el trasfondo genético y la heterogeneidad del mestizaje mexicano definen parte de la dinámica del LEG en pacientes mestizos mexicanos. Considerar la distribución regional de la susceptibilidad genética y las barreras étnicas puede ser una herramienta biomédica útil.

Cada vez más, el mestizaje y la etnia se considera un elemento que apoya el diagnóstico de enfermedades. Tal es el caso de la Neuromielitis óptica y la Esclerosis múltiple, que pueden ser clínicamente similares, pero tienen una susceptibilidad genética y diferencias étnicas bien establecidas. En México, la susceptibilidad a la neuromielitis óptica viene dada por HLA-DRB1*16, y por lo general ocurre en individuos con ancestría predominantemente mexicana amerindia^{77,78}. Pero en la esclerosis múltiple, la susceptibilidad viene dada principalmente por HLA-DRB1*15, y ocurre en individuos con predominancia europea⁷⁹⁻⁸¹. Otros buenos ejemplos incluyen la psoriasis⁸² y la hiperplasia epitelial focal^{83,84}, que dependen de la susceptibilidad genética y se expresan en poblaciones específicas con alto componente amerindio-mexicano. Por otro lado, el aspecto técnico de este tipo de estudios es importante. El estudio de secuenciación de HLA ayuda a describir el origen étnico y la carga de mestizaje en las poblaciones, y profundiza los alelos y haplotipos de susceptibilidad y protección debido al rendimiento de alta resolución. Finalmente, las variantes no HLA en el área MHC contribuyen al riesgo a través del desequilibrio de ligamiento con genes HLA. Por lo tanto, los haplotipos extendidos conservados ayudan a explicar la susceptibilidad en grupos étnicamente definidos. Sin embargo, la vinculación de variantes con HLA requiere un análisis más profundo para saber cómo agregan riesgo a los haplotipos extendidos y las variantes específicas conservadas en la población mexicana.

Repetidamente los estudios de asociación de genoma completo han identificado la región del MHC en las patologías inmunitarias, por lo que la interpretación inmunobiológica centrándose en el HLA se vuelve más específica y altamente informativa. Además, la aproximación de la ancestría de casos y controles con HLA pone bajo la lupa los alelos y haplotipos de susceptibilidad y su origen poblacional; de forma interesante, el estudio de ancestría con HLA expone alelos y haplotipos que no generan susceptibilidad en sus poblaciones parentales, pero sí en poblaciones mestizadas que los han adquirido. Esta “adquisición de susceptibilidad”, pone de manifiesto el protagonismo de los detonantes presentes en el entorno nuevo , donde los alelos reconocen un espectro nuevo de secuencias de aminoácidos que pueden resultar en una activación aberrante del sistema inmunitario. Por lo que encontrar los alelos de susceptibilidad étnico-específicos permitirá proyectar la búsqueda de detonantes. Esto abrirá una vía preventiva para los individuos susceptibles.

Por otro lado, el hecho de encontrar susceptibilidad étnico-dependiente puede resultar de utilidad en el diagnóstico médico especialmente en casos complicados que retrasan el tratamiento. Para esto deben desarrollarse estrategias nuevas para que el HLA se vuelva una herramienta más asequible y fácil de interpretar por el médico facultativo.

SEGUNDA PARTE: POLIMORFISMOS DE RECEPTORES FC GAMMA

I. INTRODUCCIÓN

El LEG se caracteriza por un proceso inflamatorio crónico y daño en diferentes órganos y sistemas debido, principalmente, al depósito de complejos inmunitarios y activación del sistema de complemento; transcurre en más de la mitad de los casos afectando un órgano principal. En pacientes mexicanos el lupus es diverso, sin embargo, uno de los sistemas más afectados es el renal, y los hispanos, entre ellos los mestizos mexicanos son de los grupos más afectados a nivel mundial⁸⁵⁻⁸⁷, por lo cual, es necesario incorporar estudios que definan las particularidades de esta manifestación en el lupus del mexicano.

Las evidencias encontradas en biopsias de pacientes con nefropatía lúpica muestran acumulación de complejos inmunitarios e infiltrados de neutrófilos. Este fenómeno, podría implicar la participación de la inmunidad innata en el daño renal y daño orgánico en general. Inmunológicamente hay una cadena de elementos celulares y humorales que participan en la depuración efectiva de complejos inmunitarios, parte de ellos son los receptores para la fracción Fc de la inmunoglobulina G, los cuales tienen la capacidad de unir complejos inmunitarios para activar funciones celulares como la fagocitosis, degranulación, NETosis y citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Estos receptores se expresan en neutrófilos, macrófagos, linfocitos B y plaquetas entre otros. Por lo que la afectación de la función de estos receptores a causa de variantes nucleotídicas puede implicar cambios funcionales importantes que afecten la función de estas células y su actividad a nivel orgánico. Por lo que el objetivo de este trabajo es tipificar las variantes de los receptores Fc gamma I, II y III en pacientes con lupus eritematoso generalizado y en individuos sanos, para conocer las frecuencias de estas variantes y su implicación en el desarrollo de LEG y/o sus fenotipos clínicos particulares.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Determinar los polimorfismos de los receptores FcγRIIa (*rs1801274*) y FcγRIIIb (*rs200688856*, *rs527909462*, *rs448740*, *rs5030738*, *rs147574249*, *rs2290834*) en pacientes con lupus eritematoso generalizado y controles.

2.2. Objetivos Específicos

1. Tipificar la variante del receptor FcγRIIa (*rs1801274*) por PCR tiempo real en pacientes con LEG y controles sanos.
2. Tipificar las variantes del exón 3 del receptor FcγRIIIb por secuenciación capilar en pacientes con LEG y controles sanos.
3. Identificar las variantes de FcγRIIa y FcγRIIIb asociadas a LEG o fenotipos específicos de LEG.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Receptores Fc gamma

Los receptores para la fracción constante de inmunoglobulina G (FcγR) se expresan ampliamente en las células del sistema inmunológico. La unión de inmunocomplejos de IgG a FcγRs desencadena diversas respuestas celulares como fagocitosis, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, NETosis, degranulación y liberación de citocinas, por lo que los FcγR juegan un papel importante en la resistencia del hospedero, y vinculan la inmunidad innata y adaptativa. La capacidad de FcγRs para unirse al fragmento Fc de la IgG permite a las células responder a todos los antígenos opsonizados con IgG. Sin embargo, estos receptores tienen variantes asociadas con la susceptibilidad y el desarrollo de enfermedades autoinmunes como el LEG y/o la nefritis lúpica. Las variantes con eficacia variable para unir complejos inmunitarios aportan sentido y significado al papel de los autoanticuerpos y la depuración de complejos inmunitarios afectada en LEG y nefritis lúpica.

3.1.1. Organización genómica de los genes Fc gamma

Los receptores Fc humanos para IgG (FcγR) constituyen una familia de receptores, localizados genómicamente en el brazo largo del cromosoma 1, en la banda 1.21 a la 1.23⁸⁸⁻⁹². Como se muestra en la [Figura 18](#).

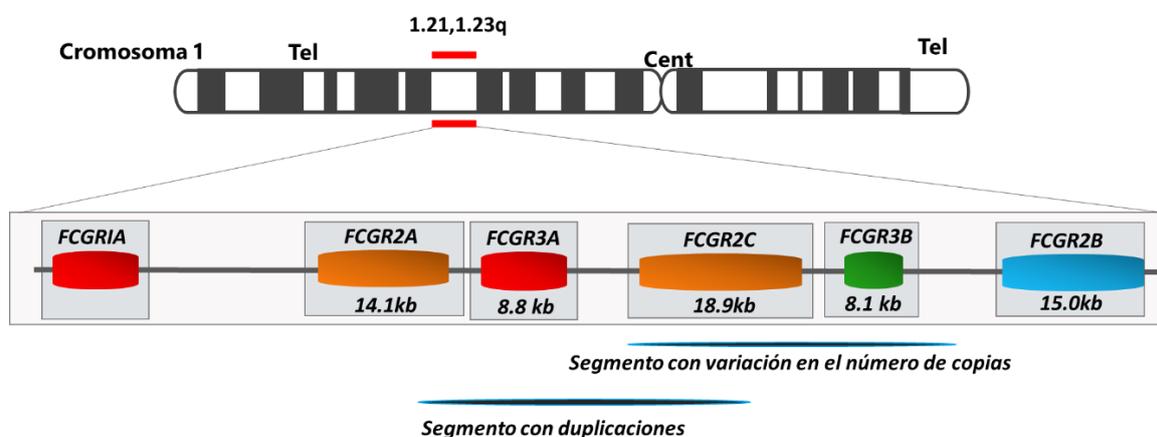


Figura 18. Organización genómica de los receptores Fc gamma. Modificado de⁹³: Li X, et al. Fcgamma receptors: structure, function and role as genetic risk factors in SLE. Genes Immun. 2009 Jul;10(5):380-9. doi: 10.1038/gene.2009.35.

3.1.2. Receptores Fc gamma Clasificación y Funciones

Los FcγR son miembros de la superfamilia de genes de tipo inmunoglobulina; estos receptores se pueden distinguir en función del tamaño, la afinidad por el ligando, la estructura primaria y la especificidad del ligando^{94,95}.

Los FcγR de tipo I generalmente se clasifican como activadores o inhibidores, dependiendo de las propiedades de señalización de sus dominios intracelulares. Los FcγRs activadores incluyen FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32a), FcγRIIc (CD32c) y FcγRIIIa (CD16a), se asocian a segmentos activadores del inmunorreceptor de tirosina (ITAM por sus siglas en inglés)^{96,97}. Por el contrario, FcγRIIb (CD32b) es el único receptor inhibidor, mediando la actividad de señalización a través de un segmento inhibidor del inmunorreceptor de tirosina (ITIM por sus siglas en Inglés)⁹⁸. Por otro lado, FcγRIIIb (CD16b) se expresa como una proteína anclada a la membrana plasmática mediante glicosil fosfatidil Inositol (GPI), por lo que CD16b es incapaz de transducir señales⁹⁹; debido a eso, necesita asociarse con moléculas activadoras para desplegar una respuesta funcional.

La afinidad es otro criterio de clasificación amplio; FcγRI (CD64) es el único FcγR que puede activarse tras unirse a IgG monomérica con alta afinidad de unión¹⁰⁰. Todos los demás FcγR exhiben baja afinidad por IgG, pero alta por los complejos inmunitarios de IgG multiméricos¹⁰¹.

El análisis de las secuencias de FcγRI, FcγRII y FcγRIII han demostrado que están estructuralmente relacionados y que contienen regiones de unión conservadas^{91,94,102-108}.

FcγRI (CD64)

FcγRI es una glicoproteína transmembrana tipo 1 de ~70-kDa^{102,109}. FcγRI es estructuralmente distinto, conteniendo una región extracelular Ig-interactiva de tres dominios extracelulares tipo inmunoglobulina, en contraste con los dos dominios de los receptores de baja afinidad FcγRII y FcγRIII. El tercer dominio extracelular es diferente, mientras que los dos primeros dominios son homólogos a los dominios extracelulares de FcγRII y FcγRIII. Las características únicas de unión a IgG de FcγRI son

conferidas por el dominio tres. Aunque el dominio 3 no es esencial para la unión a Fc, determina la interacción específica de alta afinidad de FcγRI con IgG2a¹¹⁰. La interacción entre los dominios 2 y 3 de FcγRI, con el dominio 1, juega un papel de apoyo en el mantenimiento de la estabilidad conformacional del receptor, que es el requisito estructural primario para conferir las características únicas de unión a Ig de FcγRI^{111,112}. FcγRI se expresa constitutivamente en monocitos y macrófagos. La expresión inducible se ha documentado en neutrófilos activados, mastocitos y basófilos^{31-33, 113-115}.

FcγRII (CD32)

Las isoformas de FcγRII: FcγRIIa y FcγRIIb son glicoproteínas transmembrana tipo 1 de ~ 40 kDa. Los dominios extracelular y transmembrana están altamente conservados, ambas isoformas muestran dominios de unión a ligandos casi idénticos, sin embargo, sus regiones intracitoplasmáticas difieren, mientras que FcγRIIa contiene ITAM, FcγRIIb contiene ITIM dando un resultado funcional antagonista¹¹⁶.

FcγRIIa (CD32a) es probablemente exclusivo de los primates superiores, el más expresado en las células del sistema inmunitario¹¹⁷, y el principal FcγR fagocítico en los seres humanos. Se expresa constitutivamente en monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células dendríticas y plaquetas. Exhibe una forma soluble secretada por células de Langerhans, plaquetas y líneas celulares megacariocíticas, la cual se produce por *splicing* alternativo de la región transmembrana¹¹⁸. En células de Langerhans, el RNA mensajero de FcγRIIa carece de la región codificante transmembrana¹¹⁹.

Las variantes de un solo nucleótido que afectan la unión al ligando se han estudiado profundamente para FcγRIIa. El ejemplo más estudiado es el cambio de His131Arg. Los individuos homocigotos para Arginina son más susceptibles a infecciones bacterianas y enfermedades autoinmunes que los individuos homocigotos y heterocigotos de Histidina²¹. Los estudios de unión han mostrado que el

alelo para Arginina tiene una unión significativamente menor a los subtipos IgG2, IgG1 e IgG3¹²⁰. Encontrándose diferencias a nivel de la bisagra¹¹⁷.

FcγRIIb (CD32b) es el único FcγR inhibidor¹²¹, se expresa en linfocitos B, macrófagos, células dendríticas y granulocitos. Estudios recientes han identificado este receptor en una subpoblación de linfocitos T efectoros CD8+¹²².

El papel inhibitorio de FcγRIIb antagoniza directamente la activación de FcγRs; por lo tanto, equilibra el resultado celular, atenuando la señalización de activación¹²². Además, se entrecruza con el receptor de linfocitos B, dando forma al repertorio de linfocitos B e induciendo apoptosis en células plasmáticas autorreactivas. Su señalización controla los niveles de anticuerpos, involucrando un bucle de regulación de su propia expresión en subpoblaciones de linfocitos B. The FcγRIIb funciona independientemente del receptor de linfocitos B para eliminar las células efectoras secretoras de anticuerpos e inhibir la proliferación de linfocitos B *naive* sin comprometer los linfocitos B de memoria específicas de antígeno de larga duración¹²³. FcγRIIb media la inhibición independiente del antígeno en linfocitos B humanos¹²⁴.

Hay varios polimorfismos descritos para FcγRIIb. Las variantes más importantes afectan su capacidad inhibitoria. Las más estudiadas son variantes en el dominio transmembrana como FcγRIIb Ile187Thr y Ile232Thr. Se sabe que Thr187 induce exclusión de las balsas lipídicas y tiene menos potencial inhibitorio con la señalización del BCR¹²⁵⁻¹²⁷. Asimismo, la variante Thr232 disminuye la afinidad a las balsas lipídicas (Esto evita la interacción de FcγRIIb con receptores que contienen ITAM, receptores FcγR activadores y el BCR) y también atenúa los efectos inhibitorios sobre la señalización del receptor de linfocitos B¹²⁸.

Adicionalmente, el haplotipo -386C/-120A (conocido como 2B.4) en el promotor confiere una mayor transcripción del receptor, y paradójicamente se ha asociado con susceptibilidad a LEG en europeos¹²⁹⁻¹³¹, pero al mismo tiempo confiere protección contra el desarrollo de nefritis lúpica. El 2B.4 permite

la expresión de *Novo* de FcγRIIb en neutrófilos y monocitos¹³². La importancia de este receptor es tal que se generan modelos de ratones similares al lupus con FcγRIIb knock-out¹³³.

FcγRIII (CD16)

Existen dos isoformas funcionales del receptor FcγRIII. El FcγRIII humano (CD16) es heterogéneo en tamaño con un peso molecular que oscila entre 50 y 80 kDa¹³⁴⁻¹³⁶. Esta heterogeneidad se debe a la extensa glicosilación de las dos isoformas, FcγRIIIa y FcγRIIIb¹⁰². Un único cambio de aminoácido determina las diferencias de dominio intracelular entre las isoformas FcγRIIIa y FcγRIIIb. FcγRIIIb Se203, especifica una molécula ligada a la membrana a través de glicosil-fosfatidilinositol (GPI). En contraste, FcγRIIIa Phe203 interrumpe la señal para formar el anclaje GPI, preservando la porción transmembrana y la cola intracitoplasmática y produciendo una molécula transmembrana. Ambos son receptores activadores y tienen diferentes requisitos de asociación para mostrar una señalización efectiva¹⁰².

FcγRIIIa (CD16a) se expresa convenientemente en células NK, su señalización induce citotoxicidad dependiente de anticuerpos. También se expresa en macrófagos y mastocitos siendo una forma soluble diferente a la proteína de membrana expresada en células NKs y macrófagos^{137,138}.

Las variantes más importantes de FcγRIIIa están relacionadas con el desarrollo de enfermedades autoinmunes. La variante más conocida es Phe158Val, este cambio afecta la afinidad del receptor. Para Phe176Val, la afinidad de unión a IgG1, IgG3, IgG4 está disminuida. La variante menos eficiente se ha asociado con la progresión y etapas finales de la afectación renal en pacientes con LEG ya que afecta la depuración eficiente de complejos inmunitarios, los depósitos encontrados en biopsias renales son IgG2 e IgG3⁹³.

FcγRIIIb (CD16b), el único receptor sin dominio transmembrana, anclada por GPI cuya expresión superficial es 10 veces mayor que la de FcγRIIIa (135,000 frente a 10,000 receptores/célula,

respectivamente). Debido a esta forma diferente de anclar FcγRIIIb a la membrana FcγRIIIb no tiene segmentos de señalización intracelular. FcγRIIIb se expresa casi exclusivamente en neutrófilos; sin embargo, estudios recientes han demostrado baja expresión en basófilos humanos¹³⁹.

FcγRIIIb puede cooperar con otros FcγR para promover la fagocitosis de microbios opsonizados por anticuerpos favoreciendo el flujo de Calcio¹⁴⁰. Además, FcγRIIIb induce un fenotipo productor de trampas extracelulares de neutrófilos en ausencia de activación de FcγRIIa¹⁴¹.

Las variantes asociadas a enfermedad se han identificado principalmente en el exón 3 las cuales se detallan en la [Tabla 13](#) (Pág. 70).

Tabla 13. Principales polimorfismos de FcγRIIIb en el exón 3.

ID		<i>rs200688856</i>	<i>rs527909462</i>	<i>rs448740</i>	<i>rs5030738</i>	<i>rs147574249</i>	<i>rs2290834</i>	Referencia	
Significancia Clínica (ClinVar)		Patógena	No reportada	Patógena	No reportada	Patógena	Patógena		
NC_000001.11 (Posición del nucleótido a nivel cromosoma)*		161629989	161629983	161629903	161629864	161629853	161629781		
NG_032926.2 (Posición del nucleótido a nivel Gen)**		6975	6981	7061	7100	7111	7183		
AJ581669.1 (Posición del nucleótido en el exón 3 del gen)‡		141	147	227	266	277	349		
NP_001231682.2 (Posición del aminoácido en la proteína)***		36	38	65	78	82	106		
dbSNP Short Genetic Variations		G>C	T>C	A>G	C>A/C>T	A>G	A>G		
Cambios en el codón		AGG	CTT	AAC	GCT	GAC	GTC		
		AGC	CTC	AGC	GAT GTT	AAC	ATC		
Cambios en aminoácidos		Arg36Ser	Leu38	Asn65Ser	Ala78Asp Ala78Val	Asp82Asn	Val106Ile		
Sistema de haplotipos									
		FCGR3IA	G	C	G	C	G	A	142-146
HNA-1a	NA1*01	<i>FCGR3B*01</i>	G	C	A	C	G	G	142-148
	NA1*02	<i>FCGR3B*01 A227G</i>	G	C	G	C	G	A	142,147
		<i>FCGR3B*01 A349G</i>	G	C	A	C	G	A	142,143
		<i>FCGR3B*01 G277A</i>	G	C	A	C	A		144-146,148
		<i>FCGR3B*01 A227G/G277A</i>	G	C	G	C	A		144,146,148
			G	C	G	A	A		146
HNA-1b	NA2*01	<i>FCGR3B*02</i>	C	T	G	C	A	A	142-144,146-148
	NA2*02		C	T	A	C	A	A	142,143,145,146
	NA2*03	<i>FCGR3B*02 A277G</i>	C	T	G	C	G	A	142,143,145-147
	NA2*04	<i>FCGR3B*02 C141G</i>	G	T	G	C	A	A	142,148
	NA2*05		C	T	T	C	A		142
	NA2*06		G	C	G	C	A		142,145
			G	T	G	C	G		145,148
		<i>FCGR3B*02 T147C</i>	C	C	G	C	G		144,146
			C	C	G	C	A		146,148
			C	C	A	C	G		144-146
			C	T	A	T	A	A	146
			C	T	A	C	G		145
	HNA-1c	SH	<i>FCGR3B*03</i>	C	T	G	A	A	A
			C	T	G	A	G		146

*GRCh38.p13 chr 1, **FCGR3B RefSeqGene (LRG_1238), ***low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-B isoform 2 precursor
‡ Posición nucleotídica reportada por Ravetch¹⁰⁷, la cual está de acuerdo con la secuencia referencia AJ581669.1
Abreviaturas: **HNA:** Human Neutrophil Antigen

3.1.3. Ligandos y afinidad de unión de FcγR

Ligandos de FcγR

Los FcγR se unen a la fracción Fc de la IgG. Además, las pentraxinas como la proteína C reactiva y el Amiloide Sérico P (SAP) pueden activar a FcγRI y FcγRIIa, favoreciendo las vías de activación de la fagocitosis. Recientemente se describió que la citocina conocida como fibrinógeno tipo 2 (Fgl2), puede unirse a FcγRIIb e inducir la apoptosis mediada por caspasa-3/7 de una subpoblación de linfocitos T CD8⁺¹⁵⁰⁻¹⁵². Fgl2 es un efector inmunosupresor de Treg¹⁵³.

Enlace FcγR-complejos inmunitarios

Los elementos que regulan la unión de FcγR y los complejos inmunitarios de IgG son el segundo dominio de FcγR y el subtipo de la IgG¹⁵⁴. El alto grado de conservación de aminoácidos en dominios extracelulares de la familia FcγR y la secuencia constante de fracción Fc de la IgG han permitido modelar el mecanismo de unión FcγR-ligando (complejo inmunitario de IgG)¹⁵⁵. La interfaz de contacto incluye varios aminoácidos en el segundo dominio de FcγR, que interactúan con la fracción Fc de IgG, conocida como Cy2. La unión FcγR-ligando ha sido ejemplificada con un modelo de estructura tridimensional de la unión de la IgG₁ al FcγRIII soluble. La porción extracelular de FcγRIII se une a una molécula de IgG asimétricamente. Este modelo de unión con estequiometría 1:1 explica por qué las moléculas de IgG no pueden desencadenar respuestas celulares mediadas por FcγR espontáneamente, en ausencia de reticulación con antígenos multivalentes¹⁵⁶. Este modelo evita una estimulación permanente del sistema inmunitario por las inmunoglobulinas monoméricas presentes a altas concentraciones en el suero¹⁵⁷.

Afinidad FcγR-complejos inmunitarios.

La variabilidad en el sitio de contacto de FcγRs con complejos inmunitarios es baja, pero existen diferencias consistentes en la afinidad de unión. El péptido de la bisagra es el otro sitio central de reconocimiento; la variación en esta región es la razón principal de las diferentes afinidades. La importancia de la bisagra inferior en la unión se ha demostrado mediante la introducción de mutaciones que impiden la unión de FcγRIIa soluble recombinante a IgG1 humana¹⁵⁸.

La importancia de las variaciones en el péptido bisagra en la afinidad de unión receptor-ligando se ha demostrado con diferentes investigaciones, por ejemplo: FcγRII y FcγRIII son 50% idénticos, y las diferencias afectan a los bucles en contacto con la bisagra, pero no a las regiones de contacto con Cγ2-A y Cγ2-B. La variante FcγRIIa Arginina (R¹³¹) tiene menor afinidad de unión, y se encuentra en el péptido de bisagra¹⁵⁷.

FcγRI presenta la mayor afinidad de todos los receptores de la familia, esto puede atribuirse a la variación en la región bisagra, ya que a diferencia de los otros receptores FcγRI tiene ácido glutámico (E²³⁵) en lugar de leucina (L²³⁵), esto aumenta la afinidad de mIgG2b más de 100 veces.

La afinidad de unión con FcγR es crítica para la inmunoterapia basada en anticuerpos¹⁵⁴. La unión de calidad de la fracción Fc de IgG a FcγR ha cobrado importancia debido a que las interacciones de los anticuerpos terapéuticos puede verse disminuida en con variantes de estos receptores¹⁵⁹.

3.1.4. Receptores Fc gamma en LEG

Hay muchas variantes descritas en LEG. Muchas de ellas relacionadas con patología renal y se pueden observar en la [Figura 19](#) (Pág 73).

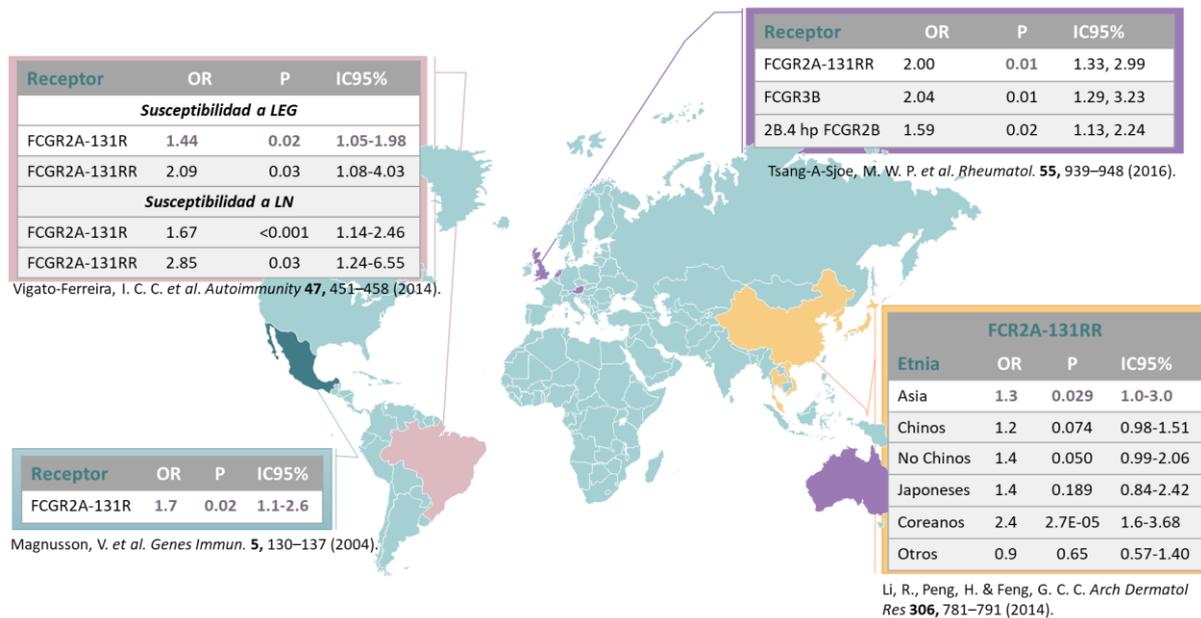


Figura 19. Susceptibilidad para padecer LEG o Nefritis Lúpica en diferentes poblaciones.

IV. METODOLOGÍA

4.1. Sujetos

Se incluyeron 155 pacientes mestizos mexicanos con diagnóstico y clasificación de LEG según evaluación clínica y criterios del Colegio Americano de Reumatología²². (Para las diferentes variantes pueden mostrarse diferencias en el número total de individuos debido a las diferencias en la efectividad de la tipificación para algunas variantes). Se incluyeron solo individuos adultos de más de 18 y menos de 70 años. Se excluyeron aquellos individuos con afectación renal de origen distinto al LEG o con enfermedad concomitante que también pudiese generar patología renal (ej.: diabetes mellitus, hipertensión o alguna nefropatía de etiología desconocida). La afectación renal se basó en los siguientes criterios: nefritis lúpica corroborado por biopsia renal o criterios clínicos y de laboratorio principalmente basados en la Clasificación de la OMS¹⁶⁰, proteinuria persistente, ya sea > 0.5 g/día o > 3+, cilindros celulares, ya sea glóbulos rojos, hemoglobina tubular granular o mixtos, anticuerpos Anti-DNA de doble cadena positivos y disminución de títulos séricos de complemento.

Por la complejidad de las manifestaciones del LEG se clasificaron los pacientes por la actividad de la enfermedad según su historial clínico en lupus renal y no renal como se define en la [Figura 20](#).

Así también se incluyeron 180 controles de más de 18 y menos de 70 años, mestizos mexicanos que además bajo interrogatorio hayan manifestado no presentar afectación de salud crónica autoinmune o no autoinmune y sin parientes conocidos con autoinmunidad y que al momento de la toma de muestra no presentaran afectación de salud transitoria.

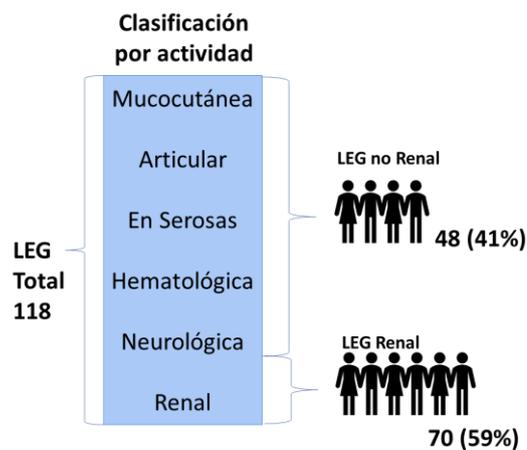


Figura 20. Clasificación de pacientes según actividad de la enfermedad.

4.2. Tipificación de Receptores Fc gamma

Se tipificaron dos receptores de la familia FcγR: FcγRIIIa y FcγRIIIb de los cuales se tiene poca información sobre el papel en la patología renal en pacientes con LEG mestizos mexicanos. Para FcγRIIIa ya se ha descrito previamente su participación en la patología renal¹⁶¹.

4.2.1. Variantes de un solo nucleótido en receptor FcγRIIIa

Para este receptor se buscó el polimorfismo rs1801274 en el gen FCGR2A (sustitución A/G), que resulta en un cambio de aminoácido en la posición 131, cambiando de histidina a arginina.

Se tipificó por PCR en tiempo real la variante rs1801274 en el gen *FCGR2A* (sustitución A/G) se confirmó utilizando un ensayo TaqMan 5 validado (Assay ID: C-9077561-20; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El ADN genómico se obtuvo de sangre total, utilizando el mini kit de ADN QIAamp (Qiagen, Valencia, CA, USA), como se indica en la sección 4.2.1. de la primera parte.

Teniendo en cuenta un volumen de reacción final de 25 μ l se utilizaron 15ng totales de ADN genómico, 12.5 μ l de Universal PCR Master Mix, 0.625 μ l de sonda TaqMan y 8,8 μ l de agua libre de DNA/RNAasas. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15s y 60°C durante 1 min, luego finalmente 60°C por 30s. Todas las reacciones de PCR se realizaron utilizando placas ópticas de 96 pocillos en un sistema de PCR en tiempo real Step-One Plus (Applied Biosystems).

4.2.2. Variantes de un solo nucleótido en receptor Fc γ RIIIb

Obtención de ADN genómico.

El ADN genómico se extrajo como se indica en la sección 4.2.1. de la primera parte.

Diseño de primers

Para realizar la tipificación se realizaron diferentes diseños de *primers* para amplificar el fragmento que delimita al exón 3 donde se encuentran las variantes de interés, [Tabla 13](#) (Pág. 70) y posteriormente tipificarlo por Secuenciación Capilar. En total se diseñaron tres pares de

primers, mejorando en cada diseño las características de los mismo y la calidad del fragmento obtenido: Diseño 1, [Figura 21](#) (Pág. 79), diseño 2, [Figura 22](#) (Pág. 80) y diseño 3, [Figura 23](#) (Pág. 81).

El primer diseño, [Figura 21](#) (Pág. 79), no fue totalmente exitoso ya que se generaron fragmentos diversos al incluir el intrón entre los exones 3 y 4. Los fragmentos obtenidos eran pequeños por lo que para obtener la secuencia lo más completa posible se tenía que cortar y purificar varias bandas por muestra haciendo el proceso poco preciso y más laborioso. Además, los parámetros de calidad de los *primers* diseñados no fueron favorables para la conservación de estos en solución, principalmente por el alto índice de autocomplementariedad. Por lo cual se realizó un segundo ensayo.

En el segundo diseño, [Figura 22](#) (Pág. 80), se separó y amplificó un solo fragmento de 254 pares de bases, lo cual permitió la secuenciación de 4 de las 6 variantes buscadas en el exón 3. El fragmento se purificó separando la banda obtenida en el gel de agarosa y también con purificación directa a partir del producto de PCR, obteniendo buenos resultados con ambos procesos. Sin embargo, las dos variantes en los bordes del exón 3 rs200688856 y rs2290834 no se observaban bien en las secuencias, ya que al realizar la limpieza de los bordes de la secuencia en la mayoría de los casos estas variantes no estaban incluidas. Nótese que este diseño fue originalmente con la secuencia con número de acceso AJ581669.1, la cual ha sido utilizada previamente para las numeraciones referencia de las variantes nucleotídicas de FcyRIIIb en el exón 3. Sin embargo, debido a que las variantes de los extremos no se obtuvieron eficientemente se realizó un nuevo diseño usando una secuencia referencia del gen completo.

En el tercer diseño, [Figura 23](#) (Pág 81), del ensayo se utilizó la secuencia referencia del gen completo (NG_032926.2) para poder ubicar los *primers* a los extremos del exón 3 (en la zona de los intrones).

Amplificación

Del diseño de *primers* ejecutado se aisló y amplificó exitosamente un solo fragmento de 437 pares de bases, los detalles de la PCR para amplificar el fragmento se muestran en la [Figura 23](#) (Pág. 81). Al generarse un solo fragmento se facilitó un proceso de purificación directa desde la PCR.

Purificación

Luego de obtener el fragmento de amplificación deseado, se procedió a purificar para preparar la secuenciación. El proceso de purificación del fragmento amplificado en la PCR ya sea a partir del gel de electroforesis (Thermo Scientific™ Kit de extracción de gel GeneJET, K0692) o a partir de la PCR directa con QIAquick PCR Purification Kit de Qiagen, se realizó según las indicaciones del fabricante.

Secuenciación

Los productos amplificados y purificados fueron secuenciados en ambas direcciones mediante el uso de BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Applied Biosystems™ Cat. 4337455 en el secuenciador ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) según las indicaciones del fabricante. De forma resumida se detallan las proporciones de los reactivos por reacción, como sigue: 4µL de BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix, 2µL de BigDye™ Terminator v1.1 & V3.1 Sequencing Buffer, 1 µL Primer a 3.2 pmol (forward o reverse, ya que se llevan a cabo por separado), 11 µL de agua desionizada, libre de RNAsa y

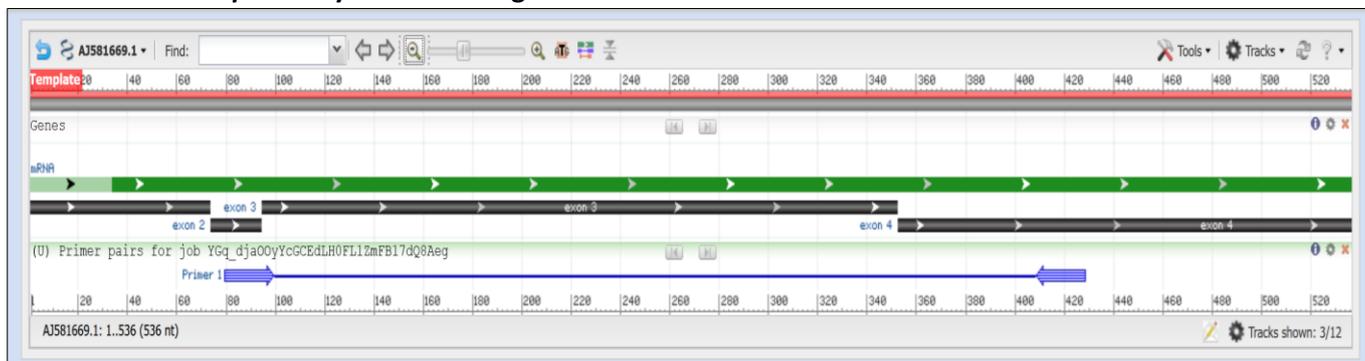
DNAsa, 2 μ L de ADN templado ajustado a 5 ng/ μ L para tener una reacción con 10ng totales de templado. El programa de PCR se detalla como sigue: un paso inicial a 96°C por 1 minuto, después del cual se tendrán 25 ciclos en los cuales se realizará la desnaturalización a 96°C por 10 segundos, la alineación a 50°C por 5 segundos y la extensión a 60°C por 4 minutos y luego de terminados los 25 ciclos un paso de mantenimiento a 4°C hasta el momento de purificación.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas con el uso de BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Las secuencias referencia utilizadas fueron Homo sapiens mRNA for Fc-gamma receptor IIIB (FCGR3B gene) GenBank con el número de acceso AJ581669.1. y FCGR3B RefSeqGene (LRG_1238) con el número de acceso NG_032926.2.

A. Diseño de primers

<i>FcyRIIIB</i> , exón 3	Secuencia (5'→3')	Tm	GC%	Auto complementariedad	
Forward primer	CTGGCATGCGGACTGAAGAT	60.46	55.00	6.00	2.00
Reverse primer	TTCAGCTGTGACACCTCAG	59.61	55.00	7.00	3.00

B. Gráfico de primers y su ubicación genómica



C. PCR de amplificación del fragmento: Reactivos

Componente	Volumen final de la reacción	Concentración final
Agua destilada	A completar 12.5µL	-
10X High Fidelity PCR Buffer*	1.25µL	1X
50 mM MgSO ₄ *	0.5µL	2.0mM
10 mM dNTP Mix**	0.25µL	0.2mM cada uno
10uM Forward primer	0.25µL	0.2mM
10uM Reverse primer	0.25µL	0.2mM
DNA templado	4.00µL	<500ng
Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (5U/µL)*	0.005µL	1U/reacción

D. PCR de amplificación del fragmento: Programa

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
35 Ciclos	Desnaturalización inicial	94 30 segundos
	Desnaturalización	94 15 segundos
	Alineación	St 30 segundos
	Extensión	68 1 minuto/kb
	Mantenimiento	4 ∞

E. Electroforesis de fragmentos amplificados en la PCR

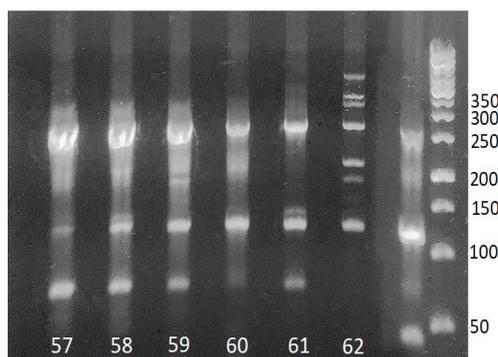
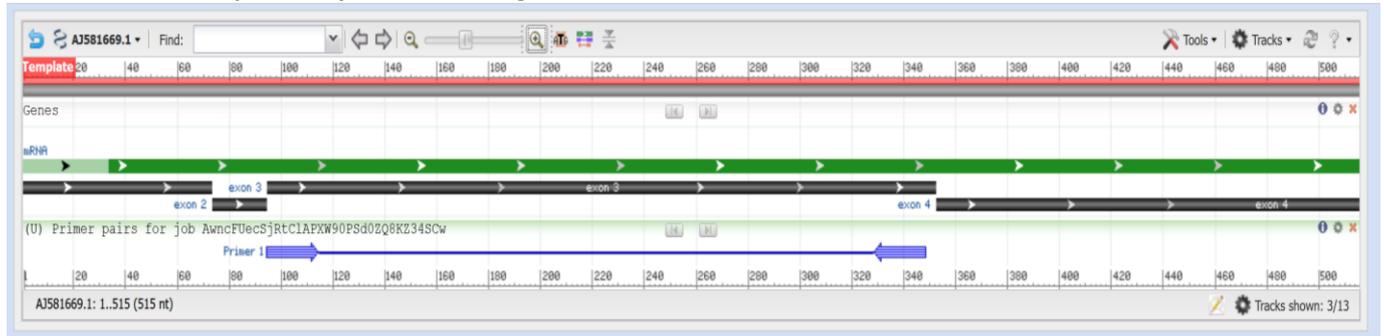


Figura 21. Diseño 1. Proceso de evaluación de diseño de primers para secuenciar el exón 3 de *FcyRIIIB*. **A.** Características de diseño de los primers **B.** Gráfico diseño de par de primers, se abarca el exón 3 casi completo, sin embargo, al abarcar parte del exón 4 se incluyó el intrón entre el exón 3 y 4, esta forma de diseño generó varios fragmentos. **C.** Reactivos ajustados a un volumen final de 12.5µL para cada reacción de PCR. **D.** Programa de la PCR, las reacciones se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 **D.** Electroforesis 1% de agarosa (se muestran diferentes temperaturas ya que se tenía como objetivo determinar la temperatura adecuada de alineación. * Invitrogen™ ADN polimerasa de alta fidelidad Platinum™ Taq + reactivos asociados a la enzima Buffer y MgSO₄ Cat.: 11304011, ** Invitrogen™ Mezcla de dNTP (10 mm cada uno) Cat.: 18427013.

A. Diseño de primers

<i>FcyRIIIB</i> , exón 3	Secuencia (5'→3')	Inicio	Final	Tm	GC%	Autocomplementariedad		
							3'	
Forward primer	AAGATCTCCCAAAGGCTGTG	95	114	57.50	50.00	6.00	5.00	
Reverse primer	ATGGACTTCTAGCTGCACCG	348	329	59.82	55.00	4.00	2.00	
Longitud del producto	254 pares de bases							

B. Gráfico de primers y su ubicación genómica



C. PCR de amplificación del fragmento: Reactivos

Componente	Volumen final de la reacción	Concentración final
Agua destilada	A completar 12.5µL	-
10X High Fidelity PCR Buffer*	1.25µL	1X
50 mM MgSO ₄ *	0.5µL	2.0mM
10 mM dNTP Mix**	0.25µL	0.2mM cada uno
10uM Forward primer	0.25µL	0.2mM
10uM Reverse primer	0.25µL	0.2mM
DNA templado	4.00µL	<500ng
Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (5U/µL)*	0.005µL	1U/reacción

D. PCR de amplificación del fragmento: Programa

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	
35 Ciclos	Desnaturalización inicial	94	30 segundos
	Desnaturalización	94	15 segundos
	Alineación	60	30 segundos
	Extensión	68	1 minuto/kb
	Mantenimiento	4	∞

E. Electroforesis del fragmento amplificado en la PCR

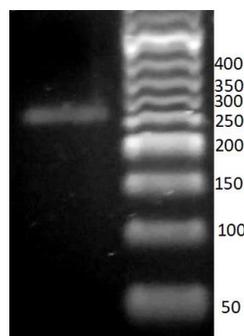
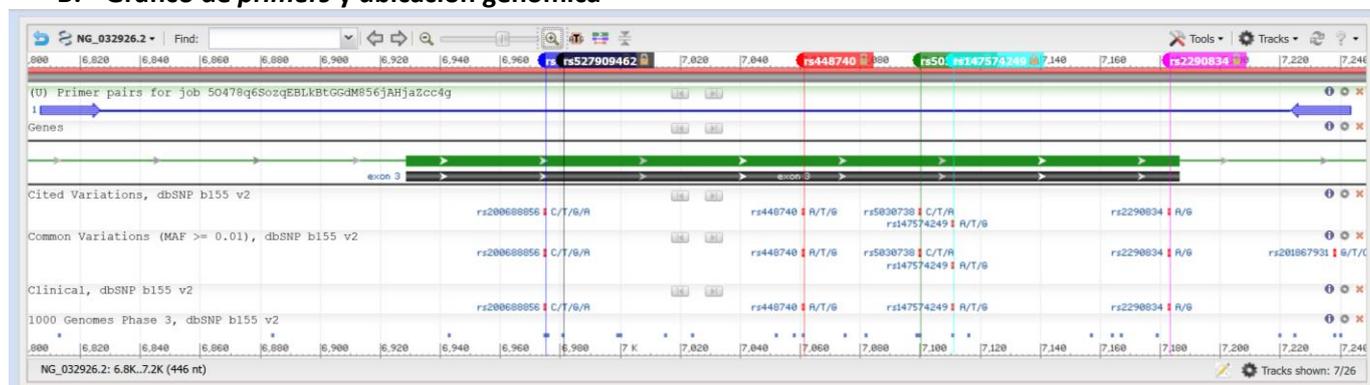


Figura 22. Segundo ensayo, diseño de primers para aislar y amplificar el exón 3 de *FcyRIIIB*. **A.** Características de diseño de los primers **B.** Vista gráfica de la sección delimitada por los primers, los cuales incluyen la mayor parte del exón 3, sin incluir los bordes del exón los cuales tienen variantes de interés **C.** Reactivos para ejecutar la PCR. **D.** Programa de la PCR, Las reacciones se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700. **E.** Electroforesis 1% de agarosa, con el fragmento esperado de 254 pares de bases. * Invitrogen™ ADN polimerasa de alta fidelidad Platinum™ Taq + reactivos asociados a la enzima Buffer y MgSO₄ Cat.: 11304011, ** Invitrogen™ Mezcla de dNTP (10 mM cada uno) Cat.: 18427013.

A. Diseño de primers

<i>FcyRIIIB</i> , exón 3	Secuencia (5'→3')	Inicio	Final	Tm	GC%	Autocomplementariedad	
							3'
Forward primer	AAGACTGAGCCACCAAGCAT	6807	6826	59.60	50.00	3.00	2.00
Reverse primer	AGGACCCCTTTGTTTCACCCT	7243	7224	58.77	50.00	4.00	0.00
Tamaño del producto	427 pares de bases						

B. Gráfico de primers y ubicación genómica



C. PCR de amplificación del fragmento: Reactivos

Componente	Volumen final de la reacción	Concentración final
Agua destilada	A completar 12.5µL	-
10X High Fidelity PCR Buffer*	1.25µL	1X
50 mM MgSO ₄ *	0.5µL	2.0mM
10 mM dNTP Mix**	0.25µL	0.2mM cada uno
10uM Forward primer	0.25µL	0.2mM
10uM Reverse primer	0.25µL	0.2mM
DNA templado	4.00µL	<500ng
Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (5U/µL)*	0.005µL	1U/reacción

D. PCR de amplificación del fragmento: Programa

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	
35 Ciclos	Desnaturalización inicial	94	30 segundos
	Desnaturalización	94	15 segundos
	Alineación	60	30 segundos
	Extensión	68	1 minuto/kb
	Mantenimiento	4	∞

E. Electroforesis del fragmento amplificado en la PCR

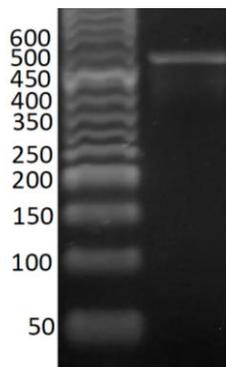


Figura 23. Diseño 3. Tercer ensayo, diseño de primers para aislar y amplificar el exón 3 de *FcyRIIIB*. **A.** Características de diseño de los primers **B.** Vista gráfica de la ubicación de los primers y las variantes de interés. **C.** Reactivos para ejecutar la PCR. **D.** Programa de la PCR. Las reacciones se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 E. Electroforesis 1% de agarosa con el fragmento esperado de 427 pares de bases. * Invitrogen™ ADN polimerasa de alta fidelidad Platinum™ Taq + reactivos asociados a la enzima Buffer y MgSO₄ Cat.: 11304011, ** Invitrogen™ Mezcla de dNTP (10 mm cada uno) Cat.

4.3. Tipificación de Haplotipos Completos

Como se detalla en la [Tabla 13](#) (Pág.70) la combinación de 5 o 6 de las variantes tipificadas con secuenciación forman tres grandes grupos de haplotipos: NA1, NA2 y SH en sus denominaciones más comunes. Las variantes en los haplotipos difieren en frecuencia dependiendo la población que se analice. Inicialmente, la tipificación de los haplotipos completos se realizaba por PCR, delimitando los haplotipos con *primers* específicos para las variantes características y mediante el uso de enzimas de restricción.

Por lo que como mecanismo de verificación doble de los haplotipos obtenidos también se realizó tipificación con *primers* específicos de secuencia para los haplotipos NA1 y NA2, como se detalla en la [Figura 24](#) (Pág. 81).

4.4. Análisis estadístico y procesamiento de resultados

Los modelos estadísticos de asociación de las variantes del receptor FcγRIIa y haplotipos del receptor FcγRIIIb y fenotipos del LEG se analizaron utilizando la herramienta SNPStat <https://snpstats.net/>.¹⁶²

Previo a estos cálculos se determinó la fase gamética de las variantes por medios bioestadísticos para el receptor FcγRIIIb. Es decir, es necesario subrayar que la fase gamética de las variantes no fue determinada de manera exacta, ya que para tal efecto debieron secuenciarse los progenitores de cada individuo para realizar la asignación de las variantes al haplotipo paterno y materno respectivo. Por lo cual se utilizó el programa de genética de poblaciones Arlequin⁴⁷ para generar la distribución de las fases gaméticas vía algoritmo ELB (Excoffier-Laval-Balding). ELB es un algoritmo fácil de programar, el cual se ejecuta computacionalmente rápido para inferir la fase gamética en muestras poblacionales de

genotipos multilocus. Las actualizaciones de fase se realizan sobre la base de una ventana de loci vecinos, y el tamaño de la ventana varía según el nivel local de desequilibrio de ligamiento de los datos dados sin una base de referencia ¹⁶³.

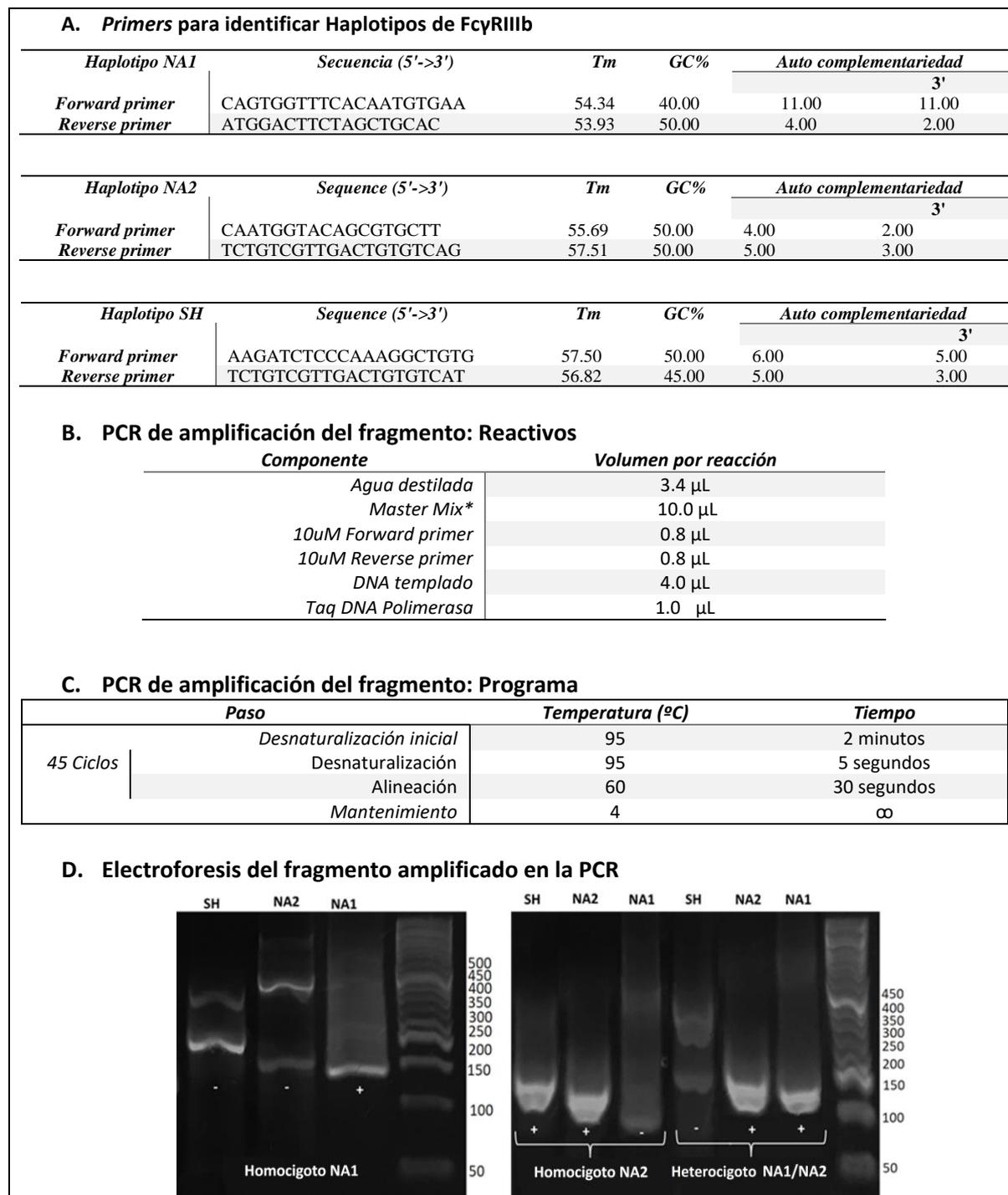


Figura 24. Ensayo para identificar haplotipos de las variantes del receptor FcyRIIIb. A. Primers para identificar los haplotipos NA1, NA2 y SH, descritos previamente en la literatura¹⁶⁴. **B.** Reactivos y proporciones para la PCR. **C.** Programa de la PCR. **D.** Electroforesis para observar los fragmentos de los haplotipos amplificados. * Fast PROBE™ 1-Step RT-qPCR Plus Hi-ROX. TONBO Biosciences.

V. RESULTADOS

5.1. Variantes de un solo nucleótido en receptor FcγRIIIa

Inicialmente se hizo un contraste entre las frecuencias de pacientes y controles. Las frecuencias de los alelos fueron semejantes en pacientes y controles, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

Sin embargo, los pacientes fueron analizados según la actividad de la enfermedad, es decir, fueron clasificados según sus manifestaciones clínicas y estudios de laboratorio (lo cual se verificó en el historial clínico) en: actividad renal, hematológica, articular, neurológica, en membranas serosas y actividad mucocutánea. La mayoría de los pacientes mostró más de un tipo de actividad. Además, se evaluaron aquellos que presentaron Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos secundario a LEG. De los contrastes mencionados se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con y sin manifestaciones renales. En la **Tabla 14** (Pág. 85) panel A se muestran las frecuencias tanto alélicas como genotípicas, en el panel B se muestran los valores de P para el cálculo del Equilibrio de Hardy-Weinberg, panel C se muestran los diferentes modelos de asociación al fenotipo de respuesta (LEG renal y no renal), obteniéndose asociación a involucro renal bajo los modelos codominante y recesivo para el alelo G, el cual codifica para arginina y genera afinidad disminuida. En el panel D la separación del fenotipo de respuesta por género. La frecuencia de homocigotas GG es evidente en las mujeres con involucro renal. El mismo fenómeno no fue observable en participantes del género masculino probablemente debido al número reducido de individuos en la muestra. Observable es también que el valor de P para la interacción entre el fenotipo de respuesta y el género no fue estadísticamente significativo por lo que la presentación de

la enfermedad renal tiene una distribución semejante entre pacientes femeninos y masculinos.

Tabla 14. FcyRIIIa (rs1801274, H131R) en pacientes con LEG con y sin involucro renal.

A. Frecuencias genotípicas y alélicas en pacientes con LEG con y sin afectación renal.						
Genotipo	LEG total n=136		No renal n=54 (40%)		Renal n=82 (60%)	
	Fa	Fr	Fa	Fr	Fa	Fr
G/G	35	0.25	8	0.15	27	0.33
G/A	79	0.57	33	0.61	44	0.54
A/A	25	0.18	13	0.24	11	0.13
Alelos						
G	149	0.54	49	0.45	98	0.6
A	129	0.46	59	0.55	66	0.4

B. Análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg						
	GG	GA	AA	G	A	P-valor
LEG total	35	79	25	149	129	0.12
No renal	8	33	13	49	59	0.17
Renal	27	44	11	98	66	0.36

C. Modelos de asociación con el fenotipo de respuesta (Afectación renal en el paciente con LEG)						
Modelo	Genotipo	No renal	Renal	OR (95% CI)	P-valor	
Codominante	A/A	13 (24.1%)	11 (13.4%)	1		
	A/G	33 (61.1%)	44 (53.7%)	1.56 (0.61-3.94)	0.033	
	G/G	8 (14.8%)	27 (32.9%)	3.97 (1.29-12.25)		
Dominante	A/A	13 (24.1%)	11 (13.4%)	1	0.12	
	A/G-G/G	41 (75.9%)	71 (86.6%)	2.04 (0.83-5.01)		
Recesivo	A/A-A/G	46 (85.2%)	55 (67.1%)	1	0.015	
	G/G	8 (14.8%)	27 (32.9%)	2.85 (1.18-6.88)		
Sobre dominante	A/A-G/G	21 (38.9%)	38 (46.3%)	1	0.37	
	A/G	33 (61.1%)	44 (53.7%)	0.73 (0.36-1.47)		

D. Interacción fenotipo-género										
Genotipo	LEG Mujeres n=120 (88.2%)					LEG Hombres n=16 (11.8%)				
	Renal n=72 (60%)		No renal n=48 (40%)		OR (95% CI)	Renal n=10 (62.5%)		No renal n=6 (37.5%)		OR (95% CI)
	Fa	Fr	Fa	Fr		Fa	Fr	Fa	Fr	
A/A	10	0.139	13	0.271	1	1	0.100	0	0.000	---
A/G	37	0.514	28	0.583	1.72 (0.66-4.48)	7	0.700	5	0.833	1.82 (0.44-7.48)
G/G	25	0.347	7	0.146	4.64 (1.43-15.04)	2	0.200	1	0.167	2.60 (0.21-32.91)

p-valor de la interacción: 0.41

Fa: Frecuencia absoluta, Fr: Frecuencia relativa.

Así también se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para los pacientes con y sin Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos secundario (SAF), para FcγRIIIa (rs1801274, H131R). La información se muestra en la **Tabla 15**. En panel A se muestran las frecuencias tanto alélicas como genotípicas, en el panel B se muestran los valores de *P* para el cálculo del Equilibrio de Hardy-Weinberg, en el panel C se muestran los diferentes modelos de asociación al fenotipo de respuesta (LEG con SAF y sin SAF).

Tabla 15. FcγRIIIa (rs1801274, H131R) en pacientes con LEG con y sin SAF secundario.

A. Frecuencias genotípicas y alélicas en pacientes con LEG con y sin SAF secundario						
LEG n=126			SAF n=39 (31%)		No SAF n=77 (69%)	
Genotipo	Fa	Fr	Fa	Fr	Fa	Fr
A/A	24	0.19	11	0.28	10	0.13
G/A	69	0.55	18	0.46	45	0.58
G/G	33	0.26	10	0.26	22	0.29
Alelos						
G	135	0.54	38	0.49	89	0.58
A	117	0.46	40	0.51	65	0.42

B. Análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg						
	AA	AG	GG	G	A	P-valor
LEG total	33	69	24	135	117	0.29
No SAF	22	45	10	89	65	0.11
SAF	10	18	11	38	40	0.75

C. Modelos de asociación con el fenotipo de respuesta (SAF secundario a LEG)					
Modelo	Genotipo	SAF	No SAF	OR (95% CI)	P-valor
Codominante	G/G	10 (25.6%)	22 (28.6%)	1	0.13
	A/G	18 (46.1%)	45 (58.4%)	0.86 (0.34-2.19)	
	A/A	11 (28.2%)	10 (13%)	2.45 (0.78-7.66)	
Dominante	G/G	10 (25.6%)	22 (28.6%)	1	0.74
	A/G-A/A	29 (74.4%)	55 (71.4%)	1.16 (0.48-2.77)	
Recesivo	G/G-A/G	28 (71.8%)	67 (87%)	1	0.046
	A/A	11 (28.2%)	10 (13%)	2.69 (1.02-7.12)	
Sobre dominante	G/G-A/A	21 (53.9%)	32 (41.6%)	1	0.2
	A/G	18 (46.1%)	45 (58.4%)	0.60 (0.27-1.31)	

D. Interacción fenotipo-género										
	LEG Mujeres n=102 (88%)				LEG Hombres n=14 (12%)					
	SAF n=34 (33%)		No SAF n=68 (67%)		OR (95% CI)	SAF n=5 (36%)		No SAF n=9 (64%)		
	Fa	Fr	Fa	Fr		Fa	Fr	Fa	Fr	
G/G	9	0.265	20	0.294	1	1	0.200	2	0.222	1.11 (0.09-13.89)
A/G	14	0.412	39	0.574	0.80 (0.29-2.16)	4	0.800	6	0.667	1.48 (0.33-6.57)
A/A	11	0.324	9	0.132	2.72 (0.83-8.85)	0	0.000	1	0.111	0

P valor de interacción: 0.35

Fa: Frecuencia absoluta, Fr: Frecuencia relativa.

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas bajo el modelo recesivo para el alelo A, el cual codifica para Histidina, la variante ancestral de mayor afinidad. En el panel D la separación del fenotipo de respuesta por género. La distribución por género no mostró diferencias estadísticamente significativas en los subgrupos femenino y masculino. El *P* valor de interacción tampoco mostró diferencias significativas en la distribución del SAF en pacientes de ambos géneros.

5.2. Variantes de un solo nucleótido en receptor FcγRIIIb

Las secuencias del receptor FcγRIIIb fueron clasificadas en los diferentes haplotipos. Las frecuencias y análisis estadístico de estos haplotipos son mostrados en la [Tabla 16](#) (Pág. 88). En el panel A se muestran las frecuencias en el grupo control y en el grupo de pacientes con LEG, se muestran 15 diferentes combinaciones de las variables (las cuales fueron las más comunes). Las combinaciones de polimorfismos encontrados en la población mexicana corresponden a lo reportado en la literatura, [Tabla 13](#) (Pág. 70). En el panel B se muestran los haplotipos más frecuentes, de los cuales se observa que el haplotipo CTGCAA de tipo NA2 es un factor de riesgo para los individuos con LEG con una $P=0.001$, $OR=3.18$, $95\%IC=1.58 - 6.43$. En el panel C se muestra el resumen de haplotipos según la clasificación NA1, NA2 y SH, [Tabla 13](#) (Pág. 70), de forma congruente se muestra como los homocigotos para haplotipos NA2 tienen riesgo de padecer la enfermedad comparado con los controles sin enfermedad $P_c=0.003$, $OR=7.8$, $95\%IC=1.77-34.01$.

Finalmente se muestra la [Figura 25](#) (Pág. 89) un diagrama con el desequilibrio de ligamiento para las diferentes variantes estudiadas, siendo uno de los parámetros que la facilita observar la medida de la asociación delta prima (D' en el diagrama), los valores que más se acercan a 1 indican mayor probabilidad de asociación.

Tabla 16. Haplotipos de polimorfismos del receptor FcγRIIIb en el exón 3.

A. Frecuencias de haplotipos completos.									
Nº	141	147	227	266	277	349	Total	Control	LEG
2	G	C	A	C	G	A	0.2101	0.2434	0.1924
3	C	T	G	C	A	A	0.1790	0.0754	0.2544
4	G	T	G	C	A	A	0.1250	0.1703	0.0951
5	G	T	G	C	G	A	0.0515	0.0760	0.0317
6	G	C	G	C	A	A	0.0458	0.0468	0.0445
7	C	C	G	C	G	A	0.0242	0.0367	0.0147
8	G	C	A	C	G	G	0.0170	NA	0.0206
9	C	T	G	C	G	A	0.0058	0.0071	0.0058
10	C	T	G	A	A	A	0.0058	0.0044	0.0068
11	C	C	G	C	A	A	0.0037	NA	0.0067
12	C	C	A	C	G	G	0.0025	NA	0.0061
13	G	C	A	A	G	A	0.0023	0.0057	NA
14	G	T	A	A	G	G	9.00E-04	NA	NA
15	G	T	A	A	G	A	7.00E-04	0.0031	NA

B. Asociación de haplotipos con LEG									
Nº	141	147	227	266	277	349	Fr	OR (95% CI)	P-valor
1	G	C	G	C	G	A	0.325	1	---
2	G	C	A	C	G	A	0.213	0.78 (0.43 - 1.42)	0.42
3	C	T	G	C	A	A	0.177	3.18 (1.58 - 6.43)	0.001
4	G	T	G	C	A	A	0.127	0.66 (0.32 - 1.40)	0.28
5	G	T	G	C	G	A	0.051	0.48 (0.16 - 1.38)	0.17
6	G	C	G	C	A	A	0.045	1.06 (0.41 - 2.75)	0.90
7	C	C	G	C	G	A	0.024	0.48 (0.10 - 2.30)	0.36
rare	*	*	*	*	*	*	0.023	0.91 (0.20 - 4.20)	0.91

C. Frecuencias haplotípicas									
	SLE		Control		Pc	OR	95%IC		
NA1/NA2	90	0.672	76	0.673	ns				
NA1/NA1	44	0.328	35	0.310	ns				
NA2/NA2	19	0.142	2	0.018	0.003	7.8	1.77	34.01	
NA1/SH	1	0.007	0	0.000	ns				
NA2/SH	1	0.007	0	0.000	ns				
Total	155		113						

D. Frecuencias haplotípicas									
	SLE		Control		Pc	OR	95%IC		
NA1	179	0.6679	145	0.642	ns				
NA2	129	0.4813	81	0.358	ns				
SH	2	0.0075	0	0.000	ns				
Total	310		226						

El análisis realizado por fenotipo de la enfermedad, renal, hematológico, mucocutáneo, en membranas serosas, articular y neurológico no mostró diferencias estadísticamente significativas.

	147	227	266	277	349
141	0.109967 0.782 0.54816 152.6461 <2e 16 254	0.046962 0.904 0.26688 36.1826 1.80e 09 254	0.002835 0.378 0.06971 2.4689 0.116123 254	0.106269 0.761 0.54221 148.7587 <2e 16 253	0.001516 0.361 0.02679 0.1522 0.696489 106
147		0.065947 0.999 0.42115 91.5214 <2e 16 258	0.002872 0.471 0.06091 1.9141 0.166503 258	0.178189 0.782 0.76945 304.3155 <2e 16 257	0.006893 0.992 0.10504 2.3393 0.126150 106
227			0.000949 0.421 0.02294 0.2725 0.601656 259	0.084136 0.999 0.41415 88.5057 <2e 16 258	0.014406 0.996 0.25025 13.2764 0.000269 106
266				0.0006747 0.105 0.01378 0.0981 0.754180 258	0.000104 0.569 0.00779 0.0129 0.909682 106
277	D D' R X ² P va ue n				0.006747 0.992 0.10328 2.2615 0.132627 106

Figura 25. Desequilibrio de ligamiento de las variantes estudiadas para el receptor FcγRIIIB.

Por otro lado, en los análisis de las variantes individuales fue más informativo en la variante en la posición 141, la cual mostró riesgos en todos los modelos de asociación, manteniendo el equilibrio de Hardy Weinberg. De forma congruente con la información obtenida en los haplotipos completos, el alelo C (parte de haplotipos NA2) de la posición 141 es un factor de susceptibilidad, y los homocigotos con este alelo presentan un riesgo incrementado de padecer la enfermedad, [Tabla 17](#) (Pág. 90).

Tabla 17. FcyRIIIb rs200688856 (NG_032926.2:g.6975C>G) (141)

A. Frecuencias alélicas y genotípicas en pacientes con LEG y controles.						
Genotipo	Todos los sujetos n=254		Control n=108		LEG n=146	
	Fa	Fr	Fa	Fr	Fa	Fr
C/C	17	0.07	3	0.03	14	0.10
G/C	79	0.31	21	0.19	58	0.40
G/G	158	0.62	84	0.78	74	0.51
Alelos						
G	395	0.78	189	0.88	206	0.71
C	113	0.22	27	0.12	86	0.29

Fa: Frecuencia absoluta, Fr: Frecuencia relativa

B. Equilibrio de Hardy-Weinberg.						
	GG	GC	CC	G	C	P-valor
Todos los sujetos	158	79	17	395	113	0.11
Control	84	21	3	189	27	0.21
LEG	74	58	14	206	86	0.56

C. FcyRIIIb (rs200688856). Modelos de asociación con LEG.						
Modelo	Genotipo	Control	LEG	OR (95% CI)	P-valor	
Codominante	G/G	84 (77.8%)	74 (50.7%)	1	<0.0001	
	G/C	21 (19.4%)	58 (39.7%)	3.14 (1.74-5.65)		
	C/C	3 (2.8%)	14 (9.6%)	5.30 (1.46-19.16)		
Dominante	G/G	84 (77.8%)	74 (50.7%)	1	<0.0001	
	G/C-C/C	24 (22.2%)	72 (49.3%)	3.41 (1.95-5.95)		
Recesivo	G/G-G/C	105 (97.2%)	132 (90.4%)	1	0.024	
	C/C	3 (2.8%)	14 (9.6%)	3.71 (1.04-13.26)		
Sobredominante	G/G-C/C	87 (80.6%)	88 (60.3%)	1	4.00E-04	
	G/C	21 (19.4%)	58 (39.7%)	2.73 (1.53-4.88)		

VI. DISCUSIÓN

En esta sección del trabajo con pacientes con LEG se ha corroborado la participación de los receptores Fc gamma en la patología del LEG.

Al comparar las frecuencias de los polimorfismos del receptor FcγRIIIa no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, al realizar las comparaciones entre pacientes fue observable la diferencia entre los que manifiestan afectación renal y los que no, los individuos con involucro renal tienen una frecuencia elevada de la variante 131R de menor afinidad, a la cual se atribuye una depuración defectuosa de complejos inmunitarios de autoantígenos por macrófagos y activación aberrante de neutrófilos con formas productoras de trampas extracelulares¹⁶⁵. Sin embargo la depuración defectuosa por receptores Fc gamma con polimorfismos de baja afinidad y la consecuente reducción de la degradación de las trampas extracelulares de neutrófilos y su contribución a la progresión de la nefritis lúpica ahora se ve cuestionada por los datos experimentales en ratones propensos al lupus que genéticamente no producen NETS pero aún están afectados¹⁶⁶. Por lo que la diferenciación del fenotipo renal del no renal es muy valiosa ya que explica parte de la alta frecuencia de lupus renal en México. Información que habrá que completar con estudios subsiguientes.

De forma interesante, al realizar las comparaciones entre pacientes con y sin SAF fue observable diferencias en las frecuencias de las variantes del receptor FcγRIIIa, sin embargo, en el fenotipo con SAF secundario se encontró elevada la frecuencia de 131H, la variante de alta afinidad del receptor. Esto también es congruente con los mecanismos implicados al receptor, ya que FcγRIIIa se encuentra distribuido en muchos tipos células del sistema inmunitario y además se encuentra en plaquetas. La activación de FcγRIIIa en plaquetas aumenta las probabilidades de que se aglomeren y formen coágulos¹⁶⁷, lo cual sería parte del mecanismo de trombosis observado en los pacientes con Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos.

Las mismas comparaciones fueron realizadas con los otros fenotipos de la enfermedad: mucocutáneo, neurológico, hematológico y articular, pero no se observaron diferencias entre pacientes con y sin estos fenotipos.

Por otro lado, se ha demostrado la participación del haplotipo NA2 del receptor FcγRIIIb en la susceptibilidad a padecer lupus en individuos mexicanos de la Ciudad de México. Esto es congruente con el mecanismo descrito para el receptor. En neutrófilos FcγRIIIb es abundantemente expresado y su activación permite que se asocie con moléculas activadoras en las balsas lipídicas para poder generar señalización, posterior a su activación este receptor contribuye al flujo de calcio para la señalización efectiva del receptor FcγRIIa¹⁴⁰. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el receptor FcγRIIIb participa activamente en el fenotipo del neutrófilo, una activación aberrante o en ausencia de la activación de FcγRIIa ocasiona que el neutrófilo preferentemente haga NETosis^{141,168}. En un escenario de infección resulta de utilidad para el procesamiento del patógeno, pero en un escenario de unión de inmunocomplejos de autoantígenos resulta potencialmente dañino, ya que las trampas extracelulares de neutrófilos portan además del material genético, histonas, enzimas proteolíticas como elastasas, mieloperoxidasas entre otros elementos que al depositarse en los tejidos y no ser depuradas efectivamente permanecen en contacto crónico generando daño orgánico. En biopsias se ha demostrado la presencia de trampas extracelulares de neutrófilos¹⁶⁶.

Finalmente, es necesario mencionar que una de las limitantes del trabajo presentado para FcγR es el número muestral por lo que enriquecer la muestra potenciará en futuros estudios la veracidad de los resultados para continuar con estudios de funcionalidad que ayuden a definir la participación de los polimorfismos de estos receptores en el mecanismo de daño orgánico.

VII. CONCLUSIONES

La variante de menor afinidad del receptor FcγRIIa (131R) está relacionada con el riesgo del paciente con LEG a desarrollar nefritis lúpica o algún tipo de involucro renal. Al contrario, la variante de mayor afinidad del FcγRIIa (131H) está relacionada con el desarrollo de Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos secundario a LEG. Ambos hallazgos son congruentes con el mecanismo del receptor, menor afinidad afecta la depuración de inmunocomplejos los cuales se depositan a nivel renal causando inflamación prologada y daño al tejido, mientras que la variante de mayor afinidad permite activación plaquetaria y mayor efectividad de procesos de coagulación.

El haplotipo NA2 (homocigotos) del receptor FcγRIIIb se encuentra asociado al desarrollo de LEG. El mecanismo a través del cual se presenta susceptibilidad se debe a que el conjunto de variantes que componen el haplotipo afecta la afinidad de este.

Variantes asociadas a fenotipos y manifestaciones específicas del LEG suman a los marcadores potenciales para determinar aquellos individuos que progresarán a cuadros más graves de la enfermedad como lo es el lupus con involucro renal. La intervención médica en la prevención de cuadros graves depende de la calidad de información que brindan estos marcadores, y la calidad de discriminación de estos. Incluso, las variantes de los receptores Fc gamma, especialmente FcγRIIa puede sumarse a la batería de análisis genéticos en individuos con manifestaciones clínicas renales inconclusas que tienen dificultades para someterse a biopsia renal.

Finalmente, la importancia de este estudio radica en que los polimorfismos de FcγR que están relacionados con LEG y con involucro renal en lupus pueden sumarse a la batería actual de estudios para discriminar individuos que progresarán a afectación renal. Además, también pueden integrarse

como parte de los estudios que suman en un posible cálculo de riesgo genético. A más largo plazo, los polimorfismos encontrados pueden someterse a un seguimiento funcional, en aras de determinar parte de los mecanismos que definen la nefritis lúpica en el paciente con LEG y la búsqueda posterior de posibles dianas farmacológicas.

ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento Informado



INS. NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRÁN"

17 ABR 2019

COMITÉ DE ÉTICA
EN INVESTIGACIÓN



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO:

Efecto de anticuerpos antipartículas lipídicas y genotipificación en pacientes con lupus eritematoso sistémico y con síndrome de anticuerpos Antifosfolípidos.

VERSIÓN 1. ENERO 2019

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Ciudad de México, DF 14080.

Investigador Principal: Julio Granados Arriola
Dirección del Investigador: Departamento de Trasplantes del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
Teléfono de Contacto del Investigador (Incluyendo uno para emergencia de 24 horas): 5522647724
Investigadores participantes: Rogelio Hernández Pando, María Isabel Baeza Ramírez, Juan Jackez, Susana Maricela Hernández Doño.
Nombre del patrocinador: Sistema de fondos CONACYT.

INTRODUCCIÓN

Este documento es una invitación a participar en un estudio de investigación, usted tiene derecho a decidir si quiere participar o no, su decisión debe basarse en el conocimiento suficiente acerca del proyecto. Este documento le dará dicha información, además el investigador le deberá explicar ampliamente en qué consiste. Si decide participar o no, esto no tendrá efecto alguno sobre su atención médica en el Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Al final, si acepta, se le invitará a firmar este consentimiento informado, el cual cumple con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en la materia de Investigación en Salud, la Declaración de Helsinki, y a las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética.

INVITACIÓN A PARTICIPAR COMO SUJETO DE INVESTIGACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

Estimado(a) Sr(a).

En el Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, a través del grupo de Investigadores de ambas Instituciones, le invitan a participar como sujeto de investigación en este estudio que tiene como objetivo buscar un tipo de anticuerpos llamados "Anticuerpos antipartículas lipídicas" en su sangre, descritos en ratones con enfermedad parecida al Lupus y en humanos con Lupus o con Síndrome de Anticuerpos Antifosfolípidos, que podrían estar contribuyendo a que se desarrolle su enfermedad, como lo hacen otras moléculas (complemento, anticuerpos anti-DNA, anticuerpos anti-cardiolipina, etc.) que se han detectado en su sangre y con las que compararán los datos obtenidos así como con genes involucrados con el desarrollo de autoinmunidad previamente estudiados en humanos.

La duración total del estudio es de 24 meses. Su participación será solo un día, no se requerirá seguimiento.

Usted fue invitado al estudio debido a que tiene el diagnóstico del lupus eritematoso sistémico o de síndrome de anticuerpos Antifosfolípidos y porque se encuentra en control por el servicio de Reumatología del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán o bien por no presentar lo anterior y ser considerado un individuo Sano.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Su participación en el estudio consiste en:

1. Una evaluación clínica: Se efectuará durante la consulta médica habitual, se le solicitará la información acerca de cómo se ha sentido, sobre la ingesta de medicamentos, de datos con los que no contemos en el expediente clínico,

Efecto de anticuerpos antipartículas lipídicas y genotipificación en pacientes con lupus eritematoso sistémico y con síndrome de anticuerpos Antifosfolípidos. Versión 1. 2019

- se le pedirá presentar sus laboratorios de control y se le realizará una exploración física, resultados que anotaremos en nuestra base de datos diseñada para el estudio con fines estadísticos.
2. La obtención de la muestra de sangre: Se le tomarán 12mL de sangre, no es necesario que suspenda sus medicamentos ni que haga modificaciones en su alimentación o rutina previa.
 3. Obtención de una segunda muestra de sangre: En la siguiente consulta a la que acuda se repetirá el proceso de la primera consulta, es decir, la evaluación clínica y la toma de muestra.

RIESGOS E INCOVENIENTES

El reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para Salud señala que la obtención de las muestras biológicas representa un riesgo mínimo dentro de la investigación. Los riesgos de la toma de muestra sanguínea son: posibilidad de sangrado ligero o moretón en el sitio de la punción, mareo o sensación de desmayo y raramente puede producirse punción arterial. El personal que tomará la muestra sanguínea está entrenado para ello, lo que minimizará los riesgos y complicaciones. Debido a que no se probará ninguna sustancia ni se realizará alguna maniobra en su salud o evolución de su enfermedad esta no se verá afectada.

Los datos acerca de su identidad y su información médica no serán revelados en ningún momento como lo estipula la ley, por tanto, en la recolección de datos clínicos usted no enfrenta riesgos mayores a los relativos a la protección de la confidencialidad la cual será protegida mediante la codificación de las muestras y de su información.

BENEFICIOS POTENCIALES

Este estudio no está diseñado para beneficiarse directamente, sin embargo, gracias a su participación altruista en la búsqueda de estos anticuerpos y genes en su sangre, nos ayudará a comprender mejor porqué se presenta la enfermedad que padece, con lo cual podremos hacer un diagnóstico antes de que se presenten complicaciones irreversibles, desarrollar nuevos blancos terapéuticos y por lo tanto brindar tratamientos más personalizados y eficaz a personas con la misma condición médica que usted, con lo cual la sociedad se beneficia también.

CONSIDERACIONES ECONÓMICAS

No se cobrará ninguna tarifa por participar en el estudio ni se le hará pago alguno.

POSIBLES PRODUCTOS COMERCIALES DERIVABLES DEL ESTUDIO

Los resultados o materiales obtenidos en el estudio serán de propiedad de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, así como del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Si un producto comercial es desarrollado como resultado del estudio, usted no recibirá un beneficio financiero por el mismo.

ACCIONES POR SEGUIR DESPUÉS DEL TÉRMINO DEL ESTUDIO

Si tenemos información incompleta del expediente clínico o no encontramos datos experimentales relevantes en las pruebas que le realizamos a su sangre, existe la posibilidad de que sea contactado después de la conclusión del estudio, así mismo usted puede solicitar los resultados de sus exámenes clínicos y de las conclusiones del trabajo al Dr. Juan Jackez del INCMNSZ del departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto. La investigación es un proceso largo y complejo. El obtener los resultados finales del proyecto puede tomar varios meses.

PARTICIPACIÓN Y RETIRO DEL ESTUDIO

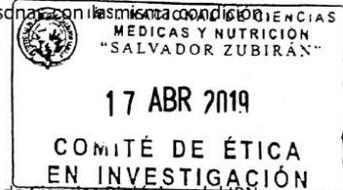
Su participación es voluntaria. Si usted decide no participar, no se afectará su relación con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), igualmente si decide participar, tiene la libertad para retirar su consentimiento e interrumpir su participación en cualquier momento.

El investigador puede excluirlo del estudio sino cumple con asistir a su consulta programada, sino tiene la información médica necesaria o si la muestra no es adecuada en calidad y cantidad y por lo tanto no puede ser procesada.

CONFIDENCIALIDAD Y MANEJO DE LA INFORMACIÓN

Su nombre no será usado en ninguno de los reportes públicos del estudio. Las muestras biológicas obtenidas no contendrán ninguna información personal y serán codificadas con un número de serie para evitar cualquier posibilidad de identificación.

Efecto de anticuerpos antipartículas lipídicas y genotipificación en pacientes con lupus eritematoso sistémico y con síndrome de anticuerpos Antifosfolípidos. Versión 1. 2019



Por disposición legal, las muestras biológicas, incluyendo la sangre, son catalogadas como residuos peligrosos biológico-infecciosos, y por esta razón durante el curso de la investigación su muestra no podrá serle devuelta. Es posible que sus muestras biológicas, así como su información médica y/o genética, puedan ser usadas para otros proyectos de investigación y análogos relacionados con la enfermedad de estudio. No podrán ser usados para estudios de investigación que estén relacionados en condiciones distintas a las estudiadas en este proyecto y estos estudios deberán ser sometidos a la aprobación por un comité de ética.

Sus muestras podrán ser almacenadas por investigadores hasta por 5 años.

Los códigos que identifican su muestra estarán solo disponibles a los investigadores titulares, quienes están obligados por la ley a no divulgar su identidad. Estos códigos serán guardados en un archivero con llave. Sólo los investigadores tendrán acceso a ellos.

Si usted decide retirarse del estudio, podrá solicitar el retiro y destrucción de su material biológico y de su información.

El Comité de Ética en investigación del INCMNSZ aprobó la realización de este estudio. Dicho comité es quien revisa, aprueba y supervisa los estudios en humanos en el Instituto. En el futuro si identificamos información que consideramos importante para su salud, consultaremos con el comité de Ética en Investigación para decidir la mejor forma de darle esta información a usted y a su médico.

Los datos científicos obtenidos como parte de este estudio podrían ser utilizados en publicaciones o presentaciones médicas. Su nombre y otra información personal serán eliminadas antes de utilizar sus datos. Si usted lo solicita su médico de cabecera será informado sobre su participación en el estudio.

Su material genético no será usado con fines distintos a los mencionados en este documento. Sus células no se utilizarán para la creación de líneas celulares inmortales. Si el investigador desea utilizarlos con fines distintos, deberá notificárselo y solicitarle su firma en un documento similar al que usted está leyendo, además de contar con la aprobación del Comité de Ética de Investigación.

Los resultados de los estudios genéticos no serán incluidos en su expediente del Instituto, a menos que tengan implicaciones para su tratamiento.

IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES

En caso de que usted sufra algún daño relacionado con el estudio, por favor póngase en contacto con Julio Granados Arriola del Departamento de Trasplantes del INCMNSZ (54850080)

Si usted tiene preguntas sobre el estudio, puede ponerse en contacto con Juan Jackez del Departamento de Reumatología del INCMNSZ (5522647724)

Si usted tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en el estudio, puede hablar con el presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ. Dr. Arturo Galindo Fraga (54870900 ext. 6101)

DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

He leído con cuidado este consentimiento informado, he hecho todas las preguntas que he tenido y todas han sido respondidas satisfactoriamente. Para poder participar en el estudio, estoy de acuerdo con todos los siguientes puntos:

Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito anteriormente.

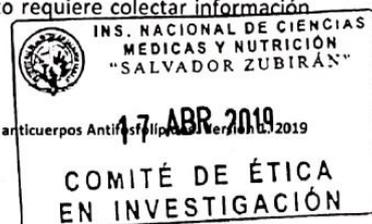
Los objetivos generales, particulares, del reclutamiento y los posibles daños e inconvenientes me han sido explicados.

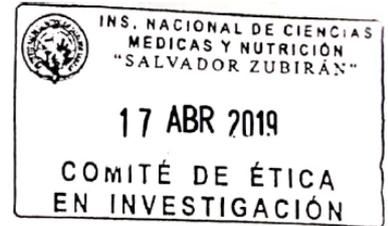
Estoy de acuerdo en donar de forma voluntaria mis muestras biológicas de sangre para ser utilizadas en este estudio. Así mismo, mi información médica y biológica podrá ser utilizada con los mismos fines.

Estoy de acuerdo, en caso de ser necesario, que se me contacte en el futuro si el proyecto requiere coleccionar información adicional o si encuentran información relevante para mi salud.

Mi firma también indica que he recibido un duplicado de este consentimiento informado.

Efecto de anticuerpos antipartículas lipídicas y genotipificación en pacientes con lupus eritematoso sistémico y con síndrome de anticuerpos Antifosfolípidos. Versión 1.0 2019





Declaración del paciente: Yo, _____
declaro que es mi decisión voluntaria participar como sujeto de investigación clínica en el estudio.

Se me ha informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento del estudio sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios. Si suspendo mi participación, recibiré el tratamiento médico habitual al que tengo derecho en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y no sufriré perjuicio en mi atención médica ni en futuros estudios de Investigación. Yo puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos o beneficios potenciales derivados de mi participación en este estudio. También puedo obtener los resultados de mis exámenes clínicos si así los solicito. Si tengo preguntas sobre el estudio, puedo ponerme en contacto con el Dr. Juan Jackez o el Dr. Julio Granados Arriola.

Debo informar a los investigadores de cualquier cambio en mi estado de salud (por ejemplo, uso de nuevos medicamentos, cambios en el consumo de tabaco) o en la ciudad donde resido, tan pronto como sea posible.

He leído y entendido toda la información que me han dado sobre mi participación en el estudio, He tenido la oportunidad de discutirlo y hacer preguntas. Todas las preguntas han sido respondidas a mi satisfacción. He entendido que recibiré una copia firmada de este consentimiento informado.

Tengo claro en caso de tener preguntas sobre mis derechos como sujeto de investigación clínica en este estudio, problemas, preocupaciones o dudas, y deseo obtener información adicional, o bien, hacer comentarios sobre el desarrollo del estudio, tengo la libertad de hablar con el presidente del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ, Arturo Galindo Fraga, tel.: 54870900 ext. 6101

Nombre del/de la Participante

Firma o huella digital del/ de la participante

Nombre del investigador que explicó el documento

Firma del Investigador

Nombre y firma del Testigo 1

Nombre y firma del testigo 2

Anexo 2. Criterios del Colegio Americano de Reumatología para la Clasificación del lupus eritematoso generalizado.

Entry criterion
Antinuclear antibodies (ANA) at a titer of $\geq 1:80$ on HEp-2 cells or an equivalent positive test (ever)



If absent, do not classify as SLE
If present, apply additive criteria



Additive criteria			
Do not count a criterion if there is a more likely explanation than SLE.			
Occurrence of a criterion on at least one occasion is sufficient.			
SLE classification requires at least one clinical criterion and ≥ 10 points.			
Criteria need not occur simultaneously.			
Within each domain, only the highest weighted criterion is counted toward the total score.			
Clinical domains and criteria	Weight	Immunology domains and criteria	Weight
Constitutional		Antiphospholipid antibodies	
Fever	2	Anti-cardiolipin antibodies OR	
Hematologic		Anti- $\beta 2$ GP1 antibodies OR	
Leukopenia	3	Lupus anticoagulant	2
Thrombocytopenia	4	Complement proteins	
Autoimmune hemolysis	4	Low C3 OR low C4	3
Neuropsychiatric		Low C3 AND low C4	4
Delirium	2	SLE-specific antibodies	
Psychosis	3	Anti-dsDNA antibody* OR	
Seizure	5	Anti-Smith antibody	6
Mucocutaneous			
Non-scarring alopecia	2		
Oral ulcers	2		
Subacute cutaneous OR discoid lupus	4		
Acute cutaneous lupus	6		
Serosal			
Pleural or pericardial effusion	5		
Acute pericarditis	6		
Musculoskeletal			
Joint involvement	6		
Renal			
Proteinuria >0.5 g/24h	4		
Renal biopsy Class II or V lupus nephritis	8		
Renal biopsy Class III or IV lupus nephritis	10		
Total score:			



Classify as Systemic Lupus Erythematosus with a score of 10 or more if entry criterion fulfilled.

Anexo 3: SLEDAI Escala de actividad en lupus eritematoso generalizado.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Escala de Actividad Lúpica

Nombre: _____

Parámetro	Puntaje	
Convulsiones	8	Reciente (excluir metabólico, drogas, infecciones)
Psicosis	8	Perturbación severa, percepción de la realidad, alucinación, incoherencia, disociación, catatonia
Síndrome orgánico cerebral	8	Alteración de funciones mentales/intelectual, pérdida de la conciencia, atención, incoherencia, insomnio, mareo
Trastornos visuales	8	Cambios en la retina por LES, excluir por HAS
Cefalea intensa	8	Cefalea intensa, persistente, migrañosa, no responde al tx
Trastorno de los pares craneales	8	Neuropatía motora. S.N.C
Evento cerebral vascular	8	Excluir HA, tromboembolia
Vasculitis	8	Ulceración, gangrena, nódulos blandos, infarto periungueal, biopsia (+)
Artritis	4	Articulaciones
Miositis	4	Mialgias, debilidad proximal
Cilindros urinarios	4	Hialinos, hematocitos, granulares en orina
Hematuria	4	>5g/campo
Proteinuria	4	>0.5mg/24 horas
Piuria	4	>5 leucocitos por campo
Eritema malar	2	Erupción en la piel, episodio nuevo o recurrente, Rash inflamatorio.
Alopecia	2	Nueva o recurrente
Úlceras en mucosas	2	Orales o nasales
Pleuresía	2	Dolor pleurítico +frote, engrosamiento pleural
Pericarditis	2	Dolor precordial +frote efusión, alteración del ECG, EGO
Hipocomplementemia	2	Disminución de C3 y C4
Aumento unión DNA	2	>25%
Fiebre	1	>38°C
Trombocitopenia	1	<100000/mm ³
Leucopenia	1	<3000/mm ³
Total		

Inactividad 0-2	Leve 2-4	Moderada 4-8	Severa o grave 8 ó >
-----------------	----------	--------------	----------------------

Anexo 4. Hoja de registro de datos sociodemográficos de los participantes.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Hoja de registro de datos sociodemográficos

Nombre del participante: _____

Además de su participación brindando una muestra agradeceremos en la medida de lo posible responda las siguientes preguntas con la debida sinceridad (enfaticando que sus datos serán tratados con la debida confidencialidad), si no recuerda el dato acerca del cual se le pregunta puede dejar el espacio en blanco.

Edad: _____, expediente: _____, Número de hospitalizaciones por LEG: _____

Ocupación: _____ Año de diagnóstico del lupus: _____

1. ¿Padece alguna otra enfermedad?

Sí _____ No _____

2. Si la respuesta fue si, ¿Cuál o Cuáles?

3. ¿Tiene algún pariente que haya sido diagnosticado con lupus?

Sí _____ No _____

4. Medicamentos que se administra actualmente:

Lugar de nacimiento del participante:

Lugar de nacimiento del padre:

Lugar de nacimiento de abuelo paterno:

Lugar de nacimiento de abuela paterna:

Lugar de nacimiento de la madre:

Lugar de nacimiento de abuelo materno:

Lugar de nacimiento de abuela materna:

Fecha de próxima cita:

Teléfono de contacto:

Correo electrónico:



The role of socioeconomic status in the susceptibility to develop systemic lupus erythematosus in Mexican patients

Norma Alicia Salgado-Galicia¹ · Susana Hernández-Doño¹ · Daniela Ruiz-Gómez² · Juan Jakez-Ocampo³ · Joaquín Zúñiga^{4,5} · Gilberto Vargas-Alarcón⁶ · Víctor Acuña⁷ · María Teresa Hernández⁸ · José Eduardo Márquez-García⁹ · Maricela García-Lechuga¹⁰ · Luis Llorente³ · Guadalupe Lima³ · Carlos Pineda¹¹ · Neng Yu¹² · Edmond Yunis¹³ · Julio Granados¹

Received: 8 October 2019 / Revised: 1 January 2020 / Accepted: 6 January 2020
© International League of Associations for Rheumatology (ILAR) 2020

Abstract

Introduction Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune inflammatory disorder for which Major Histocompatibility Complex (MHC) genes are well-identified as risk factors. SLE patients have different phenotypes or clinical presentations, which vary among Mexicans. This variation could be explained by ethnicity and admixture. Since socioeconomic status probably limits and change the patterns of migration, this factor could favor inbreeding and homogamy in some geographic areas. Consequently, it could alter or restrict the possibilities of admixture too. Therefore, the socioeconomic status may also have implications in the susceptibility and the clinical heterogeneity of SLE in Mexican patients.

Methods One hundred twenty-three SLE patients and 234 healthy individuals with Mexican admixed ancestry were recruited. HLA alleles were analyzed using the HLA typing method based on Sequence-based typing (SBT).

Results As expected, it was found an increased frequency of the HLA-DRB1*03:01 allele in all socioeconomic groups when compared with healthy individuals. The susceptibility allele found in the low-income SLE patients was HLA-DRB1*04:05 whereas, the susceptibility alleles for the high-income SLE patients were HLA-DRB1*07:01 (pC = 0.03, OR = 2.0) and HLA-DRB1*11:04 (pC = 0.0004, OR = 5.1). Additionally, the frequencies of two protective alleles HLA-DRB1*14:06 (pC = 0.01, OR = 0.28) and HLA-DRB1*16:02 (pC = 0.04, OR = 0.22) were found diminished. These findings correlate with the admixture differences between low-income and high-income SLE patients. The clinical manifestations showed a different distribution

Norma Alicia Salgado-Galicia and Susana Hernández-Doño contributed equally to this work.

✉ Julio Granados
julgrate@yahoo.com

Norma Alicia Salgado-Galicia
nasalgado@yahoo.com.mx

Susana Hernández-Doño
sumahd@hotmail.com

Daniela Ruiz-Gómez
daniirugo@gmail.com

Juan Jakez-Ocampo
jjakez_ocampo@yahoo.com

Joaquín Zúñiga
joazu@yahoo.com

Gilberto Vargas-Alarcón
gvargas63@yahoo.com

María Teresa Hernández
maritere.hermar.med@gmail.com

José Eduardo Márquez-García
je_mg@outlook.com

Maricela García-Lechuga
garlemari@hotmail.com

Luis Llorente
luisllorentepeters57@gmail.com

Guadalupe Lima
lupitalimag@yahoo.com

Carlos Pineda
carpineda@yahoo.com

Neng Yu
neng.yu@redcross.org

Edmond Yunis
edmond_yunis@dfci.harvard.edu

Extended author information available on the last page of the article



Heterogeneity of Genetic Admixture Determines SLE Susceptibility in Mexican

Susana Hernández-Doño¹, Juan Jakez-Ocampo², José Eduardo Márquez-García³, Daniela Ruiz⁴, Víctor Acuña-Alonzo⁵, Guadalupe Lima², Luis Llorente², Víctor Hugo Tovar-Méndez⁶, Rafael García-Silva⁷, Julio Granados^{1*}, Joaquín Zúñiga^{8,9} and Gilberto Vargas-Alarcón¹⁰

¹ Immunogenetics Division, Department of Transplant, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, ² Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, ³ Molecular Biology Core Facility, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico, ⁴ Department of Dermatology, Hospital General Dr. Manuel Gea González, Mexico City, Mexico, ⁵ Laboratory of Physiology, Biochemistry, and Genetics, Escuela Nacional de Antropología e Historia, Mexico City, Mexico, ⁶ Department of Endocrinology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, ⁷ Department of Internal Medicine, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico, ⁸ Laboratory of Immunobiology and Genetics, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Mexico City, Mexico, ⁹ Tecnológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Mexico City, Mexico, ¹⁰ Research Direction, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Elvira Galieva,
Novosibirsk State University, Russia

Reviewed by:

Cesar Fortes-Lima,
Uppsala University, Sweden
Francesca Lantieri,
University of Genoa, Italy

*Correspondence:

Julio Granados
julgrate@yahoo.com
orcid.org/0000-0001-8553-1027

Specialty section:

This article was submitted to
Evolutionary and Population Genetics,
a section of the journal
Frontiers in Genetics

Received: 27 April 2021

Accepted: 12 July 2021

Published: 03 August 2021

Citation:

Hernández-Doño S,
Jakez-Ocampo J, Márquez-García JE,
Ruiz D, Acuña-Alonzo V, Lima G,
Llorente L, Tovar-Méndez VH,
García-Silva R, Granados J, Zúñiga J
and Vargas-Alarcón G (2021)
Heterogeneity of Genetic Admixture
Determines SLE Susceptibility
in Mexican. *Front. Genet.* 12:701373.
doi: 10.3389/fgene.2021.701373

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune inflammatory disorder for which Major Histocompatibility Complex (MHC) genes are well identified as risk factors. SLE patients present different clinical phenotypes, which are partly explained by admixture patterns variation among Mexicans. Population genetic has insight into the high genetic variability of Mexicans, mainly described through HLA gene studies with anthropological and biomedical importance. A prospective, case-control study was performed. In this study, we recruited 146 SLE patients, and 234 healthy individuals were included as a control group; both groups were admixed Mexicans from Mexico City. The HLA typing methods were based on Next Generation Sequencing and Sequence-Based Typing (SBT). The data analysis was performed with population genetic programs and statistical packages. The admixture estimations based on HLA-B and -DRB1 revealed that SLE patients have a higher Southwestern European ancestry proportion ($48 \pm 8\%$) than healthy individuals ($30 \pm 7\%$). In contrast, Mexican Native American components are diminished in SLE patients ($44 \pm 1\%$) and augmented in Healthy individuals ($63 \pm 4\%$). HLA alleles and haplotypes' frequency analysis found variants previously described in SLE patients from Mexico City. Moreover, a conserved extended haplotype that confers risk to develop SLE was found, the HLA-A*29:02~C*16:01~B*44:03~DRB1*07:01~DQB1*02:02, $pC = 0.02$, $OR = 1.41$. Consistent with the admixture estimations, the origin of all risk alleles and haplotypes found in this study are European, while the protection alleles are Mexican Native American. The analysis of genetic distances supported that the SLE patient

REFERENCIAS

1. Sánchez-Vegazo I, Teruel Ca, Menéndez J. Nefritis lúpica. *Rev Esp Patol*; 2002. p. 269-278.
2. Ghodke-Puranik Y, Niewold TB. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun.* Nov 2015;64:125-36. doi:10.1016/j.jaut.2015.08.00.
3. Carter EE, Barr SG, Clarke AE. The global burden of SLE: prevalence, health disparities and socioeconomic impact. *Nat Rev Rheumatol.* Oct 2016;12(10):605-20. doi:10.1038/nrrheum.2016.137
4. Atisha-Fregoso Y, Jakez-Ocampo J, Llorente L. Systemic lupus erythematosus in Hispanics. *Autoimmunity.* Nov 2011;44(7):555-61. doi:10.3109/08916934.2011.592882
5. Izmirly PM, Wan I, Sahl S, et al. The Incidence and Prevalence of Systemic Lupus Erythematosus in New York County (Manhattan), New York: The Manhattan Lupus Surveillance Program. *Arthritis Rheumatol.* Oct 2017;69(10):2006-2017. doi:10.1002/art.40192
6. Tsokos GC, Lo MS, Costa Reis P, Sullivan KE. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol.* Nov 22 2016;12(12):716-730. doi:10.1038/nrrheum.2016.186
7. Alarcón-Riquelme ME, Ziegler JT, Molineros J, et al. Genome-Wide Association Study in an Amerindian Ancestry Population Reveals Novel Systemic Lupus Erythematosus Risk Loci and the Role of European Admixture. *Arthritis Rheumatol.* Apr 2016;68(4):932-43. doi:10.1002/art.39504
8. Furukawa H, Kawasaki A, Oka S, et al. Human leukocyte antigens and systemic lupus erythematosus: a protective role for the HLA-DR6 alleles DRB1*13:02 and *14:03. *PLoS One.* 2014;9(2):e87792. doi:10.1371/journal.pone.0087792
9. Molineros JE, Looger LL, Kim K, et al. Amino acid signatures of HLA Class-I and II molecules are strongly associated with SLE susceptibility and autoantibody production in Eastern Asians. *PLoS Genet.* Apr 2019;15(4):e1008092. doi:10.1371/journal.pgen.1008092
10. Vargas-Alarcón G, Salgado N, Granados J, et al. Class II allele and haplotype frequencies in Mexican systemic lupus erythematosus patients: the relevance of considering homologous chromosomes in determining susceptibility. *Hum Immunol.* Aug 2001;62(8):814-20. doi:10.1016/s0198-8859(01)00267-1
11. Vasconcelos C, Carvalho C, Leal B, et al. HLA in Portuguese systemic lupus erythematosus patients and their relation to clinical features. *Ann N Y Acad Sci.* Sep 2009;1173:575-80. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04873.x
12. Moreno-Estrada A, Gignoux CR, Fernández-López JC, et al. Human genetics. The genetics of Mexico recapitulates Native American substructure and affects biomedical traits. *Science.* Jun 13 2014;344(6189):1280-5. doi:10.1126/science.1251688
13. Barquera R, Hernández-Zaragoza DI, Bravo-Acevedo A, et al. The immunogenetic diversity of the HLA system in Mexico correlates with underlying population genetic structure. *Hum Immunol.* Jul 7 2020;doi:10.1016/j.humimm.2020.06.008
14. Salgado-Galicia NA, Hernández-Doño S, Ruiz-Gómez D, et al. The role of socioeconomic status in the susceptibility to develop systemic lupus erythematosus in Mexican patients. *Clin Rheumatol.* Jul 2020;39(7):2151-2161. doi:10.1007/s10067-020-04928-5
15. Sepúlveda Delgado J, R DL, MJ OS, et al. Role of the HLA-DRB1*15 and HLA-DRB1*16 alleles in the genetic susceptibility to develop systemic lupus erythematosus (SLE) after Chikungunya and Zika viruses infection in Mexico. *Blood and Genomics*; 2018. p. 233-236.
16. Barquera R, Juárez-Nicolás F, Martínez-Álvarez JC, et al. Genetic diversity of HLA system in two populations from Chiapas, Mexico: Tuxtla Gutiérrez and rural Chiapas. *Hum Immunol.* Sep 2020;81(9):563-565. doi:10.1016/j.humimm.2019.07.285
17. Barquera R, Martínez-Álvarez JC, Hernández-Zaragoza DI, et al. Genetic diversity of HLA system in six populations from Mexico City Metropolitan Area, Mexico: Mexico City North, Mexico City South, Mexico City East, Mexico City West, Mexico City Center and rural Mexico City. *Hum Immunol.* Sep 2020;81(9):539-543. doi:10.1016/j.humimm.2019.07.297

18. Barquera R, Zuniga J, Flores-Rivera J, et al. Diversity of HLA Class I and Class II blocks and conserved extended haplotypes in Lacandon Mayans. *Sci Rep.* Feb 24 2020;10(1):3248. doi:10.1038/s41598-020-58897-5
19. Lupus_Foundation_of_America. Lupus facts and statistics. Lupus Foundation of America. Accessed November 2021, 2021. <https://www.lupus.org/resources/lupus-facts-and-statistics>
20. Wallace D, Hahn B. Dubois' Lupus Erythematosus and related syndromes. 9th Edition ed. ELSEVIER; 2018.
21. Deng Y, Tsao BP. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol.* Dec 2010;6(12):683-92. doi:10.1038/nrrheum.2010.176
22. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* Sep 2019;71(9):1400-1412. doi:10.1002/art.40930
23. Zakharova MY, Belyanina TA, Sokolov AV, Kiselev IS, Mamedov AE. The Contribution of Major Histocompatibility Complex Class II Genes to an Association with Autoimmune Diseases. *Acta Naturae.* Oct-Dec 2019;11(4):4-12. doi:10.32607/20758251-2019-11-4-4-12
24. Murphy K, Weaver C. Janeway's Immunobiology. Ninth ed. Garland Science, Taylor & Francis Group; 2017.
25. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. 10th Edition ed. 2021.
26. Parcej D, Tampé R. ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition. *Nat Chem Biol.* Aug 2010;6(8):572-80. doi:10.1038/nchembio.410
27. Neefjes J, Ovaa H. A peptide's perspective on antigen presentation to the immune system. *Nat Chem Biol.* Dec 2013;9(12):769-75. doi:10.1038/nchembio.1391
28. Punt J, Stranford SA, Jones PP, Owen JA. Kuby Immunology. Eighth edition ed. New York : Macmillan Education; 2019.
29. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Inmunología de Kuby. Sexta Edición ed. McGraw-Hill Interamericana; 2007.
30. Lefranc MP, Duprat E, Kaas Q, Tranne M, Thiriot A, Lefranc G. IMGT unique numbering for MHC groove G-DOMAIN and MHC superfamily (MhcSF) G-LIKE-DOMAIN. *Dev Comp Immunol.* 2005;29(11):917-38. doi:10.1016/j.dci.2005.03.003
31. Al-Motwee S, Jawdat D, Jehani GS, et al. Association of HLA-DRB1*15 and HLADQB1*06 with SLE in Saudis. *Ann Saudi Med.* May-Jun 2013;33(3):229-34. doi:10.5144/0256-4947.2013.229
32. Xue K, Niu WQ, Cui Y. Association of HLA-DR3 and HLA-DR15 Polymorphisms with Risk of Systemic Lupus Erythematosus. *Chin Med J (Engl).* Dec 5 2018;131(23):2844-2851. doi:10.4103/0366-6999.246058
33. Peñaranda-Parada E, Quintana G, Yunis JJ, et al. Clinical, serologic, and immunogenetic characterization (HLA-DRB1) of late-onset lupus erythematosus in a Colombian population. *Lupus.* Oct 2015;24(12):1293-9. doi:10.1177/0961203315588576
34. 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.* Sep 1992;40(3):128-33. doi:10.1111/j.1399-0039.1992.tb02104.x
35. Mohd-Yusuf Y, Phipps ME, Chow SK, Yeap SS. HLA-A*11 and novel associations in Malays and Chinese with systemic lupus erythematosus. *Immunol Lett.* Sep 30 2011;139(1-2):68-72. doi:10.1016/j.imlet.2011.05.001
36. Rood MJ, van Krugten MV, Zanelli E, et al. TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* Jan 2000;43(1):129-34. doi:10.1002/1529-0131(200001)43:1<129::aid-anr16>3.0.co;2-s
37. Granados J, Vargas-Alarcón G, Drenkard C, et al. Relationship of anticardiolipin antibodies and antiphospholipid syndrome to HLA-DR7 in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Lupus.* 1997;6(1):57-62. doi:10.1177/096120339700600108

38. 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. doi:10.1080/03009749850154410
39. Liu Z, Yu Y, Yue Y, et al. Genetic Alleles Associated with SLE Susceptibility and Clinical Manifestations in Hispanic Patients from the Dominican Republic. *Curr Mol Med*. 2019;19(3):164-171. doi:10.2174/1566524019666190424130809
40. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, et al. Derivation of the sledai. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis & Rheumatism*. 1992;35(6):630-640. doi:10.1002/art.1780350606
41. Guzmán J, Cardiel MH, Arce-Salinas A, Sánchez-Guerrero J, Alarcón-Segovia D. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices. *J Rheumatol*. Oct 1992;19(10):1551-8.
42. Zúñiga J, Yu N, Barquera R, et al. HLA class I and class II conserved extended haplotypes and their fragments or blocks in Mexicans: implications for the study of genetic diversity in admixed populations. *PLoS One*. 2013;8(9):e74442. doi:10.1371/journal.pone.0074442
43. Robinson J. IMGT/HLA Database--a sequence database for the human major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(1):210-213. doi:10.1093/nar/29.1.210
44. Lebedeva TV, Mastromarino SA, Lee E, Ohashi M, Alosco SM, Yu N. Resolution of HLA class I sequence-based typing ambiguities by group-specific sequencing primers. *Tissue Antigens*. Mar 2011;77(3):247-50. doi:10.1111/j.1399-0039.2010.01616.x
45. Allele Calling. In: Rédei GP, ed. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*. Springer Netherlands; 2008:60-60.
46. Epi Info™, a database and statistics program for public health professionals. CDC. 2011.
47. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*. May 2010;10(3):564-7. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
48. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. Jun 1992;48(2):361-72.
49. Wang J. Maximum-likelihood estimation of admixture proportions from genetic data. *Genetics*. Jun 2003;164(2):747-65.
50. Arnaiz-Villena A, Vargas-Alarcón G, Areces C, et al. Mixtec Mexican Amerindians: an HLA alleles study for America peopling, pharmacogenomics and transplantation. *Immunol Invest*. 2014;43(8):738-55. doi:10.3109/08820139.2014.926369
51. García-Ortiz JE, Sandoval-Ramírez L, Rangel-Villalobos H, et al. High-resolution molecular characterization of the HLA class I and class II in the Tarahumara Amerindian population. *Tissue Antigens*. Aug 2006;68(2):135-46. doi:10.1111/j.1399-0039.2006.00636.x
52. Enrich E, Campos E, Martorell L, et al. HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 allele and haplotype frequencies: An analysis of umbilical cord blood units at the Barcelona Cord Blood Bank. *Hla*. Oct 2019;94(4):347-359. doi:10.1111/tan.13644
53. Mack SJ, Meyer D, Single RM, Sanchez-Mazas A, Thomson G, Erlich HA. 13th International Histocompatibility Workshop Anthropology/Human Genetic Diversity Joint Report: introduction and overview. *Int. Histocompatibility Working Group Press*; 2006:560-563.
54. Trachtenberg E, Vinson M, Hayes E, et al. HLA class I (A, B, C) and class II (DRB1, DQA1, DQB1, DPB1) alleles and haplotypes in the Han from southern China. *Tissue Antigens*. Dec 2007;70(6):455-63. doi:10.1111/j.1399-0039.2007.00932.x
55. Hollenbach JA, Thomson G, Cao K, et al. HLA diversity, differentiation, and haplotype evolution in Mesoamerican Natives. *Hum Immunol*. Apr 2001;62(4):378-90. doi:10.1016/s0198-8859(01)00212-9
56. Single RM, Meyer D, Nunes K, et al. Demographic history and selection at HLA loci in Native Americans. *PLoS One*. 2020;15(11):e0241282. doi:10.1371/journal.pone.0241282

57. Furuzawa-Carballeda J, Zuñiga J, Hernández-Zaragoza DI, et al. An original Eurasian haplotype, HLA-DRB1*14:54-DQB1*05:03, influences the susceptibility to idiopathic achalasia. *PLoS One*. 2018;13(8):e0201676. doi:10.1371/journal.pone.0201676
58. Szilágyi A, Bánlaki Z, Pozsonyi E, et al. Frequent occurrence of conserved extended haplotypes (CEHs) in two Caucasian populations. *Mol Immunol*. Jun 2010;47(10):1899-904. doi:10.1016/j.molimm.2010.03.013
59. Becker J, Haas SL, Mokrowiecka A, et al. The HLA-DQB1 insertion is a strong achalasia risk factor and displays a geospatial north-south gradient among Europeans. *Eur J Hum Genet*. Aug 2016;24(8):1228-31. doi:10.1038/ejhg.2015.262
60. Verne GN, Hahn AB, Pineau BC, Hoffman BJ, Wojciechowski BW, Wu WC. Association of HLA-DR and -DQ alleles with idiopathic achalasia. *Gastroenterology*. Jul 1999;117(1):26-31. doi:10.1016/s0016-5085(99)70546-9
61. Booy JD, Takata J, Tomlinson G, Urbach DR. The prevalence of autoimmune disease in patients with esophageal achalasia. *Dis Esophagus*. Apr 2012;25(3):209-13. doi:10.1111/j.1442-2050.2011.01249.x
62. Kumar N, Kaur G, Tandon N, Kanga U, Mehra NK. Genomic evaluation of HLA-DR3+ haplotypes associated with type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. Apr 2013;1283:91-6. doi:10.1111/nyas.12019
63. Kaur G, Kumar N, Szilágyi A, et al. Autoimmune-associated HLA-B8-DR3 haplotypes in Asian Indians are unique in C4 complement gene copy numbers and HSP-2 1267A/G. *Hum Immunol*. Sep 2008;69(9):580-7. doi:10.1016/j.humimm.2008.06.007
64. Alper CA, Awdeh ZL, Yunis EJ. Complotypes, extended haplotypes, male segregation distortion, and disease markers. *Hum Immunol*. Apr 1986;15(4):366-73. doi:10.1016/0198-8859(86)90013-3
65. Awdeh ZL, Raum D, Yunis EJ, Alper CA. Extended HLA/complement allele haplotypes: evidence for T/t-like complex in man. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 1983;80(1):259-63. doi:10.1073/pnas.80.1.259
66. Cortes LM, Baltazar LM, Lopez-Cardona MG, et al. HLA class II haplotypes in Mexican systemic lupus erythematosus patients. *Hum Immunol*. Dec 2004;65(12):1469-76. doi:10.1016/j.humimm.2004.09.008
67. Bravo-Acevedo A, Escobedo-Ruiz A, Barquera R, et al. Genetic diversity of HLA system in six populations from Jalisco, Mexico: Guadalajara city, Tlajomulco, Tlaquepaque, Tonalá, Zapopan and rural Jalisco. *Hum Immunol*. Sep 2020;81(9):502-505. doi:10.1016/j.humimm.2019.05.012
68. Black CM, Welsh KI, Fielder A, Hughes GR, Batchelor JR. HLA antigens and Bf allotypes in SLE: evidence for the association being with specific haplotypes. *Tissue Antigens*. Feb 1982;19(2):115-20. doi:10.1111/j.1399-0039.1982.tb01426.x
69. Picceli VF, Skare TL, Nisihara RM, Nass FR, Messias-Reason IT, Utiyama SR. BF*F allotype of the alternative pathway of complement: A marker of protection against the development of antiphospholipid antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. Apr 2016;25(4):412-7. doi:10.1177/0961203315615222
70. Wescott MZ, Awdeh ZL, Yunis EJ, Alper CA. Molecular analysis distinguishes two HLA-DR3-bearing major histocompatibility complex extended haplotypes. *Immunogenetics*. 1987;26(6):370-4. doi:10.1007/bf00343707
71. Morris DL, Taylor KE, Fernando MM, et al. Unraveling multiple MHC gene associations with systemic lupus erythematosus: model choice indicates a role for HLA alleles and non-HLA genes in Europeans. *Am J Hum Genet*. Nov 2 2012;91(5):778-93. doi:10.1016/j.ajhg.2012.08.026
72. Partanen J, Koskimies S, Johansson E. C4 null phenotypes among lupus erythematosus patients are predominantly the result of deletions covering C4 and closely linked 21-hydroxylase A genes. *J Med Genet*. Jun 1988;25(6):387-91. doi:10.1136/jmg.25.6.387
73. Mišunová M, Svitálková T, Pleštilová L, et al. Molecular markers of systemic autoimmune disorders: the expression of MHC-located HSP70 genes is significantly associated with autoimmunity development. *Clin Exp Rheumatol*. Jan-Feb 2017;35(1):33-42.

74. Dorak MT, Shao W, Machulla HK, et al. Conserved extended haplotypes of the major histocompatibility complex: further characterization. *Genes Immun.* Sep 2006;7(6):450-67. doi:10.1038/sj.gene.6364315
75. Ramírez-Bello J, Cadena-Sandoval D, Mendoza-Rincón JF, et al. Tumor necrosis factor gene polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus susceptibility or lupus nephritis in Mexican patients. *Immunol Res.* Jun 2018;66(3):348-354. doi:10.1007/s12026-018-8993-8
76. Zúñiga J, Vargas-Alarcón G, Hernández-Pacheco G, Portal-Celhay C, Yamamoto-Furusho JK, Granados J. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Genes Immun.* Nov 2001;2(7):363-6. doi:10.1038/sj.gene.6363793
77. Romero-Hidalgo S, Flores-Rivera J, Rivas-Alonso V, et al. Native American ancestry significantly contributes to neuromyelitis optica susceptibility in the admixed Mexican population. *Sci Rep.* Aug 13 2020;10(1):13706. doi:10.1038/s41598-020-69224-3
78. Rosas-Madrigal S, Villarreal-Molina MT, Flores-Rivera J, et al. Interaction of HLA Class II rs9272219 and TMPO rs17028450 (Arg690Cys) Variants Affects Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder Susceptibility in an Admixed Mexican Population. *Front Genet.* 2021;12:647343. doi:10.3389/fgene.2021.647343
79. Handunnetthi L, Ramagopalan SV, Ebers GC. Multiple sclerosis, vitamin D, and HLA-DRB1*15. *Neurology.* Jun 8 2010;74(23):1905-10. doi:10.1212/WNL.0b013e3181e24124
80. Gorodezky C, Najera R, Rangel BE, et al. Immunogenetic profile of multiple sclerosis in Mexicans. *Hum Immunol.* Aug 1986;16(4):364-74. doi:10.1016/0198-8859(86)90063-7
81. Alvarenga MP, do Carmo LF, Vasconcelos CCF, et al. Neuromyelitis optica is an HLA associated disease different from Multiple Sclerosis: a systematic review with meta-analysis. *Sci Rep.* Jan 8 2021;11(1):152. doi:10.1038/s41598-020-80535-3
82. Graciano-Machuca O, Alvarado-Navarro A, Ramírez-Dueñas MG, et al. Diversity of KIR/HLA Genotypes and Their Association with Psoriasis Vulgaris in the Western Mexican Population. *Genes (Basel).* Mar 22 2020;11(3)doi:10.3390/genes11030338
83. Tan KN, Medak H, Cohen L, Burlakow P. Focal epithelial hyperplasia in a Mexican Indian. *Arch Dermatol.* Oct 1969;100(4):474-7.
84. Lopez-Villanueva ME, Conde-Ferrález L, Ayora-Talavera G, Cerón-Espinosa JD, González-Losa Mdel R. Human papillomavirus 13 in a Mexican Mayan community with multifocal epithelial hyperplasia: could saliva be involved in household transmission? *Eur J Dermatol.* May-Jun 2011;21(3):396-400. doi:10.1684/ejd.2011.1347
85. Seligman VA, Lum RF, Olson JL, Li H, Criswell LA. Demographic differences in the development of lupus nephritis: a retrospective analysis. *Am J Med.* Jun 15 2002;112(9):726-9. doi:10.1016/s0002-9343(02)01118-x
86. Lanata CM, Nititham J, Taylor KE, et al. Genetic contributions to lupus nephritis in a multi-ethnic cohort of systemic lupus erythematosus patients. *PLoS One.* 2018;13(6):e0199003. doi:10.1371/journal.pone.0199003
87. Pons-Estel BA, Catoggio LJ, Cardiel MH, et al. The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus: ethnic and disease heterogeneity among "Hispanics". *Medicine (Baltimore).* Jan 2004;83(1):1-17. doi:10.1097/01.md.0000104742.42401.e2
88. Grundy HO, Peltz G, Moore KW, Golbus MS, Jackson LG, Lebo RV. The polymorphic Fc gamma receptor II gene maps to human chromosome 1q. *Immunogenetics.* 1989;29(5):331-9. doi:10.1007/bf00352843
89. Dietzsch E, Osman N, McKenzie IF, Garson OM, Hogarth PM. The human FCG1 gene encoding the high-affinity Fc gamma RI maps to chromosome 1q21. *Immunogenetics.* 1993;38(4):307-9. doi:10.1007/bf00188811

90. Takai S, Kasama M, Yamada K, et al. Human high-affinity Fc gamma RI (CD64) gene mapped to chromosome 1q21.2-q21.3 by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet.* Jan 1994;93(1):13-5. doi:10.1007/bf00218905
91. Peltz GA, Grundy HO, Lebo RV, Yssel H, Barsh GS, Moore KW. Human Fc gamma RIII: cloning, expression, and identification of the chromosomal locus of two Fc receptors for IgG. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 1989;86(3):1013-7. doi:10.1073/pnas.86.3.1013
92. de Wit TP, Suijkerbuijk RF, Capel PJ, van Kessel AG, van de Winkel JG. Assignment of three human high-affinity Fc gamma receptor I genes to chromosome 1, band q21.1. *Immunogenetics.* 1993;38(1):57-9. doi:10.1007/bf00216392
93. Li X, Ptacek TS, Brown EE, Edberg JC. Fc gamma receptors: structure, function and role as genetic risk factors in SLE. *Genes Immun.* Jul 2009;10(5):380-9. doi:10.1038/gene.2009.35
94. Brooks DG, Qiu WQ, Luster AD, Ravetch JV. Structure and expression of human IgG FcRII(CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. *J Exp Med.* Oct 1 1989;170(4):1369-85. doi:10.1084/jem.170.4.1369
95. Anderson CL, Shen L, Eicher DM, Wewers MD, Gill JK. Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes. *J Exp Med.* Apr 1 1990;171(4):1333-45. doi:10.1084/jem.171.4.1333
96. Gillooly DJ, Allen JM. The human high affinity IgG receptor (Fc gamma RI) signals through the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) of the gamma chain of Fc epsilon RI. *Biochem Soc Trans.* May 1997;25(2):215s. doi:10.1042/bst025215s
97. van Vugt MJ, Heijnen IA, Capel PJ, et al. FcR gamma-chain is essential for both surface expression and function of human Fc gamma RI (CD64) in vivo. *Blood.* May 1 1996;87(9):3593-9.
98. Tridandapani S, Siefker K, Teillaud J-L, Carter JE, Wewers MD, Anderson CL. Regulated Expression and Inhibitory Function of Fc gamma RIIB in Human Monocytic Cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2002;277(7):5082-5089. doi:10.1074/jbc.m110277200
99. Green JM, Schreiber AD, Brown EJ. Role for a glycan phosphoinositol anchor in Fc gamma receptor synergy. *J Cell Biol.* Dec 1 1997;139(5):1209-17. doi:10.1083/jcb.139.5.1209
100. Lu J, Chu J, Zou Z, Hamacher NB, Rixon MW, Sun PD. Structure of Fc gamma RI in complex with Fc reveals the importance of glycan recognition for high-affinity IgG binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2015;112(3):833-838. doi:10.1073/pnas.1418812112
101. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc gamma receptors: old friends and new family members. *Immunity.* Jan 2006;24(1):19-28. doi:10.1016/j.immuni.2005.11.010
102. Hulett MD, Hogarth PM. Molecular basis of Fc receptor function. *Adv Immunol.* 1994;57:1-127. doi:10.1016/s0065-2776(08)60671-9
103. Allen JM, Seed B. Isolation and expression of functional high-affinity Fc receptor complementary DNAs. *Science.* Jan 20 1989;243(4889):378-81. doi:10.1126/science.2911749
104. Stuart SG, Trounstine ML, Vaux DJ, et al. Isolation and expression of cDNA clones encoding a human receptor for IgG (Fc gamma RII). *J Exp Med.* Dec 1 1987;166(6):1668-84. doi:10.1084/jem.166.6.1668
105. Stengelin S, Stamenkovic I, Seed B. Isolation of cDNAs for two distinct human Fc receptors by ligand affinity cloning. *Embo j.* Apr 1988;7(4):1053-9.
106. Peltz GA, Trounstine ML, Moore KW. Cloned and expressed human Fc receptor for IgG mediates anti-CD3-dependent lymphoproliferation. *J Immunol.* Sep 15 1988;141(6):1891-6.
107. Ravetch JV, Perussia B. Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med.* Aug 1 1989;170(2):481-97. doi:10.1084/jem.170.2.481
108. Perussia B, Ravetch JV. Fc gamma RIII (CD16) on human macrophages is a functional product of the Fc gamma RIII-2 gene. *Eur J Immunol.* Feb 1991;21(2):425-9. doi:10.1002/eji.1830210226
109. Quilliam AL, Osman N, McKenzie IF, Hogarth PM. Biochemical characterization of murine Fc gamma RI. *Immunology.* Mar 1993;78(3):358-63.

110. Hulett MD, Osman N, McKenzie IF, Hogarth PM. Chimeric Fc receptors identify functional domains of the murine high affinity receptor for IgG. *J Immunol.* Sep 15 1991;147(6):1863-8.
111. Hulett MD, Hogarth PM. The second and third extracellular domains of Fc γ RI (CD64) confer the unique high affinity binding of IgG2a. *Mol Immunol.* Oct 1998;35(14-15):989-96. doi:10.1016/s0161-5890(98)00069-8
112. Lu J, Ellsworth JL, Hamacher N, Oak SW, Sun PD. Crystal Structure of Fc γ Receptor I and Its Implication in High Affinity γ -Immunoglobulin Binding. *Journal of Biological Chemistry.* 2011;286(47):40608-40613. doi:10.1074/jbc.m111.257550
113. Shen L, Guyre PM, Fanger MW. Polymorphonuclear leukocyte function triggered through the high affinity Fc receptor for monomeric IgG. *J Immunol.* Jul 15 1987;139(2):534-8.
114. Quayle JA, Watson F, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophils from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis express the high affinity immunoglobulin G receptor, Fc γ RI (CD64): role of immune complexes and cytokines in induction of receptor expression. *Immunology.* Jun 1997;91(2):266-73. doi:10.1046/j.1365-2567.1997.00249.x
115. Kurosaki T, Gander I, Wirthmueller U, Ravetch JV. The beta subunit of the Fc epsilon RI is associated with the Fc gamma RIII on mast cells. *J Exp Med.* Feb 1 1992;175(2):447-51. doi:10.1084/jem.175.2.447
116. Bewarder N, Weinrich V, Budde P, et al. In vivo and in vitro specificity of protein tyrosine kinases for immunoglobulin G receptor (Fc γ RII) phosphorylation. *Mol Cell Biol.* Sep 1996;16(9):4735-43. doi:10.1128/mcb.16.9.4735
117. Ramsland PA, Farrugia W, Bradford TM, et al. Structural basis for Fc gammaRIIa recognition of human IgG and formation of inflammatory signaling complexes. *J Immunol.* Sep 15 2011;187(6):3208-17. doi:10.4049/jimmunol.1101467
118. Fridman WH, Teillaud JL, Bouchard C, et al. Soluble Fc gamma receptors. *J Leukoc Biol.* Nov 1993;54(5):504-12.
119. de la Salle C, Esposito-Farese ME, Bieber T, et al. Release of soluble Fc gamma RII/CD32 molecules by human Langerhans cells: a subtle balance between shedding and secretion? *J Invest Dermatol.* Nov 1992;99(5):15s-17s. doi:10.1111/1523-1747.ep12668250
120. Shashidharamurthy R, Zhang F, Amano A, et al. Dynamics of the Interaction of Human IgG Subtype Immune Complexes with Cells Expressing R and H Allelic Forms of a Low-Affinity Fc Receptor CD32A. 2009;183(12):8216-8224. doi:10.4049/jimmunol.0902550
121. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc γ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol.* Jan 2008;8(1):34-47. doi:10.1038/nri2206
122. Morris AB, Farley CR, Pinelli DF, et al. Signaling through the Inhibitory Fc Receptor Fc γ RIIB Induces CD8(+) T Cell Apoptosis to Limit T Cell Immunity. *Immunity.* Jan 14 2020;52(1):136-150.e6. doi:10.1016/j.immuni.2019.12.006
123. Daëron M, Latour S, Malbec O, et al. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity.* Nov 1995;3(5):635-46. doi:10.1016/1074-7613(95)90134-5
124. Tzeng SJ, Li WY, Wang HY. Fc γ RIIB mediates antigen-independent inhibition on human B lymphocytes through Btk and p38 MAPK. *J Biomed Sci.* Oct 16 2015;22:87. doi:10.1186/s12929-015-0200-9
125. Li X, Wu J, Carter RH, et al. A novel polymorphism in the Fc γ RIIB (CD32B) transmembrane region alters receptor signaling. *Arthritis Rheum.* Nov 2003;48(11):3242-52. doi:10.1002/art.11313
126. Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, et al. Fc γ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: contribution of FCGR2B to genetic susceptibility. *Arthritis Rheum.* May 2002;46(5):1242-54. doi:10.1002/art.10257
127. Floto RA, Clatworthy MR, Heilbronn KR, et al. Loss of function of a lupus-associated Fc γ RIIB polymorphism through exclusion from lipid rafts. *Nat Med.* Oct 2005;11(10):1056-8. doi:10.1038/nm1288

128. Kono H, Kyogoku C, Suzuki T, et al. FcγRIIB Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling. *Hum Mol Genet*. Oct 1 2005;14(19):2881-92. doi:10.1093/hmg/ddi320
129. Su K, Wu J, Edberg JC, et al. A promoter haplotype of the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing FcγRIIb alters receptor expression and associates with autoimmunity. I. Regulatory FCGR2B polymorphisms and their association with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. Jun 1 2004;172(11):7186-91. doi:10.4049/jimmunol.172.11.7186
130. Su K, Li X, Edberg JC, Wu J, Ferguson P, Kimberly RP. A promoter haplotype of the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing FcγRIIb alters receptor expression and associates with autoimmunity. II. Differential binding of GATA4 and Yin-Yang1 transcription factors and correlated receptor expression and function. *J Immunol*. Jun 1 2004;172(11):7192-9. doi:10.4049/jimmunol.172.11.7192
131. Su K, Wu J, Edberg JC, et al. A Promoter Haplotype of the Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif-Bearing FcγRIIb Alters Receptor Expression and Associates with Autoimmunity. I. Regulatory FCGR2B Polymorphisms and Their Association with Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology*. 2004;172(11):7186-7191. doi:10.4049/jimmunol.172.11.7186
132. Tsang-A-Sjoe MWP, Nagelkerke SQ, Bultink IEM, et al. Fc-gamma receptor polymorphisms differentially influence susceptibility to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Rheumatology*. 2016;55(5):939-948. doi:10.1093/rheumatology/kev433
133. Bolland S, Ravetch JV. Spontaneous autoimmune disease in Fc(γ)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity*. Aug 2000;13(2):277-85. doi:10.1016/s1074-7613(00)00027-3
134. Fleit HB, Wright SD, Unkeless JC. Human neutrophil Fc gamma receptor distribution and structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 1982;79(10):3275-9. doi:10.1073/pnas.79.10.3275
135. Kulczycki A, Jr. Human neutrophils and eosinophils have structurally distinct Fc gamma receptors. *J Immunol*. Aug 1984;133(2):849-54.
136. Lanier LL, Ruitenberg JJ, Phillips JH. Functional and biochemical analysis of CD16 antigen on natural killer cells and granulocytes. *J Immunol*. Nov 15 1988;141(10):3478-85.
137. Gessner JE, Grussenmeyer T, Dumbsky M, Schmidt RE. Separate promoters from proximal and medial control regions contribute to the natural killer cell-specific transcription of the human FcγRIII-A (CD16-A) receptor gene. *J Biol Chem*. Nov 29 1996;271(48):30755-64. doi:10.1074/jbc.271.48.30755
138. Victor AR, Weigel C, Scoville SD, et al. Epigenetic and Posttranscriptional Regulation of CD16 Expression during Human NK Cell Development. *J Immunol*. Jan 15 2018;200(2):565-572. doi:10.4049/jimmunol.1701128
139. Meknache N, Jönsson F, Laurent J, Guinépain M-T, Daéron M. Human Basophils Express the Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Low-Affinity IgG Receptor FcγRIIIB (CD16B). *The Journal of Immunology*. 2009;182(4):2542-2550. doi:10.4049/jimmunol.0801665
140. Marois L, Pare G, Vaillancourt M, Rollet-Labelle E, Naccache PH. Fc RIIb Triggers Raft-dependent Calcium Influx in IgG-mediated Responses in Human Neutrophils. 2011;286(5):3509-3519. doi:10.1074/jbc.m110.169516
141. Alemán OR, Mora N, Cortes-Vieyra R, Uribe-Querol E, Rosales C. Differential Use of Human Neutrophil Fcγ Receptors for Inducing Neutrophil Extracellular Trap Formation. *J Immunol Res*. 2016;2016:2908034. doi:10.1155/2016/2908034
142. Stroncek D. Neutrophil alloantigens. *Transfus Med Rev*. Jan 2002;16(1):67-75. doi:10.1053/tmrv.2002.29406
143. Matsuo K, Procter J, Stroncek D. Variations in genes encoding neutrophil antigens NA1 and NA2. *Transfusion*. Jun 2000;40(6):645-53. doi:10.1046/j.1537-2995.2000.40060645.x

144. Flesch BK, Doose S, Siebert R, Ntambi E, Neppert J. FCGR3 variants and expression of human neutrophil antigen-1a, -1b, and -1c in the populations of northern Germany and Uganda. *Transfusion*. Apr 2002;42(4):469-75. doi:10.1046/j.1525-1438.2002.00087.x
145. Tong Y, Jin J, Yan L, Neppert J, Marget M, Flesch BK. FCGR3B gene frequencies and FCGR3 variants in a Chinese population from Zhejiang Province. *Ann Hematol*. Sep 2003;82(9):574-8. doi:10.1007/s00277-003-0725-y
146. Blum KS, Tong Y, Siebert R, et al. Evidence for gene recombination in FCGR3 gene variants. *Vox Sang*. Jul 2009;97(1):69-76. doi:10.1111/j.1423-0410.2009.01178.x
147. Covas DT, Kashima S, Guerreiro JF, dos Santos SE, Zago MA. Variation in the Fc gamma R3B gene among distinct Brazilian populations. *Tissue Antigens*. Feb 2005;65(2):178-82. doi:10.1111/j.1399-0039.2005.00352.x
148. Santos VC, Grecco M, Pereira KM, Terzian CC, Andrade LE, Silva NP. Fc gamma receptor IIIb polymorphism and systemic lupus erythematosus: association with disease susceptibility and identification of a novel FCGR3B*01 variant. *Lupus*. Oct 2016;25(11):1237-43. doi:10.1177/0961203316636952
149. Bux J, Stein EL, Bierling P, et al. Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil Fc gamma receptor IIIb. *Blood*. Feb 1 1997;89(3):1027-34.
150. Marnell LL, Mold C, Volzer MA, Burlingame RW, Du Clos TW. C-reactive protein binds to Fc gamma RI in transfected COS cells. *J Immunol*. Aug 15 1995;155(4):2185-93.
151. Bodman-Smith KB, Melendez AJ, Campbell I, Harrison PT, Allen JM, Raynes JG. C-reactive protein-mediated phagocytosis and phospholipase D signalling through the high-affinity receptor for immunoglobulin G (Fc gamma RI). *Immunology*. Oct 2002;107(2):252-60. doi:10.1046/j.1365-2567.2002.01481.x
152. Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II. *J Exp Med*. Aug 16 1999;190(4):585-90. doi:10.1084/jem.190.4.585
153. Chruscinski A, Sadozai H, Rojas-Luengas V, et al. Role of Regulatory T Cells (Treg) and the Treg Effector Molecule Fibrinogen-like Protein 2 in Alloimmunity and Autoimmunity. *Rambam Maimonides Med J*. Jul 30 2015;6(3)doi:10.5041/rmmj.10209
154. Bruhns P, Iannascoli B, England P, et al. Specificity and affinity of human Fc gamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. 2009;113(16):3716-3725. doi:10.1182/blood-2008-09-179754
155. Radaev S, Motyka S, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Sun PD. The structure of a human type III Fc gamma receptor in complex with Fc. *J Biol Chem*. May 11 2001;276(19):16469-77. doi:10.1074/jbc.M100350200
156. Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*. 2002/08/01 2002;2(8):580-592. doi:10.1038/nri856
157. Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U. The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature*. Jul 20 2000;406(6793):267-73. doi:10.1038/35018508
158. Wines BD, Powell MS, Parren PW, Barnes N, Hogarth PM. The IgG Fc Contains Distinct Fc Receptor (FcR) Binding Sites: The Leukocyte Receptors Fc gamma RI and Fc gamma RIIa Bind to a Region in the Fc Distinct from That Recognized by Neonatal FcR and Protein A. *The Journal of Immunology*. 2000;164(10):5313-5318. doi:10.4049/jimmunol.164.10.5313
159. Geuijen KPM, Oppers-Tiemiessen C, Egging DF, et al. Rapid screening of IgG quality attributes - effects on Fc receptor binding. *FEBS Open Bio*. 2017;7(10):1557-1574. doi:10.1002/2211-5463.12283
160. Ortega LM, Schultz DR, Lenz O, Pardo V, Contreras GN. Review: Lupus nephritis: pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions. *Lupus*. Apr 2010;19(5):557-74. doi:10.1177/0961203309358187

161. Li LH, Yuan H, Pan HF, Li WX, Li XP, Ye DQ. Role of the Fc γ receptor IIIA-V/F158 polymorphism in susceptibility to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis. *Scand J Rheumatol*. Mar 2010;39(2):148-54. doi:10.3109/03009740903292304
162. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. Aug 1 2006;22(15):1928-9. doi:10.1093/bioinformatics/btl268
163. Excoffier L, Laval G, Balding D. Gametic phase estimation over large genomic regions using an adaptive window approach. *Hum Genomics*. Nov 2003;1(1):7-19. doi:10.1186/1479-7364-1-1-7
164. Bux J, Stein EL, Santoso S, Mueller-Eckhardt C. NA gene frequencies in the German population, determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Transfusion*. Jan 1995;35(1):54-7. doi:10.1046/j.1537-2995.1995.35195090663.x
165. Bonegio RG, Lin JD, Beaudette-Zlatanova B, York MR, Menn-Josephy H, Yasuda K. Lupus-Associated Immune Complexes Activate Human Neutrophils in an Fc γ RIIA-Dependent but TLR-Independent Response. *J Immunol*. Feb 1 2019;202(3):675-683. doi:10.4049/jimmunol.1800300
166. Nishi H, Mayadas TN. Neutrophils in lupus nephritis. *Curr Opin Rheumatol*. Mar 2019;31(2):193-200. doi:10.1097/bor.0000000000000577
167. Arman M, Krauel K. Human platelet IgG Fc receptor Fc γ RIIA in immunity and thrombosis. *J Thromb Haemost*. Jun 2015;13(6):893-908. doi:10.1111/jth.12905
168. Alemán OR, Mora N, Cortes-Vieyra R, Uribe-Querol E, Rosales C. Transforming Growth Factor- β -Activated Kinase 1 Is Required for Human Fc γ RIIIb-Induced Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Front Immunol*. 2016;7:277. doi:10.3389/fimmu.2016.00277