

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA



ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO +49 (A/G) EN EL
EXON 1 DEL GEN CTLA-4 CON LA SUSCEPTIBILIDAD A
LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO EN PACIENTES
BOLIVIANOS

Tesis de grado para optar al Grado de Licenciatura en Bioquímica con mención en genética

POR: CLAUDIA CECILIA BARRETO CHÁVEZ

TUTOR: Dr. LUIS FERNANDO SOSA TORDOYA, Esp.

LA PAZ – BOLIVIA
MAYO, 2017

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA



ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO +49 (A/G) EN EL
EXON 1 DEL GEN CTLA-4 CON LA SUSCEPTIBILIDAD A
LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO EN PACIENTES
BOLIVIANOS

Tesis de grado para optar al Grado de Licenciatura en Bioquímica con mención en
genética

POR: CLAUDIA CECILIA BARRETO CHÁVEZ

LA PAZ – BOLIVIA
MAYO, 2017

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA

Tesis de grado:

ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO +49 (A/G) EN
EL EXON 1 DEL GEN CTLA-4 CON LA
SUSCEPTIBILIDAD A LUPUS ERITEMATOSO
SISTEMICO EN PACIENTES BOLIVIANOS

Presentada por: Claudia Cecilia Barreto Chávez

Para optar el grado académico de *Licenciado en Bioquímica*

Nota numeral:.....

Nota literal:.....

Ha sido:.....

Director de Carrera de Bioquímica: Dr. Bernado Torrico Arzady

Tutor: Dr. Luis Fernando Sosa Tordoya, Esp.

Tribunal: Dra. Carmiña Heidy García Rodríguez

Tribunal: Dr. Sergio Cabrera Calzadilla

Tribunal: Dra. Natalia Nuñez del Prado Alanes

Dedicado a:

Mis Abuelos Rogelia, Julio, Manuel y Daria

Agradecimientos

*Gracias a Dios
por ser mi guía y darme las fuerzas para realizar este trabajo.*

*Gracias a mi familia
por su apoyo económico y sobre todo moral.*

Gracias al doctor Luis Fernando Sosa Tordoya por ser mi maestro que con paciencia, confianza y amistad fue mi guía durante la elaboración de este trabajo.

*Gracias a los doctores José L. Choque huanca y Sergio Cabrera
Por su amistad y colaboración desinteresada*

Gracias a mi amiga y compañera de investigación Julieta Luna por todo los momentos compartidos, la ayuda y su compañía durante la investigación.

Gracias al Instituto SELADIS por permitirme aprender y darme la oportunidad de formar parte de su familia.

A la Asociación de Pacientes lúpicos ASBOLUP por su buena voluntad, entusiasmo y colaboración, porque sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

Gracias a mis amigos Edwin Choque y Richard Quispe por toda su ayuda, a Rocio, Melissa, Gloria, Silvana, Rodney, René, Alison y Alejandra por sus palabras de aliento en los momentos más oportunos.

Tabla de Contenidos

I.	INTRODUCCION.....	1
II.	MARCO TEORICO.....	2
A.	Generalidades.....	2
B.	Historia de la enfermedad	3
C.	Epidemiología	5
D.	Etiología.....	6
1.	Factores Ambientales	6
a)	Infecciones Virales.....	6
b)	Radiación Ultravioleta	7
c)	Fármacos	8
2.	Factores genéticos	8
3.	Factores Hormonales.....	9
4.	Auto anticuerpos.....	10
a)	Anticuerpos anti nucleares	10
b)	Anti ADN de doble cadena	10
c)	Anticuerpos anti Smith.....	11
d)	Anticuerpos anti histonas	11
E.	Tipos de Lupus.....	11
1.	Lupus Eritematoso Sistémico	11
2.	Lupus Eritematoso Discoide	12
3.	Lupus Inducido por Fármacos	13
4.	Lupus neonatal	14
F.	Manifestaciones clínicas	15
1.	Nefritis lúpica	16
G.	Criterios de Diagnóstico.....	18
H.	Tratamiento	20
I.	CTLA-4.....	20
1.	Funciones del CTLA-4	21
a)	Señalización negativa.....	22
b)	Antagonismo competitivo de la vía CD28/B7	22
c)	Factores celulares intrínsecos.....	23

2.	Genética.....	23
3.	Polimorfismo +49 (A/G)	24
J.	Reacción en cadena de la polimerasa por restricción enzimática	25
III.	ANTECEDENTES GENERALES SOBRE EL PROBLEMA.....	27
IV.	JUSTIFICACIÓN	29
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
VI.	HIPOTESIS.....	31
VII.	OBJETIVOS	31
A.	Objetivo general	31
B.	Objetivos específicos	31
VIII.	DISEÑO METODOLOGICO.....	31
A.	Tipo de estudio.....	31
B.	Población en estudio	32
IX.	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA.....	32
A.	Criterios de inclusión	32
B.	Criterios de exclusión.....	32
C.	Criterios de eliminación	32
D.	Material biológico	32
E.	Tamaño de la muestra	33
F.	Aspectos éticos.....	33
X.	CONTEXTO Y LUGAR	33
A.	Métodos.....	33
1.	Obtención del material genético	33
2.	Reacción en cadena de la polimerasa	34
3.	Restricción enzimática por Kpn I.....	35
4.	Electroforesis de los productos de digestión enzimática.....	35
5.	Análisis estadístico	35
XI.	RESULTADOS.....	36
A.	Comparación de las características clínicas reportadas por la población de pacientes durante el curso de la enfermedad.	38
B.	Optimización del PCR-RFLP para la determinación del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4.....	39
C.	Frecuencia genotípica del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 en pacientes con LES y pacientes aparentemente sanos.	42

D.	Frecuencia alélica del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 en pacientes con LES y pacientes aparentemente sanos.....	43
E.	Asociación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 en pacientes lúpicos y manifestaciones clínicas durante la enfermedad.	44
F.	Asociación de las frecuencias alélicas con del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 en pacientes lúpicos y con las manifestaciones durante la enfermedad.	46
XII.	DISCUSIÓN	48
XIII.	CONCLUSIONES	53
XIV.	RECOMENDACIONES	54
XV.	BIBLIOGRAFIA	55

Índice de Figuras

Figura 1: Lesiones cutáneas en forma de mordida de lobo.....	3
Figura 2: Características clínicas del lupus eritematoso sistémico	12
Figura 3: Síntomas comunes del lupus neonatal.....	15
Figura 4 Activación de los Linfocitos Th y la producción de citoquinas	21
Figura 5: Función inhibitoria del CTLA-4.....	22
Figura 6: Gen CTLA-4.....	23
Figura 7: Fundamento de la técnica de reacción en cadena de la polimersa.....	25
Figura 8: Sitio de corte de la enzima Kpn I	26
Figura 9: Distribución del sexo en el grupo de pacientes lúpicos.....	36
Figura 10: Distribución de la edad en paciente lúpicos de sexo femenino.	37
Figura 11: Comparación de distribución de la edad en las pacientes de sexo femenino incorporadas en el estudio como caso o control.....	38
Figura 12: Fotografía de la corrida electroforética del primer ensayo para la optimización de PCR del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4.....	40
Figura 13: Fotografía de la electroforesis de los productos de digestión enzimática con Kpn I que determina el polimorfismo +49 (A/G) gel gen CTLA-4.....	42

Índice de Tablas

Tabla 1: Fármacos descritos como inductores de lupus eritematoso sistémico inducido por fármacos.....	13
Tabla 2: Manifestaciones clínicas en el lupus eritematoso sistémico.....	16
Tabla 3: Clasificación de la Nefritis lúpica según la Sociedad Internacional de Nefrología/ Sociedad de Patología Renal	17
Tabla 4: Criterios de clasificación para lupus eritematoso sistémico según el Colegio Americano de reumatología.	18
Tabla 5: Comparación de la frecuencia de las manifestaciones clínicas en pacientes LES al momento de diagnóstico y durante la enfermedad.....	39
Tabla 6: Modificación realizada en el protocolo de preparación de Mix para PCR propuesto por Imen Sfar y cols.	41
Tabla 7: Comparación entre el protocolo de termociclado propuesto por Imen y cols. y protocolo optimizado	41
Tabla 8: Comparación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 en pacientes con LES y grupo control.....	43
Tabla 9: Comparación de las frecuencias alélicas del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 en pacientes con LES y grupo control.....	43
Tabla 10: Asociación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 en pacientes lúpicos con las manifestaciones clínicas.	45
Tabla 11: Asociación de las frecuencias alélicas del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 en pacientes lúpicos con las manifestaciones clínicas.	46

Resumen

El Lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad crónica autoinmune que puede afectar a cualquier órgano, y puede ser desencadenado por factores de tipo ambiental, inmunológico, hormonal y genético. Se han propuesto varios genes como factores predisponentes a LES entre ellos el gen que codifica el antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4). En el presente estudio se evaluó la asociación entre el polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 con la susceptibilidad a LES y sus manifestaciones clínicas. Se incluyeron 80 pacientes con diagnóstico de LES (grupo de casos) y 80 pacientes aparentemente sanos (grupo control). Los pacientes lúpicos cumplían con al menos cuatro de los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR). Todos los individuos involucrados en el estudio dieron su consentimiento para participar en el mismo. El polimorfismo genético y alélico del gen CTLA-4 fue determinado mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa por restricción enzimática (PCR-RFLP). La asociación entre el polimorfismo genético y alélico del CTLA-4 con lupus y las manifestaciones clínicas se realizó mediante las pruebas de CHI cuadrado y Odds Ratio (OR).

El genotipo G/G del CTLA-4 fue más frecuente en el grupo de pacientes lúpicos (21.25%) que en controles (7.5%), triplicando el riesgo en las personas de desarrollar la enfermedad. Desde el punto de vista del polimorfismo alélico, el alelo G (OR=1,79; IC=1.11-2.88) fue más frecuente en los pacientes que en población sana. Se observó que el genotipo A/G es un factor de riesgo para el desarrollo de serositis (OR=3.31; IC=1.12-9.78), nefropatía lúpica (OR=7,41; IC=2.53-21.72) y alteraciones hematológicas (OR=3.20; IC=1.16-8.84), siendo a su vez un factor de protección frente a la sensibilidad a la radiación solar (OR=0.29; IC=0.09-0.95) y úlceras orales (OR=0.32; IC=0.10-0.68). También, se evidenció que la presencia del genotipo A/A en pacientes lúpicos que si bien incrementa la probabilidad de riesgo a desarrollar sensibilidad a la luz solar (OR=4.73; IC=1.67-13.38), es un factor protector tanto para el desarrollo de nefritis lúpica (OR=0.28; IC=0.11-0.70) como para alteraciones hematológicas (OR=0.27; IC=0.10-0.68).

Con el presente trabajo se puede concluir que existe asociación entre el polimorfismo genético y alélico del gen CTLA-4 con la susceptibilidad a lupus y sus manifestaciones

clínicas como ser: sensibilidad a la luz solar, nefritis lúpica, serositis, úlceras orales y alteraciones hematológicas en pacientes bolivianos.

Palabras clave: LES, CTLA-4, nefritis lúpica

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease that can affect any organ, and can be triggered by environmental, immune, hormonal and genetics factors. Several genes have been proposed as predisposing factors among them the encoding associated antigen 4 cytotoxic T lymphocyte (CTLA-4) gene. In the present study the association between polymorphism +49 (A/G) of CTLA-4 gene with susceptibility to SLE and its clinical features was evaluated. 80 patients diagnosed with SLE (case group) and 80 apparently healthy patients (control group) were included. The lupus patients met at least four of the American College of Rheumatology (ACR) criteria. All individuals involved in the study gave their consent to participate in it. The allelic and genetic polymorphism of CTLA-4 gene was determined by the polymerase chain reaction by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP PCR) technique. The association between genetic and allelic polymorphism of CTLA-4 with lupus and its clinical features was performed by using chi square test and Odds Ratio (OR).

Genotype G/G of CTLA-4 was more frequent in the group of lupus patients (21.25%) than in controls (7.5%), tripling the risk of people developing the disease. From the point of view of allelic polymorphism, the G allele (OR=1.79; CI=1.11-2.88) was more frequent in patients than in healthy people. It was observed that the genotype A/G is a risk factor for the development of serositis (OR=3.31; CI=1.12-9.78), lupus nephritis (OR=7.41; CI=2.53-21.72) blood disorders (OR=3.20, CI=1.16-8.84), being itself a protective factor against sunlight sensitivity (OR=0.29; CI=0.09-0.95) and oral ulcers (OR=0.32; CI=0.10-0.68). It was also shown that the presence of genotype A/A in lupus patients but increases the likelihood of risk to develop sensitivity to sunlight (OR=4.73; CI=1.67-13.38), but is a protective factor against the development of nephritis lupus (OR=0.28, CI=0.11-0.70) and hematological disorders (OR=0.27, CI=0.10-0.68).

With this study we can conclude that there is an association between genetic and allelic polymorphism of CTLA-4 gene with the susceptibility to lupus and its clinical manifestations such as: sunlight sensitivity, lupus nephritis, serositis, oral ulcers and hematological alterations in bolivian patients.

Key words: LES, CTLA-4, lupus nephritis

I. INTRODUCCION

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad crónica de tipo autoinmune que se caracteriza por la producción de autoanticuerpos y puede afectar a cualquier tejido o sistema del organismo. La incidencia y prevalencia de la enfermedad varía según el área geográfica y la etnia estudiada, se caracteriza por afectar en su mayoría a mujeres. (Eriquez, 2013)

Las manifestaciones clínicas del LES son muy variadas, como: la presencia de lesiones cutáneas, artritis lúpica, alteraciones hematológicas, disfunciones cardíacas, pulmonares, renales, sistema nervioso central, etc.

El desarrollo de la enfermedad puede estar influenciado por factores: ambientales, inmunológicos, genéticos y hormonales. Actualmente, se han postulado a varios genes que se asocian con el desarrollo de la enfermedad, uno de ellos es el gen CTLA-4 cuyo polimorfismo a nivel de la posición +49 (A/G) ha sido asociado con la susceptibilidad a LES en diferentes poblaciones. (Liu & Zhang, 2013)

El presente estudio pretende establecer si el polimorfismo del gen CTLA-4 +49 (A/G) en población boliviana implica o no riesgo de padecer lupus o algunas de las manifestaciones clínicas de esta enfermedad. Este conocimiento podría contribuir a encontrar marcadores genéticos en nuestra población que permitan predecir el riesgo a padecer la enfermedad de manera más temprana en pacientes en riesgo contribuyendo de esta manera a mejorar la calidad de vida de los pacientes.

II. MARCO TEORICO

A. Generalidades

El lupus es una enfermedad inflamatoria de etiología desconocida, en la que se produce daño celular y tisular por auto anticuerpos y se caracteriza por cursar con un amplio espectro de manifestaciones clínicas. (Jiménez, y otros, 2011)

La palabra lupus (que significa lobo en latín) hacía referencia en épocas pasadas a la erupción que aparece en ocasiones en la cara de estos pacientes las cuales a los médicos les recordaba la apariencia de algunas marcas blancas en la cara del lobo. (De la Osa & Rodríguez, 2013)

Los primeros estudios de la enfermedad, realizados a principios del siglo XIX, se relacionaron con la afectación de la piel. En 1872, el doctor Kaposi (dermatólogo de Viena), notó que los pacientes también presentaban compromiso de órganos internos (riñón, corazón, pulmón, etc.). En 1890 el doctor William Osler, demostró que se podían encontrar enfermos sin lesiones de la piel pero con deterioro de órganos internos.

En 1948 un hecho trascendental en la historia del diagnóstico diferencial de Lupus Eritematoso fue el descubrimiento de la célula LE, permitiendo que la enfermedad se diagnosticara con mayor frecuencia. Actualmente, este marcador de laboratorio ha sido reemplazado por los anticuerpos antinucleares (ANA) y anti cuerpos anti ADN-doble cadena (ds-ADN), que son pruebas menos laboriosas, de mayor utilidad para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad. (López, 1990)

En los últimos años hubo avances importantes, principalmente en relación con aspectos genéticos y terapéuticos de la enfermedad, con el descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos y el desarrollo de la industria farmacéutica para el adecuado manejo de las afecciones autoinmunes reumáticas. Se espera que en el futuro nuevos descubrimientos

permitan mejorar el conocimiento sobre el lupus y de esta manera incrementar la calidad de vida de los enfermos y muy posiblemente curar la enfermedad. (Reyes, 2016)

B. Historia de la enfermedad

Antiguamente la expresión en latín *cáncer* que significa cangrejo se utilizaba para describir las ulceraciones de tipo corrosivo en cualquier parte del cuerpo.

La palabra latina *lupus* que significa lobo fue utilizada durante el siglo XIV para describir a una enfermedad ulcerosa en la piel. Durante el siglo XVI Paracelsus comparó la úlceras con la mordida de un lobo hambriento comiendo carne. Pasado el siglo XVII escritores médicos comenzaron a utilizar el término lupus para el diagnóstico diferencial de úlceras en el rostro y la nariz. Sin embargo, no fue sino hasta el siglo XIX que Willan y Bateman estandarizaron el término lupus para referirse a erupciones nodulares que a veces progresaban a úlceras que comúnmente se veían en el rostro (Potter, 1993)



Figura 1: Lesiones cutáneas en forma de mordida de lobo.

En 1838 Laurent Theodore Bielt introdujo el término eritema centrífugo que corresponde a la forma discoide de la enfermedad, y en 1851 el dermatólogo Perre Cazenave fue el primero en proponer el término “lupus eritematoso” para la afección con presencia del eritema centrífugo.

En 1872 Kaposi reconoció como síndrome a la enfermedad sistémica acompañada de la erupción de lupus y en 1875 Ferdinand von Hebra y Moritz Kaposi, diferenciaron el lupus discoide de la variedad generalizada, a la cual denominaron "agregada" (Holubar, 2006)

Treinta y cuatro años después Libman y Sacks describieron una forma atípica de endocarditis verrucosa que ocurrieron en una serie de pacientes que fallecieron por lupus, de los cuales dos presentaban erupción facial. En 1941 Klemperer mencionó que los hallazgos histopatológicos de las lesiones causadas por lupus fueron caracterizados como necrosis fibrinoide y que el daño resultante era responsable de anormalidades en el sistema vascular, cardíaco, renal y otras afecciones del lupus diseminado. (Potter, 1993)

Años más tarde Hargraves y sus colaboradores observaron el fenómeno de la célula de lupus eritematoso en extendidos de médula ósea de pacientes con la enfermedad. Este acontecimiento marco el inicio de la explicación de la posible naturaleza de la enfermedad e hizo posible distinguir la el lupus sistémico de la forma discoide mediante una prueba de laboratorio conocida como célula LE.

Otro importante avance en el diagnóstico comenzó en 1907 con el descubrimiento de un anticuerpo en la sangre de los pacientes con sífilis que era detectable mediante una nueva técnica de fijación de complemento cuyo sustrato eran células hepáticas. Más tarde la positividad no específica de esta prueba para sífilis en pacientes lúpicos fue asociada con la presencia de auto anticuerpos contra el núcleo de varias células.

El tratamiento de la enfermedad en un principio consistía en la administración de quinina, en 1951 se hizo la primera mención del uso de mepacrina en lupus eritematoso con resultados exitosos. En esa década se incluyó la cloroquina pero su uso fue rápidamente cortado cuando se reportaron numerosos casos de daño en la retina.

Más adelante se introdujo la hidroxicloroquina como tratamiento que obtuvo buenos resultados en los casos de lupus cutáneo, no obstante, es potencialmente toxico para el ojo. Con los años la industria farmacéutica fue capaz de brindar nuevas alternativas para el tratamiento de la enfermedad. (Potter, 1993)

C. Epidemiología

La incidencia y prevalencia del LES varían en función del área geográfica y de la etnia analizada (más elevadas en Europa y Australia que en Estados Unidos). Afecta con más frecuencia y gravedad a ciertas etnias, como los nativos indígenas americanos, orientales y afroamericanos.

En población latina española, Sánchez afirma que el lupus afecta cada año aproximadamente 50 o 60 pacientes por cada 100.000 habitantes. (Sánchez, Catillo, & García, 2010). Por otra parte, Jiménez indica que la prevalencia estimada de LES en población española varía de 34-91 por 100.000 personas, y la incidencia de 2/100.000 habitantes cada año. (Jiménez, y otros, 2011)

En los Estados Unidos se ha estimado una incidencia de 5,1 por 100.000 habitantes por año y una prevalencia de 52 por 100.000 habitantes. En países de Europa occidental la incidencia oscila entre 2,2 a 4,7 por 100.000 habitantes por año, siendo de hasta un 22 por 100.000 habitantes por año en individuos de raza afro-caribeña que habitan en el Reino Unido. Con respecto a la prevalencia, en el oeste de Europa las cifras oscilan entre 28 a 71 por 100.000 (Gómez & Cervera, 2008)

En Chile en el año 2011 el Dr. Francisco Radrigán, miembro de la Sociedad Chilena de Reumatología, en entrevista al Diario “La Hora”, indicó que en su país se estimaba entre 10.000 y 12.000 los casos de pacientes con Lupus (Álvarez, Ampuero, Barrientos, González, & Gonzales, 2012)

De acuerdo a un boletín epidemiológico emitido por la secretaria de salud en México se ha estimado que de 1.8 a 7.6 casos por 100 000 habitantes/año, con una edad de inicio entre los 17 y 35 años, con una relación mujer: varón de 10:1, y esta relación es menos marcada cuando la enfermedad inicia en edad pediátrica o después de los 60 años. (Nucamendi, Guillén, & Sánchez, 2013)

D. Etiología

El lupus es una enfermedad inflamatoria crónica que puede afectar a cualquier órgano o sistema del organismo y puede ser desencadenado por diferentes factores: ambientales, genéticos y hormonales. Además se caracteriza por la producción de auto anticuerpos que pueden dañar cualquier tejido propio del organismo, es por eso que se considera al LES como una enfermedad autoinmune.

1. Factores Ambientales

Se han descrito diversos factores ambientales como potenciales desencadenantes de la enfermedad, entre ellos se destacan agentes infecciosos, principalmente los de origen vírico, agentes químicos (medicamentos), agentes físicos (radiación UV), etc. (Virella, 2007)

a) Infecciones Virales

Se ha sugerido a los virus por su potencial de activar células B, o liberar auto antígenos, como factores desencadenantes, o exacerbantes de la enfermedad. Sin embargo, la evidencia que apoya un origen infeccioso vírico del LES es débil. (Anaya, Shoenfeld, Correa, García, & Cervera, 2005)

De acuerdo a los datos obtenidos por el grupo latinoamericano de estudio de lupus (GLADEL), las infecciones son la primera causa directa de muerte (30-60 % de los casos), esto debido a la dificultad que existe para distinguir entre la exacerbación de la enfermedad y una infección aguda haciendo que el diagnóstico correcto y el tratamiento representen un desafío para el clínico. (Enberg, y otros, 2009)

El virus Epstein-Bar (EBV) fue presentado como un factor ambiental en el desarrollo del lupus, diversos estudios en modelo animal han planteado el mimetismo molecular como principal mecanismo para explicar el rol del EBV en el desarrollo de lupus.

Estudios han demostrado que la infección por Virus Epstein-Bar (VEB) puede contribuir con la patogénesis o etiología del lupus, a causa del mimetismo molecular entre la región 60 KD de la proteína Sm RO con el antígeno nuclear EBNA-1 del virus. (Cooper, y otros, 2009).

Una infección muy frecuente en paciente lúpicos esa causada por el virus herpes zoster (HZV). Numerosos estudios reportaron una incidencia elevada de HZV en pacientes con lupus con relación a la población general, con un rango de 16 a 22 casos por 1000 pacientes por año. (Chen, y otros, 2011)

Otros virus que pueden afectar a pacientes con LES son: citomegalovirus y parvovirus B19 produciendo síntomas como fiebre, artralgias, malestar general, erupción cutánea y linfadenopatías que fácilmente pueden ser confundidos con un brote de lupus. (Muñoz, Pinto, Velasquez, Márquez, & Restrepo, 2013)

Recientemente algunos estudios han sugerido que el virus linfotrópico de células T humano (HTLV) tipo I y II podría ser el desencadenante de algunas enfermedades inflamatorias articulares a (síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, polimiositis y LES), ya que induce una respuesta proliferativa linfocítica exuberante en el sistema inmune. Por este motivo, ha sido implicado como agente inductor de la autoinmunidad. (Souza, y otros, 2011)

b) Radiación Ultravioleta

Es conocido que la exposición prolongada al sol puede causar lesiones. En los pacientes con lupus las lesiones en la piel pueden ser mucho más graves e incluso la radiación ultravioleta puede ser un desencadenante de la enfermedad.

Aunque no se conoce con exactitud cuál es el mecanismo por el que los pacientes con LES tienen fotosensibilidad. Estudios han planteado que la exposición a dosis de radiación ultravioleta (RUV) de tipo UVA, UVB e incluso luz visible induce la apoptosis en los queratinocitos y de esta forma se convierte en un desencadenante de las lesiones cutáneas.

Por otro lado la RUV induce a la producción de IL-1 y TNF por parte de las células epidérmicas lo que conlleva a la activación de los linfocitos T y a la expresión de moléculas de adhesión en los queratinocitos. (Bielsa & Rodríguez, 2010)

La lesión cutánea más común y visible es el eritema malar en forma de “alas de mariposa” que cubre las mejillas parte de la frente y el tabique nasal, aunque en ocasiones puede extenderse al cuello y los hombros. En la mayor parte de los casos el rash malar es fotoinducido y suele desaparecer en pocas semanas sin dejar cicatrices, en casos muy graves suele prescribirse corticoides tópicos para tratar la urticaria. (Bielsa & Rodríguez, 2010)

c) Fármacos

El lupus inducido por fármacos (LEIF) tiene síntomas característicos como: fiebre, mialgias, artralgias, pérdida de peso y serositis. Los fármacos definitivamente asociados a lupus inducido por fármacos son: clorpromacina, metildopa, procainamida, isoniacida, monociclina, quinidina y hidralacina. No obstante el número de fármacos implicados se incrementa constantemente, más adelante en la tabla 1 se enlistan los distintitos medicamentos implicados con el desarrollo de LIF. (Aguirre, López, & Cuadrado, 2010)

2. Factores genéticos

La existencia del componente genético en el desarrollo del lupus se fundamenta principalmente en estudios de agregación familiar. El lupus puede heredarse de padre enfermo a hijo y esto ocurre en el 1 al 2% de los casos (Sánchez, Catillo, & García, 2010). Entre hermanos con enfermedad existe aproximadamente 30 veces más probabilidad de desarrollar la enfermedad, en comparación a los individuos sin hermanos enfermos.

La concordancia de la enfermedad en gemelos monocigóticos varía entre 25 y 50% y en gemelos dicigóticos es del 5% lo que sugiere que la predisposición genética juega un rol importante en el desarrollo del LES. (Eriquez, 2013)

Desde el punto de vista genético esta enfermedad está caracterizada por alteraciones a nivel de diferentes genes, los cuales contribuyen a la susceptibilidad a la patología. En la actualidad, se han reportado varios genes asociados al lupus dentro de los cuales se

incluyen los genes que codifican proteínas para el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), la cascada del complemento, la activación de las células B, componentes de las vías de señalización del interferón tipo I y las proteínas de transducción de señales en las células B y T (BLK, BANK1, PTPN22, PDCD1 y CTLA-4). (Velázquez, y otros, 2012).

3. *Factores Hormonales*

Debido a que el lupus se presenta con una frecuencia del 80 a 90% en mujeres principalmente en edad reproductiva, durante décadas se ha investigado el papel de las hormonas en el desarrollo de la enfermedad. (Bertsias, Cervera, & Dimitrios, 2012)

Varios de los estudios al respecto fueron realizados en modelo murino, como los estudios realizados por el Dr. Norman Talal quien demostró que el lupus es diez veces más frecuente en mujeres ya que las hormonas sexuales producen mayor reactividad inmunológica. Observó que en un modelo murino B/W de lupus, las hormonas sexuales modulaban la expresión de la autoinmunidad y afectaban la mortalidad, concentración de anticuerpos contra los ácidos nucleicos y el grado de la glomerulonefritis. (Talal, 1979)

Lahita y colaboradores en 1979, sugirieron que los paciente con LES tiene patrones anormales del metabolismo de estradiol con incremento de la 16 -hidroxiestriona (-OHE) aumentando la actividad del estrógeno. (Lahita, H., & Fishman, 1981)

Conociendo la asociación de los estrógenos con el lupus, en diversos estudios surgió la preocupación de la comunidad médica sobre el uso de anticonceptivos orales y la posible relación con la exacerbación de la enfermedad.

En la década de los 80, un grupo de investigadores de la universidad de Rockefeller de Nueva York investigaron sobre el metabolismo de los estrógenos y la acción de uno de sus metabolitos, la 16 -hidroxiestriona (-OHE) en pacientes lúpicos de ambos sexos y en dos grupos de mujeres aparentemente sanas, que consumían anticonceptivos orales y las que no los consumían. Observaron que los niveles elevados de 16 -OHE correlacionaron con la presencia de anticuerpos anti-estrógenos en las mujeres que consumían anticonceptivos y en los pacientes con lupus de ambos sexos con presencia de

actividad de la enfermedad, y concluyeron que la presencia de anticuerpos anti-estrógenos puede contribuir la exacerbación del lupus. (Peñaranda, y otros, 2011).

Durante la última década en estudios en modelo murino se estableció que el estrógeno o la prolactina pueden favorecer la maduración de linfocitos B auto reactivos, como ejemplo se observó que en mujeres que usan anticonceptivos orales se incrementa 1,9 veces el riesgo de desarrollar LES con respecto a las mujeres que no tomaban estrógenos como anticonceptivos. (Bertsias, Cervera, & Dimitrios, 2012)

4. *Auto anticuerpos*

Al ser una enfermedad de tipo autoinmune, los pacientes con lupus, desarrollan anticuerpos dirigidos contra sus propias células. Entre los cuales los de mayor importancia son: Anti cuerpos anti ADN de doble cadena, anticuerpos anti nucleares y anti Smith.

a) *Anticuerpos anti nucleares*

Los anticuerpos anti nucleares (ANA) son una familia de anticuerpos dirigidos a la cromatina y sus componentes como el ADN nativo y desnaturalizado e histonas.

Aunque no son marcadores específicos para LES son un criterio esencial del diagnóstico. Se encuentran en el 67-94% de los pacientes lúpicos, pero no tiene utilidad en el seguimiento de la actividad de la enfermedad. (Koukina, 2014)

b) *Anti ADN de doble cadena*

El ADN de doble hebra es el mayor auto antígeno en el lupus. Los pacientes desarrollan anticuerpos de tipo Ig G.

Se considera que los anticuerpos anti ds-ADN son específicos para LES ya que difícilmente se encuentran en pacientes con otro tipo de enfermedad reumática, se presentan en el 50 a 70% de los casos y se asocia con nefropatía. (Molina, 1989)

Estudios realizados en modelo murino, demostraron que los anticuerpos anti ds-ADN se unen específicamente a la proteína alfa-actina que se encuentran en la superficie de las

células del riñón, siendo este mecanismo por el cual podría predisponer a daño renal. (Sanchez, Barajas, Ramirez, Moreno, & Barbosa, 2004)

c) Anticuerpos anti Smith

Se considera que son anticuerpos altamente específicos para LES pero poco sensibles ya que solo se encuentran en el 30% de los casos y se sabe que están dirigidos a ribonucleoproteínas nucleares pequeñas. (Molina, 1989).

d) Anticuerpos anti histonas

Son un grupo de auto anticuerpos que reaccionan contra complejos ADN-histona, específicamente con la porción proteica de los nucleosomas.

Se encuentran frecuentemente en los pacientes que padecen de lupus inducido por fármacos. (Molina, 1989)

E. Tipos de Lupus

El sistema inmune está diseñado para combatir los agentes extraños al organismo. Sin embargo, en las personas que padecen de lupus ocurre una desregulación y el sistema inmune ataca a células y tejidos sanos propios mediante la producción de autoanticuerpos. De acuerdo al tipo de tejido al que se dirijan estos autoanticuerpos se desarrollaran los diferentes tipos de la enfermedad.

1. Lupus Eritematoso Sistémico

El lupus eritematoso sistémico es la presentación generalizada de la enfermedad, se caracteriza por atacar a cualquier sistema del cuerpo, a pesar de esto el eritema malar suele presentarse en gran parte de los casos como un rasgo clínico característico, las lesiones cutáneas no presenta hallazgos específicos en la biopsia, puede presentar edema e incluso infiltrado inflamatorio. (Stringa & Troelli, 2006)

En la figura 2 se ilustran las características en el lupus eritematoso sistémico.

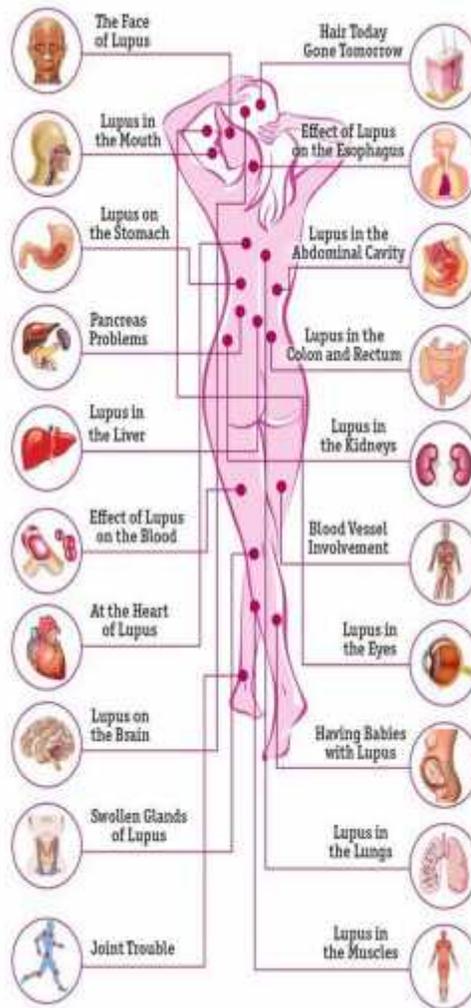


Figura 2: Características clínicas del lupus eritematoso sistémico (Pietrangelo & Krucik, 2014)

2. *Lupus Eritematoso Discoide*

El lupus discoide es la forma más habitual de lupus cutáneo que con poca frecuencia presenta manifestaciones sistémicas.

Se caracteriza por presentar placas de eritema, escamas y atrofia principalmente en las áreas expuestas a la luz solar, en ocasiones también puede afectar al cuero cabelludo produciendo alopecia.

3. *Lupus Inducido por Fármacos*

El lupus eritematoso inducido por fármacos (LEIF) es un síndrome que comparte manifestaciones clínicas, histopatológicas e inmunológicas con el lupus que cronológicamente coincide con la ingesta de ciertos medicamentos. Se caracteriza por presentar fiebre, mialgias, artralgias, pérdida de peso y serositis.

Los fármacos inductores de lupus se encuentran agrupados en tres categorías: la primera categoría comprende a los medicamentos en los que está demostrado que pueden causar LEIF, la segunda categoría incluye a los fármacos que son potenciales inductores de lupus y la última categoría comprenden a los medicamentos causantes de algún caso de LEIF (tabla 1). (Pretel, Marqués, & España, 2012)

Tabla 1: Fármacos descritos como inductores de lupus eritematoso sistémico inducido por fármacos extraído de (Pretel, Marqués, & España, 2012) y (Aguirre, López, & Cuadrado, 2010)

Fármacos	Alto riesgo	Riesgo moderado	Bajo riesgo	Riesgo muy bajo
Antiarrítmicos	Procaínamida (15-20%)	Quinidina (< 1%)	Acebulol Acecainida Atenolol Disopiramida	Disopiramida, propafenona
Antihipertensivos	Hidralacina (5-8%)	No corresponde	Metildopa, captopril, acebutol, enalapril, espironolactona	Clonidina, enalapril, labetalol, minoxidil, pindolol, prazosin, atenolol, timolol
Antipsicótico	No corresponde	No corresponde	Clorpromacina	Clorprotixeno, carbonato de litio, fenelcina, perfenacina
Antibióticos	No corresponde	Isoniacida	Minociclina	Nitrofurantoína
Anticonvulsivantes	No corresponde	No corresponde	Carbamacepina, Etosusuximida	Etosuximida, fenitoína, primidona

Continuación Tabla 1: Fármacos descritos como inductores de lupus eritematoso sistémico inducido por fármacos extraído de (Pretel, Marqués, & España, 2012) y (Aguirre, López, & Cuadrado, 2010)

Fármacos	Alto riesgo	Riesgo moderado	Bajo riesgo	Riesgo muy bajo
Antitiroideos	No corresponde	No corresponde	Propiltiouracilo	
Antiinflamatorios	No corresponde	Sulfasalacina	D-penicilamina, sulfonamida Diclofenaco	Fenilbutazona
Diuréticos	No corresponde	No corresponde	5- Aminosalicilato	Clortalidona, hidroclorotiacida
Hipolipidemiantes	No corresponde	No corresponde	No corresponde	Atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, simvastatina
Biológicos	No corresponde	No corresponde	Adalimumab	Etanercept, infiximab, adalimumab, Interferon-a, IL-2, Interferón-g
Neurolépticos	No corresponde	No corresponde	No corresponde	Levodopa
Antiadrenales	No corresponde	No corresponde	No corresponde	Aminoglutetimidida

4. *Lupus neonatal*

Es una enfermedad determinada por el paso de anticuerpos antinucleares de la madre al feto a través de la placenta, caracterizado por presentar manifestaciones cutáneas como eritema y sensibilidad a la luz solar, bloqueo cardiaco congénito, elevación de enzimas hepáticas, ictericia colestásica, neumonitis, trombopenia, anemia aplásica, anemia hemolítica y leucopenia. Su resolución coincide con la desaparición de los anticuerpos maternos durante el séptimo u octavo mes de vida (figura 3). (Bethencourt, 2014)



Figura 3: Síntomas comunes del lupus neonatal. Se ilustran tres síntomas comunes del lupus neonatal. En la imagen A eritema, B sensibilidad a la luz solar y C uñas quebradizas (5 symptoms of Neonatal Lupus, 2014)

F. Manifestaciones clínicas

La forma de presentación clínica de LES es muy variada puede afectar a cualquier órgano y sistema del organismo, en ocasiones inicia con afección a múltiples órganos, o bien a un solo órgano o sistema, con anomalías detectadas por exámenes de laboratorio.

La manifestación inicial es usualmente un malestar general, caracterizado por fatiga, pérdida de peso, y fiebre que generalmente no es mayor de 38°C.

Dentro de las manifestaciones clínicas se incluyen alteraciones cutáneas, musculares, cardiopulmonares, renales, neuropsiquiátricas, hematológicas, gastrointestinales, entre otras. En la tabla 2 se resumen las manifestaciones sistémicas más comunes en los pacientes con LES.

Tabla 2: Manifestaciones clínicas en el lupus eritematoso sistémico. (Anaya, Shoenfeld, Correa, García, & Cervera, 2005)

Manifestaciones clínicas	Características
Manifestaciones cutáneas	Eritema malar, úlceras orales, lesiones hiperqueratósicas, acompañadas con taponamiento folicular, presentes en el cuero cabelludo y piel de la cara
Manifestaciones musculo cutáneas	Artritis lúpica, lesiones óseas y deformidades, artropatía de Jaccoud, mialgias
Manifestaciones cardiopulmonares	Pericarditis, miocarditis, endocarditis, enfermedad valvular, arritmias, lesiones ateromatosas, endocarditis verrugosa atípica o de Libman-Sacks, aterosclerosis prematura, derrame pleural, pleuritis, neumonitis y hemorragia pulmonar
Manifestaciones renales	Nefritis lúpica
Manifestaciones neuropsiquiátricas	Leve alteración cognoscitiva o del estado de ánimo, cuadros severos de psicosis o vasculitis, convulsiones, encefalopatía, depresión, psicosis, meningitis aséptica, core, cefalea
Manifestaciones hematológicas	Anemia hemolítica, trombocitopenia autoinmune, linfopenia, neutropenia, alteraciones funcionales de los neutrófilos, crioglobulinas
Manifestaciones Gastrointestinales	Úlcera orales, náuseas, vómito y dolor abdominal, síndrome del intestino irritable, fibromialgia, enteropatía perdedora de proteínas, pseudoobstrucción intestinal crónica, pancreatitis y hepatitis lúpica.

Dentro de las manifestaciones clínicas en el lupus las que se presentan con mayor frecuencia en los pacientes al momento del diagnóstico son artritis (76.5%) y compromiso renal (58.8%) (Velázquez, y otros, 2012)

1. Nefritis lúpica

Es una de las manifestaciones clínicas que afecta con mayor gravedad a la calidad de vida de los pacientes lúpicos, considerada como una de las mayores causas de morbimortalidad. Afecta cerca del 65% de los casos y se presenta con mayor frecuencia en hispanos, asiáticos y afrodescendientes. (Severiche, y otros, 2014)

En pacientes lúpicos colombianos la prevalencia del compromiso renal es del 52,5% es más frecuente en adultos jóvenes (39%) y menos frecuente en adultos mayores de 50 años (22%). Se estima que entre el 5% a 22% de los pacientes con nefritis lúpica tendrán una enfermedad renal terminal y finalmente requerirán hemodiálisis o transplante. (Gonzales, Vásquez, Uribe, & Ramirez, 2006)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1974, estableció la primera clasificación de la nefritis lúpica basada en las lesiones glomerulares, agrupando las lesiones en cinco clases de acuerdo a los hallazgos de la biopsia renal. En 2003 la sociedad internacional de nefrología y patología renal elaboró una nueva clasificación de la nefritis lúpica. Esta clasificación incluye varias modificaciones con respecto a diferencias cuantitativas y cualitativas entre las lesiones de clase III y de clase IV como se observa en la tabla 3. (Gonzales, Vásquez, Uribe, & Ramirez, 2006)

Tabla 3: Clasificación de la Nefritis lúpica según la Sociedad Internacional de Nefrología/ Sociedad de Patología Renal (Gonzales, Vásquez, Uribe, & Ramirez, 2006)

Clasificación	Características
Clase I	Nefritis lúpica mesangial mínima. Glomérulo normal por microscopia de luz y presencia de depósitos inmunes mesangiales por inmunofluorescencia.
Clase II	Nefritis lúpica mesangial proliferativa. Hiper celularidad puramente mesangial de cualquier grado o expansión de la matrix mesangial por microscopia de luz, con depósitos inmunes mesangiales. Depósitos subepiteliales o subendoteliales escasos y aislados que pueden ser visibles por inmunofluorescencia o microscopía electrónica, pero no por microscopia de luz.
Clase III	Nefritis lúpica focal. Glomerulonefritis segmentaria o global endo o extracapilar, focal activa o inactiva que afecta <50% del glomérulo. Típicamente presenta depósitos inmune subendoteliales focales, con o sin alteraciones mesangiales.
Clase IV	Nefritis lúpica difusa. Glomerulonefritis segmentaria o global endo o extracapilar, activa o inactiva difusa que afecta 50% de los glomérulos. Típicamente presenta depósitos inmunes subendoteliales difusos, con o sin alteraciones mesangiales. Se divide en segmentaria difusa (IV-S) cuando 50% del glomérulo afectado tiene lesiones segmentarias, y global difusa (IV-G) cuando 50% del glomérulo afectado tiene lesiones globales. Segmentaria se define como una lesión que afecta menos de la mitad del penacho glomerular. Esta clase incluye casos con depósitos difusos de asas de alambre, pero con poco o nada de proliferación glomerular

Continuación Tabla 3: Clasificación de la Nefritis lúpica según la Sociedad Internacional de Nefrología/ Sociedad de Patología Renal (Gonzales, Vásquez, Uribe, & Ramirez, 2006)

Clasificación	Características
Clase V	Nefritis lúpica membranosa. Depósitos inmunes subepiteliales segmentarios o globales por microscopia de luz, inmunofluorescencia, o microscopía electrónica con o sin alteraciones mesangiales. La NL clase V puede ocurrir en combinación con la clase III o clase IV. La NL clase V puede mostrar esclerosis avanzada.
Clase VI	Nefritis lúpica esclerótica avanzada. 90% de los glomérulos se encuentran globalmente esclerosados sin actividad residual

G. Criterios de Diagnóstico

Debido a las múltiples manifestaciones de la enfermedad, el diagnóstico es una tarea difícil para el equipo médico y en muchas ocasiones la enfermedad puede confundirse con otras patologías de origen autoinmune.

En el año 1997 el Colegio Americano de Reumatología propuso un listado de 11 variables que contemplan tanto manifestaciones clínicas como criterios de laboratorio (tabla 4). Para diagnosticar a una persona con lupus, deberá cumplir cuatro criterios diagnósticos de los cuales al menos uno debe ser inmunológico.

Tabla 4: Criterios de clasificación para lupus eritematoso sistémico según el Colegio Americano de reumatología. (Bertsias, Cervera, & Dimitrios, 2012)

Criterio	Definición
Eritema malar	Eritema fijo , plano o elevado , sobre las eminencias malares , que tiende a prescindir de los pliegues nasolabiales
Eritema discoide	Parches eritematosos elevados con escalamiento queratósico adherente y taponamiento folicular ; cicatrización atrófica se produce en las lesiones mayores
Fotosensibilidad	Erupción de la piel como resultado de una reacción inusual a la luz del sol, por el historial del paciente o la observación médico.
Úlceras orales	Ulceración oral o nasofaríngea, generalmente sin dolor, observado por un médico.
Artritis	Artritis no erosiva en la que se involucran dos o más articulaciones periféricas, caracterizada por sensibilidad, hinchazón o derrame

Continuación Tabla 4: Criterios de clasificación para lupus eritematoso sistémico según el Colegio Americano de reumatología. (Bertsias, Cervera, & Dimitrios, 2012)

Criterio	Definición
Serositis	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pleuritis 1. Pericarditis
Alteración renal	<ol style="list-style-type: none"> 2. Proteinuria persistente > 0,5 g por día o > 3+ si no se realiza la cuantificación 1. Restos celulares : puede ser de glóbulos rojos , hemoglobina , tubulares granular, o mixto
Desorden neurológico	<ol style="list-style-type: none"> 2. Convulsiones 3. Psicosis
Desorden hematológico	<ol style="list-style-type: none"> 1. Anemia hemolítica con reticulocitosis 2. Leucopenia 3. Linfopenia 4. Trombocitopenia
Desorden inmunológico	<ol style="list-style-type: none"> 1. Anti ADN 2. Anti Smith 3. Hallazgo positivo de anticuerpos anti fosfolípido basado en: <ul style="list-style-type: none"> - Concentración anormal en suero de anticuerpos anti cardiolipina IgG o IgM - Resultado positivo de anticoagulante lúpico - Falso positivo en prueba de sífilis.
Anticuerpos Antinucleares	Un título anormal de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia o análisis equivalente en cualquier punto en el tiempo y en ausencia de medicamentos conocidos por estar asociados con el síndrome de lupus inducido por fármacos

Dentro de los elementos de diagnóstico de laboratorio y de seguimiento de la enfermedad se incluyen pruebas como la determinación de anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos ds-ADN, anticuerpos anti Smith, factores de complemento, célula LE, test de la función renal, hemograma completo, etc.

La valoración inmunológica puede realizarse por diferentes métodos como ser: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFI), aglutinación, inmunodifusión, etc.

Los glóbulos rojos, blancos y plaquetas pueden estar alterados por la enfermedad, en sí o por el tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos que pueden provocar alteraciones en los parámetros hematológicos mencionados.

Durante los últimos años los investigadores han buscado nuevas formas de diagnóstico por lo que han propuesto varios marcadores genéticos que serían útiles para predecir el desarrollo y el curso de la enfermedad.

H. Tratamiento

No existe un consenso general para el tratamiento del LES ya que debido a la variada sintomatología que presentan los pacientes, este debe ser flexible y adaptarse en cada momento a la situación clínica del paciente. Se debe considerar que la enfermedad se caracteriza por presentar brotes lúpicos en los cuales existe un aumento de la actividad de la enfermedad, el cual puede ser medible, en función al título de anticuerpo producido y el órgano afectado.

Los fármacos que comúnmente se utilizan en el tratamiento del lupus son antipalúdicos (hidroxicloroquina), AINEs (Salicilato sódico, Ac Tiaprofénico, butibufeno, fentiazaco, ketorolaco, diclofenaco, Ac. Nimflúmico, Meloxicam, Mabumetona, Celecoxib, entre otros), Inmunodepresores (ciclofosfamida, micofenolato, etc.) y terapia biológica. (Jiménez, y otros, 2011)

I. CTLA-4

La activación de los linfocitos T se inicia cuando el receptor de las células T (TCR) reconoce a los péptidos unidos a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, pero además, requiere de la participación de moléculas de adhesión que contribuyen al desarrollo de una respuesta inmune eficaz. Entre las moléculas de adhesión destacan CD4, CD8, CD28, CTLA-4 y sus respectivos ligandos. (Borrego, Frias, Aguado, & Peña, 2014) (Figura 4)

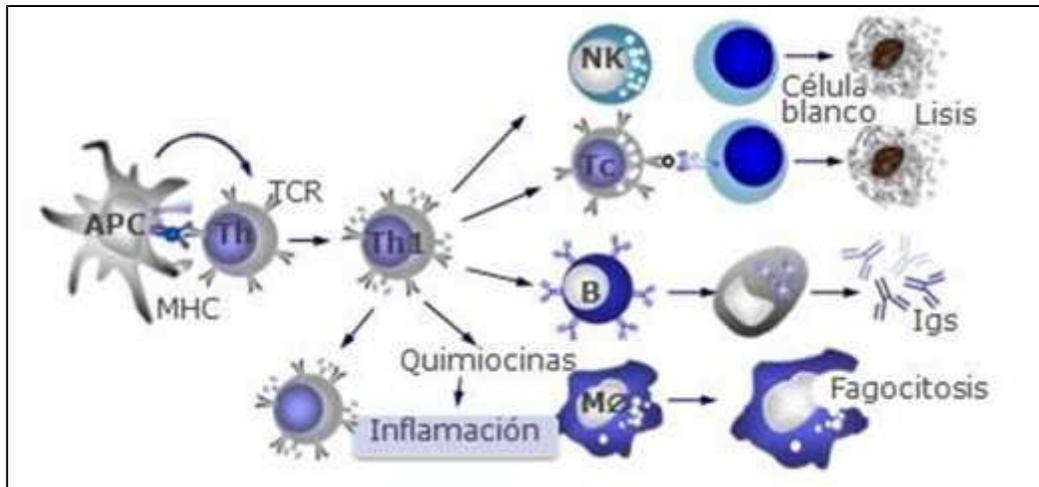


Figura 4 Activación de los Linfocitos Th y la producción de citoquinas (Borrego, Frias, Aguado, & Peña, 2014)

1. Funciones del CTLA-4

El CTLA-4 (CD 152) es un receptor de superficie celular que pertenece a la familia de la molécula estimuladora CD28, es el principal receptor implicado en la regulación negativa de la activación de los linfocitos. Se expresa de forma constitutiva en la superficie de los LTCD4+CD25+, se ha demostrado su expresión en otros tipos celulares como linfocitos B, monocitos y granulocitos, entre otros aunque se desconoce la función que cumplen en estas células. Este receptor se expresa de manera inducida en la superficie de los linfocitos T activados. (Walker & Samson, 2015)

En la actualidad no se conocen con certeza los mecanismos por los cuales el CTLA-4 cumple su función inhibitoria. No obstante continúan las investigaciones al respecto ya que develar las bases de la función del CTLA-4 podría proveer información clave en los factores que inducen la autoinmunidad y de esta manera contribuir también en el desarrollo de terapia con anticuerpos. (Topalian, Taube, Anders, & Pardoll, 2016)

Con esta finalidad se ha planteado posibles modelos que explicarían como el CTLA-4 cumple la función de regular la actividad de los linfocitos T. (Figura 5) (Rudd, 2008)

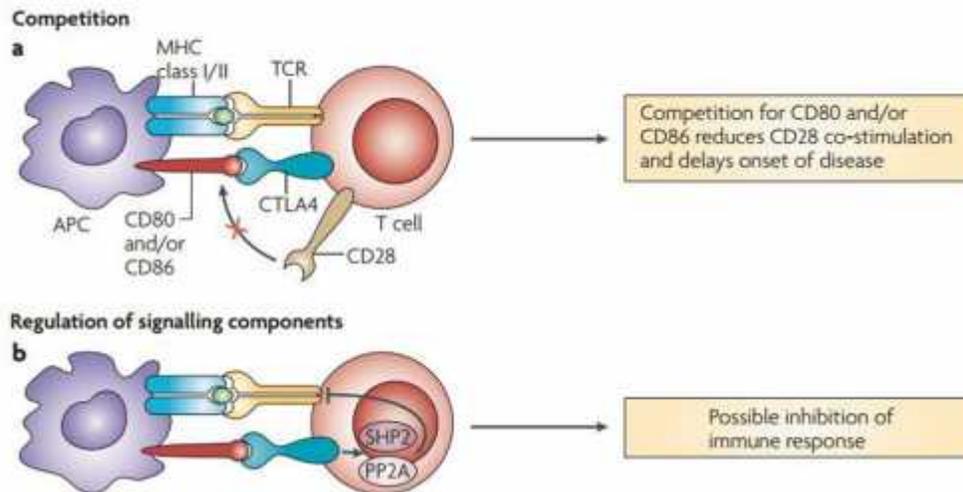


Figura 5: Función inhibitoria del CTLA-4 (Rudd, 2008)

a) Señalización negativa

Uno de los mecanismos por el cual la proteína CTLA-4 media la inactivación de células T es la entrega de una señal inhibitoria a través de su cola citoplasmática. La evidencia de este mecanismo se deriva de las observaciones del coligamiento cruzado entre anticuerpo de CTLA-4 y TCR en presencia de la expresión de CD28 no limitante que es suficiente para inducir la detención del ciclo celular y la inhibición de IL-2. En contraste con el antagonismo de estimulación CD28, este mecanismo es operativo cuando CTLA-4 se expresa en niveles bajos en la superficie celular T y depende de la cola citoplasmática. (Teft, Kirchof, & Madrenas, 2006)

b) Antagonismo competitivo de la vía CD28/B7

La unión de CD 28 con B7 inicia con una cascada de señalización coestimuladora necesaria para la activación óptima de las células T.

El CTLA-4 compite con mayor eficiencia por el sitio de unión a B7 debido que tiene mayor avidéz y afinidad por esta molécula que CD28. Es probable que CTLA-4 sea capaz de secuestrar las moléculas B7, y de esta forma reducir la estimulación CD28 dependiente. (Teft, Kirchof, & Madrenas, 2006)

c) Factores celulares intrínsecos

Los factores intrínsecos celulares también influyen en el comportamiento de las células T. En 2008 Rudd propone un modelo en el que el CTLA-4 y el anticuerpo anti-CD3 inhiben la producción de citoquinas y la proliferación de las células T. (Rudd, 2008)

2. Genética

El gen CTLA-4 se encuentra en ubicado en el cromosoma 2q33 consiste en 4 exones y tres intrones: los exones 1 y 2 codifican la región extra celular de la molécula, el exón 3 codifica la región transmembranal y el exón 4 la región intracelular. (Liu & Zhang, 2013) (Figura 6)

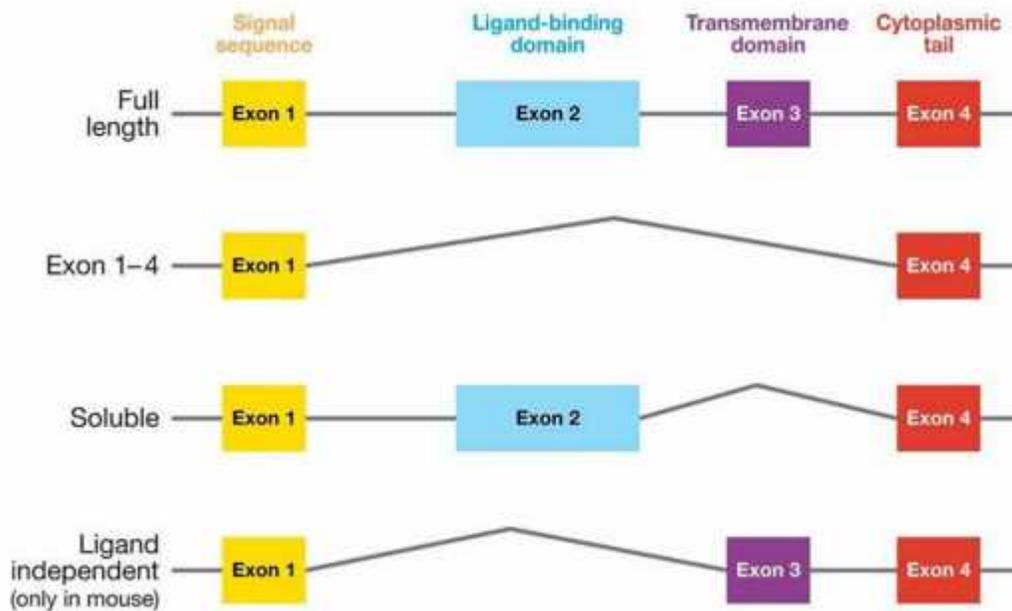


Figura 6: Gen CTLA-4. Está compuesto por cuatro exones donde cada uno codifica un dominio en la proteína como se indica en la parte superior de la figura. Los seres humanos expresan la longitud completa. (Teft, Kirchof, & Madrenas, 2006)

Han sido reportados cuatro polimorfismos del gen CTLA-4: el primero un micro satélite dinucleotídico en el exón tres del cual se conocen 23 alelos aproximadamente, el segundo corresponde a un cambio de una guanina (G) por adenina (A) en la posición +49 (G49A) del exón 1, el tercero un cambio de citosina (C) por timina (T) en la posición -318 (C-318T) en la región promotora y el polimorfismo CT60 A/G ubicado en la región 3'UTR. (Lee, Harley, & Nath, 2005)

3. *Polimorfismo +49 (A/G)*

En los últimos años se han publicado numerosos estudios relacionados con la asociación de los polimorfismos del gen con la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes como el lupus.

Uno de los polimorfismos que se asocia con la susceptibilidad a lupus es el cambio de A por G en la posición +49 en el exón 1 del gen CTLA-4 que codifican para treonina o alanina, respectivamente. De acuerdo con las observaciones de Lee y cols. (2005) en población Asiática la presencia del alelo G en la posición +49 del gen CTLA-4 implica 1.246 veces mayor riesgo de padecer lupus. (Lee, Harley, & Nath, 2005). Sin embargo debido a que se trata de un factor genético se muestran resultados contradictorios que varían en función del grupo poblacional estudiado.

En la actualidad, aún se desconoce como este polimorfismo puede modificar la función de la proteína CTLA-4. El estudio más reciente llevado adelante por Kouki y cols. (2015) donde se analizó cómo el polimorfismo +49 (A/G) afecta la función de la proteína CTLA-4 y contribuye a la patogénesis de la enfermedad de Grave's; en sus hallazgos muestran que la proliferación de células T es más elevada en los pacientes tanto casos como controles que portaban el genotipo G/G y que la expresión del alelo G correlaciona con la proliferación aumentada de células T en comparación con los niveles de células T de los pacientes que expresan el alelo A. (Kouiki, y otros, 2015)

J. Reacción en cadena de la polimerasa por restricción enzimática

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular desarrollada por Kary Mullis en 1986. Su objetivo es amplificar un fragmento de ADN para obtener varias copias partiendo de una única copia del fragmento original como se ilustra en la figura 7.

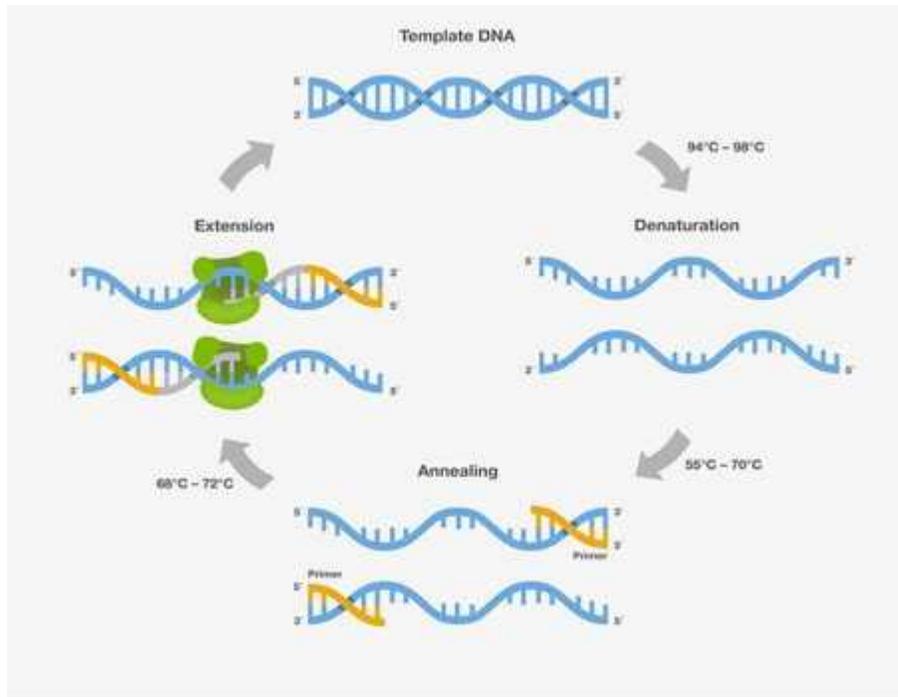


Figura 7: Fundamento de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa

La técnica de PCR-RFLP fue desarrollada en 1983 por Jeffreys, está basado en la identificación de la longitud de los fragmentos de restricción. El ADN resultante de una amplificación es cortado por un enzima de restricción que reconoce fragmentos específicos de 4 a 6 pb. Las secuencias de restricción presentan patrones de distancia, longitud y disposición diferentes por lo que se dice que la población es polimórfica para estos fragmentos de restricción. (Rodriguez & Chacon, 2012)

Las enzimas de restricción cortan el ADN en sitios específicos y están clasificadas en cuatro tipos I, II, III y IV en base a las subunidades que las componen, sitio de corte, secuencia específica y requerimiento de cofactor. El tipo II son enzimas que cortan el

ADN en posiciones definidas y producen una discreta restricción de fragmentos y distintivos patrones de bandas, además son las únicas endonucleasas que se utilizan en la rutina de laboratorio. (BIOLAB, 2016).

Para los fines de este estudio se utilizó la enzima *Kpn I* proveniente de *Klebsiella pneumoniae* con un sitio de escisión 5'GGTAC C 3' como se observa en la figura 8.

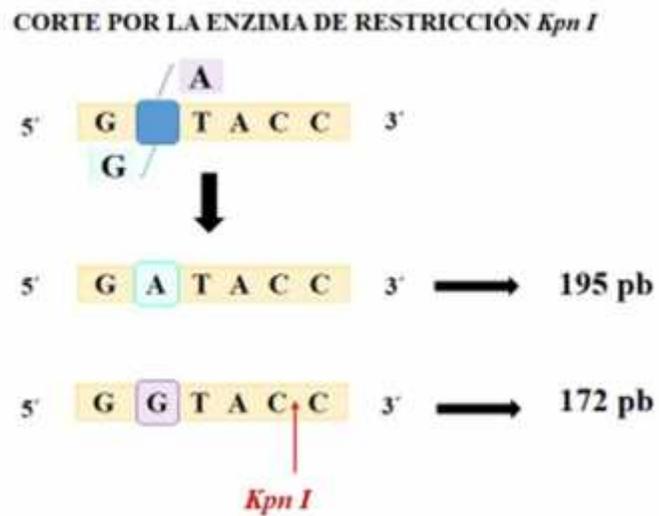


Figura 8: Sitio de corte de la enzima *Kpn I*

III. ANTECEDENTES GENERALES SOBRE EL PROBLEMA

El LES es una enfermedad autoinmune de etiología múltiple, habiéndose demostrado que la predisposición genética es uno de los factores más importantes involucrados en el desarrollo de la enfermedad cuando el paciente se encuentra con el agente ambiental desencadenante.

Diversos estudios han descrito genes candidatos asociados a la susceptibilidad a lupus.

Los genes que están comúnmente involucrados son aquellos ubicados en el MHC, genes que codifican la proteína ligadora de manosa (MBP), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina 6 (IL-6), IL-1, proteína C reactiva (PCR), Fc RIIA y Fc RIIIA, y proteínas de choque térmico, entre otros. (Anaya, Shoenfeld, Correa, García, & Cervera, 2005).

Otro gen candidato que se ha estudiado en diferentes poblaciones a nivel mundial y que ha sido asociado con la susceptibilidad a lupus es el gen CTLA-4. Sus diferentes polimorfismos han sido asociados con desarrollo de enfermedades autoinmunes. Sin embargo, estos estudios muestran resultados contradictorios cuando se analizan diferentes grupos poblacionales. Uno de los polimorfismos asociados con el lupus es el cambio de A por G en la posición +49 del exón 1 del gen CTLA-4. Según los hallazgos de un meta análisis, en población Asiática se ha observado que la presencia del alelo G implica 1.246 veces mayor riesgo de padecer lupus (Odds Ratio= 1.246, 95% CI=1.057–1.469, $p=0.009$), mientras que la población europea caucásica no existe evidencia de asociación alélica (OR=0.978, 95% CI=0.833–1.148, $p=0.780$). (Lee, Harley, & Nath, 2005)

En un estudio realizado en población eslovaca en 1999, se observó que la frecuencia del alelo G en pacientes lúpicos era significativamente mayor (35.8%) que en los pacientes control (25.7%) y que la distribución del genotipo G/G era más frecuente entre los paciente lúpicos 17.6% vs 3.5% en controles. (Pullman, y otros, 1999).

Resultados similares fueron expuestos por Ahmed y colaboradores (2001) en su estudio realizado en población japonesa en el que encontraron que la frecuencia del alelo G es mucho más frecuente en pacientes con LES que en los controles (69.5% Vs 57.2%) y que

existe mayor frecuencia del genotipo G/G entre los pacientes lúpicos. (Ahmed, y otros, 2001)

No obstante otros estudios muestran resultados contradictorios, como es el caso del estudio del polimorfismo del gen CTLA-4 realizado en población de Malasia por Kek-Heng y colaboradores en el que concluyeron que el gen CTLA-4 no juega un rol importante en la susceptibilidad genética en el desarrollo de lupus en población de Malasia. (Kek, Suat, Ching, Si, & Lay, 2010). Por otra parte, un estudio realizado en población Iraní determinó que existe una correlación importante entre el genotipo A/A (67.2% vs. 41.1%, $p=0.0001$, OR= 2.93, CI= 1.99-4.32) y la susceptibilidad a desarrollar lupus, en contraste el genotipo A/G (49.7% vs. 27.8%, $p=0.0001$, OR=0.39, CI=0.26-0.57) y G/G (9.2% vs. 5.0%, $p=0.06$, OR=0.51 (0.23-1.12) son más frecuentes en el grupo control. (Shooja, y otros, 2104).

Los estudios anteriormente citados demuestran que la asociación de un determinado polimorfismo genético con la susceptibilidad o resistencia a una determinada patología va a depender en primera instancia de la raza y grupo poblacional estudiado así como del tamaño muestral entre otros. En nuestro país el Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS, se ha propuesto evaluar los genes candidatos a susceptibilidad a LES. Es así que el interés del presente trabajo es determinar en pacientes lúpicos de la ciudad de La Paz, si alguno de los genotipos del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 está asociado con la susceptibilidad a LES o alguna de sus manifestaciones clínicas. Este nuevo conocimiento nos permitirá establecer el posible riesgo genético de susceptibilidad a la enfermedad en familiares de pacientes lúpicos, así como el poder predecir una determinada manifestación orgánica que puedan padecer los pacientes. Permitiendo de esta manera al clínico establecer las medidas de prevención o de tratamiento adecuado en función al riesgo que cada paciente pueda presentar.

IV. JUSTIFICACIÓN

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmune invalidante que se caracteriza por un proceso inflamatorio crónico ocasionado por la producción de auto anticuerpos y la activación de células autoreactivas que lentamente van afectando la funcionalidad de diferentes órganos y sistemas. Para enfermedades autoinmunes como el lupus actualmente no existe cura, siendo el tratamiento únicamente de sostén o destinado a tratar las complicaciones de la enfermedad. En este caso un diagnóstico oportuno y un adecuado régimen terapéutico del paciente pueden mejorar su expectativa de vida a más de 15 años.

En la actualidad aún se desconoce la causa del lupus, no obstante se sabe que los factores genéticos juegan un rol importante en cuanto al desarrollo de la enfermedad, las manifestaciones clínicas y las complicaciones.

El laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS viene realizando estudios de asociación al LES de varios genes, tales como la asociación de los polimorfismos: de los loci DR y DQ del complejo principal de histocompatibilidad, del gen de la Enzima convertidora de Angiotensina (ECA), del gen que codifica los Receptores FC R IIIB; encontrándose para estos sistemas genéticos valores de OR relativamente bajos. Por lo tanto, se continúa en la búsqueda del polimorfismo de un gen que tenga en nuestra población valores de OR suficientemente altos como para ser utilizados como marcador genético para predecir la susceptibilidad a padecer lupus y/o sus manifestaciones clínicas.

Otro de los genes que ha sido asociado con la susceptibilidad a padecer LES es el gen CTLA-4 y su polimorfismo +49 (A/G) en población Eslovaca, mostrando mayor frecuencia del Alelo G en los pacientes lúpicos que en el grupo control, pero, esta frecuencia alélica muestra resultados contradictorios cuando es analizado en otros grupos poblacionales como en población Iraní en la que el alelo A es que se encuentra con mayor frecuencia en pacientes lúpicos.

Una de las motivaciones para realizar esta investigación es porque no existe ningún estudio acerca del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 en población boliviana, por

lo que hasta el momento es desconocido el papel de este gen en lo referente a la susceptibilidad a lupus, las manifestaciones clínicas y las complicaciones.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el departamento de La Paz-Bolivia, el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética mediante un levantamiento de datos estadísticos ha determinado que entre las gestiones 2003 a 2015 se han diagnosticado en promedio 130 casos nuevos de lupus por año, solo en la gestión 2015 entre los meses de enero a julio se confirmó el diagnóstico de 60 casos nuevos.

El médico tratante del paciente lúpico para hacer un correcto seguimiento y monitorización del paciente, continuamente solicita pruebas de laboratorio de química sanguínea, hematología y pruebas inmunológicas como ANA, anti ds-ADN, C3, C4, etc., que permiten al clínico dosificar el tratamiento en función a la actividad de la enfermedad evaluada por los parámetros de laboratorio, controlando de esta manera la enfermedad.

Los marcadores serológicos son útiles en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad. No obstante, actualmente no existe ninguna prueba que permita realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad y de esta forma predecir y/o prevenir el desarrollo de esta o de las complicaciones orgánicas una vez que está instalada. Para dar solución a este problema se han realizado estudios genéticos en diferentes poblaciones con el fin de encontrar un gen que pueda predecir el desarrollo y curso del LES, uno de los genes candidatos más estudiados en los últimos años es el gen CTLA-4 y su polimorfismo en la posición +49 (A/G). Este último aspecto nos motiva a evaluar si existe asociación entre el polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 con las susceptibilidad a lupus en población boliviana la cual tiene características de mestizaje propias, (genes amerindios que se han mezclado con genes de culturas que han colonizado nuestro país). El conocer la posible asociación con lupus, de los alelos del gen antes mencionado, podría ayudarnos a contribuir desde el laboratorio a un diagnóstico temprano del LES, lo que permitiría disminuir el riesgo las complicaciones orgánicas de la enfermedad, mejorando así la calidad, expectativa de vida del paciente y la salud emocional de su entorno.

VI. HIPOTESIS

En los pacientes lúpicos el alelo G del polimorfismo +49(A/G) localizado en el exón 1 del gen CTLA-4 está relacionado con el riesgo a padecer la enfermedad o alguna de sus manifestaciones clínicas.

VII. OBJETIVOS

A. Objetivo general

- Determinar la asociación del polimorfismo +49 (A/G) en el exón 1 del gen CTLA-4 con la susceptibilidad a Lupus Eritematoso Sistémico en población mixta boliviana.

B. Objetivos específicos

- Conocer las características clínicas más frecuentes en la población de estudio
- Optimizar un ensayo de PCR-RFLP para la determinación del polimorfismo +49 (A/G) en el exón 1 del gen CTLA-4.
- Analizar la relación entre los polimorfismos +49 (A/G) del gen CTLA-4 con la susceptibilidad a lupus.
- Analizar la relación entre los polimorfismos +49 (A/G) del gen CTLA-4 con la susceptibilidad a desarrollar nefritis lúpica y otras manifestaciones clínicas.

VIII. DISEÑO METODOLOGICO

A. Tipo de estudio

La investigación corresponde a un estudio analítico de tipo caso-control

B. Población en estudio

Pacientes bolivianos con diagnóstico de lupus que asistieron al Instituto SELADIS en los meses de marzo a noviembre de 2015. Así mismo, se incluyó un grupo de pacientes sin diagnóstico de LES como grupo control.

IX. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

A. Criterios de inclusión

Pacientes con diagnóstico clínico y serológico de lupus eritematoso sistémico de cualquier edad y sexo que otorgaron su consentimiento informado (Anexo 1). De la misma forma los pacientes del grupo control otorgaron su consentimiento informado para ser parte del estudio.

B. Criterios de exclusión

Pacientes que presentaron otras patologías de tipo autoinmune o que no otorgaron su consentimiento para que su muestra biológica sea estudiada en el presente trabajo. En el caso del grupo control se excluyeron a los que presentaban relación de parentesco con pacientes lúpicos.

C. Criterios de eliminación

Pacientes y controles que no asistieron a la toma de muestra o no completaron los datos de la historia clínica.

D. Material biológico

Muestra de sangre venosa periférica con anticoagulante EDTA K3

E. Tamaño de la muestra

Muestreo no probabilístico por conveniencia. Se incluyeron 80 pacientes con diagnóstico confirmado de LES y 80 controles, previa lectura del formato de consentimiento informado y la hoja de información del proyecto. A los pacientes y controles que decidieron participar voluntariamente en el estudio se les tomó una muestra de sangre para realizar la extracción de ADN y la PCR para la identificación de los alelos. Asimismo, se levantó la historia clínica de cada paciente y control (anexos 2 y 3).

F. Aspectos éticos

Los pacientes involucrados en el presente estudio fueron informados acerca de los objetivos, el impacto y las posibles complicaciones que pudieron resultar de la toma de muestra y el beneficio que ellos recibirían con los resultados del presente estudio para lo cual se obtuvo su consentimiento informado. A todos los participantes del estudio se les entregó un original del resultado del análisis del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4

X. CONTEXTO Y LUGAR

El estudio se realizó en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA, que cuenta con los equipos y materiales necesarios para la realización de este tipo de estudios.

A. Métodos

1. *Obtención del material genético*

A partir de la obtención una muestra de sangre venosa periférica recogida sobre anticoagulante EDTA K3, se realizó la extracción de ADN genómico mediante el

protocolo del Kit de “Extracción de ADN de sangre periférica por membrana de sílica, sales caotrópicas y proteinasa K” (FAVORGEN, Taiwan)

- ✓ Se centrifugó la muestra de sangre a 3000 rpm por 10 min, y se desechó el plasma. Luego, se homogenizó la muestra cuidadosamente por inversión.
- ✓ Se tomaron 200 µl. de la muestra en un tubo Eppendorf y se añadió 20 µl de proteinasa K y 200 µl de buffer FABG, se agitó en vortex enérgicamente por 1 minuto.
- ✓ La muestra se llevó a incubación por 16 min agitando en vortex cada 4 minutos.
- ✓ Se trasvasó la muestra cuidadosamente a la columna de sílica y se centrifugó por 1 min 20 seg a 14000 rpm
- ✓ La columna fue trasvasada a un tubo cónico nuevo y se añadieron 500 µl del buffer de lavado W1, se llevó a centrifugar por 1 min 20 seg a 14000 rpm
- ✓ Se trasvaso la columna de sílica a un tubo cónico nuevo y se añadieron 750 µl del buffer de lavado y se centrifugó por 1 min 20 seg a 14000 rpm
- ✓ La columna de sílica se trasvaso a un tubo Eppendorf nuevo y se añadieron 200 µl del reactivo de elución, se dejó reposar durante tres minutos y se llevó a centrifugar 2 min. 20 seg. a 14000 rpm
- ✓ La muestra fue conservada a 4 °C hasta el momento de su uso.

2. *Reacción en cadena de la polimerasa*

- ✓ Se realizó una optimización de la PCR a partir de las condiciones propuestas por Imen y cols. en 2010: desnaturalización inicial un ciclo a 94 °C/10 min; un ciclo a 95°C/10 seg; 30 ciclos a 55 °C/30 seg y una extensión final a 72°C/10 min.
- ✓ El mix de PCR se preparó para un volumen de reacción total de 20 µl: Buffer 1X, dNTPs 0.2 mM; 0.5 mM de cada primer (forward: CAAggCTCAgCTgAACCTgggT; reverse: TACCTTTAACTTCTggCTTTg) ; MgCl₂ 1.5 mM; 0.008 U/ µl de Taq polimerasa platinum (Invitrogen, USA)
- ✓ Para verificar la amplificación del gen se realizó electroforesis horizontal a 150 voltios, 350 mAmp por 30 min. en gel de agarosa al 4 % teñido con SYBR®

Green al 4.66%, usando como tampón de corrida TBE (Tris, ácido bórico y EDTA) 1X. La amplificación se verificó con ayuda de un transiluminador de luz UV

- ✓ Una vez verificada la amplificación del gen, se realizó la digestión enzimática de los productos de PCR, utilizando la enzima *Kpn I* 2000 U (Invitrogen, USA)

3. *Restricción enzimática por Kpn I*

- ✓ Se tomaron 10 µl del producto de PCR y se añadió 1 µl de la enzima *Kpn I* 10 U/µl (5'G GTAC C3'3'C CATG G5') y 2 µl del Buffer 10X para un volumen de reacción final de 30 µl.
- ✓ La mezcla se dejó en incubación a 37 °C toda la noche.

4. *Electroforesis de los productos de digestión enzimática*

- ✓ Los productos de la digestión enzimática se revelaron mediante electroforesis horizontal a 150 voltios, 350 mAmp por 120 min. en gel de agarosa al 4 % teñido con 0,05% DE SYBR® Green (Invitrogen, USA) usando como tampón de corrida TBE 1X y H₂O libre de DNAsas como control negativo. La digestión se verificó con ayuda de un transiluminador de luz UV
- ✓ Los productos esperados fueron: para homocigotos del alelo G una banda de 195 pb, para homocigotos del alelo A una banda de 182 pb y para heterocigotos A/G dos bandas, una de 195 pb y otra de 182 pb respectivamente.

5. *Análisis estadístico*

Para el análisis y levantamiento estadístico de los datos se hizo uso del programa IBM SPSS statistics 22 (versión de prueba), se realizó la prueba de CHI cuadrado para verificar si existe asociación significativa y el cálculo del Odds Ratio para relación entre la exposición genética a la enfermedad y la presencia de la misma.

XI. RESULTADOS

La investigación se desarrolló bajo los parámetros de un estudio de tipo caso-control, con una población total de 160 personas de ambos sexos y comprendidos entre las edades de 11 a 66 años, procedentes de los departamentos de La Paz (96.25%), Oruro (2,5%) y Potosí (1.25%) que fueron clasificadas en dos grupos: casos y controles.

El grupo de casos estuvo constituido por 80 pacientes con diagnóstico de lupus, de los cuales 74 (92.5%) fueron mujeres y 6 (7.5%) varones (figura 9), con una relación mujer: varón de 9:1

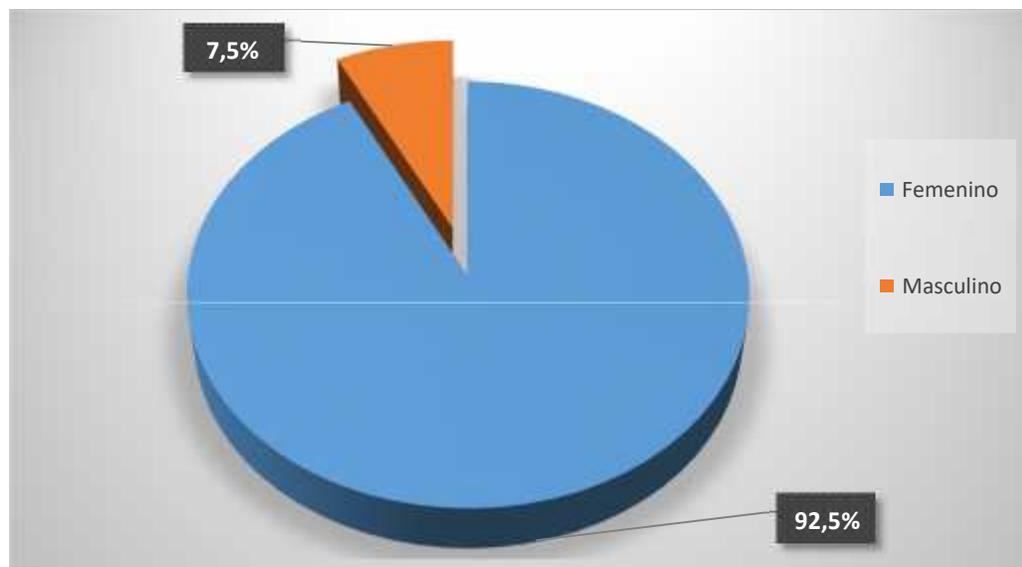


Figura 9: Distribución del sexo en el grupo de pacientes lúpicos. El 92.5% son mujeres y el 8% varones.

El 74.35 % de las pacientes lúpicas se encontraban en el rango de edad fértil (15 a 49 años) en la figura 10 se observa que el 24,32% se encuentra en el rango de edad de 21-30 años, el 33,78% entre los 31-40 años y 10.81 % de 41 a 50 años. Por otra parte, en la población masculina de pacientes se observó una distribución homogénea en los rangos de edad de 31-40 años y 61 años o más, en ambos casos con 33,33%. (Anexo 4)

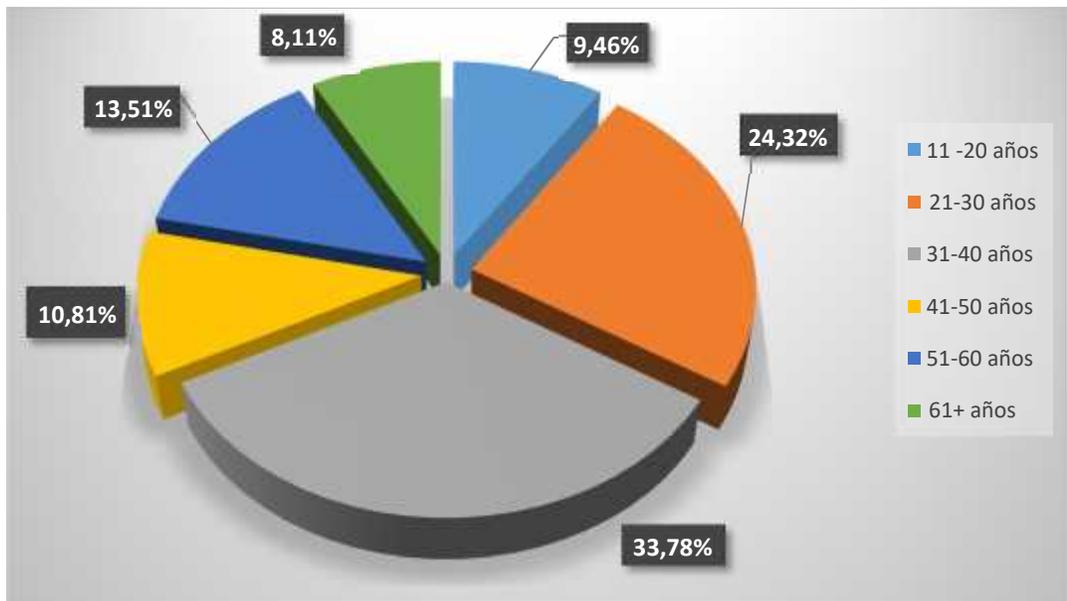


Figura 10: Distribución de la edad en paciente lúpicos de sexo femenino. El 33.8% se encuentra dentro del rango de 31 a 40 años, 24.32% 21 a 30 años y 10.81 % de 41 a 50 años.

El grupo control estuvo conformado por 80 pacientes aparentemente sanos, que no presentaron infecciones ni se encontraban en tratamiento médico, de los cuales 63 (78,75%) son mujeres y 17 (21,25%) varones. (Anexo 5)

Los rangos de edad en los que se encuentra la mayor proporción de las mujeres del grupo control son: 11 a 20 (17.46%), 21 a 30 (55.55%) y 31 a 40 (12.7%), (Figura 11). Por otra parte el 41.18% de la población masculina se encuentra dentro del rango de 21-40 años. (Anexo 6)

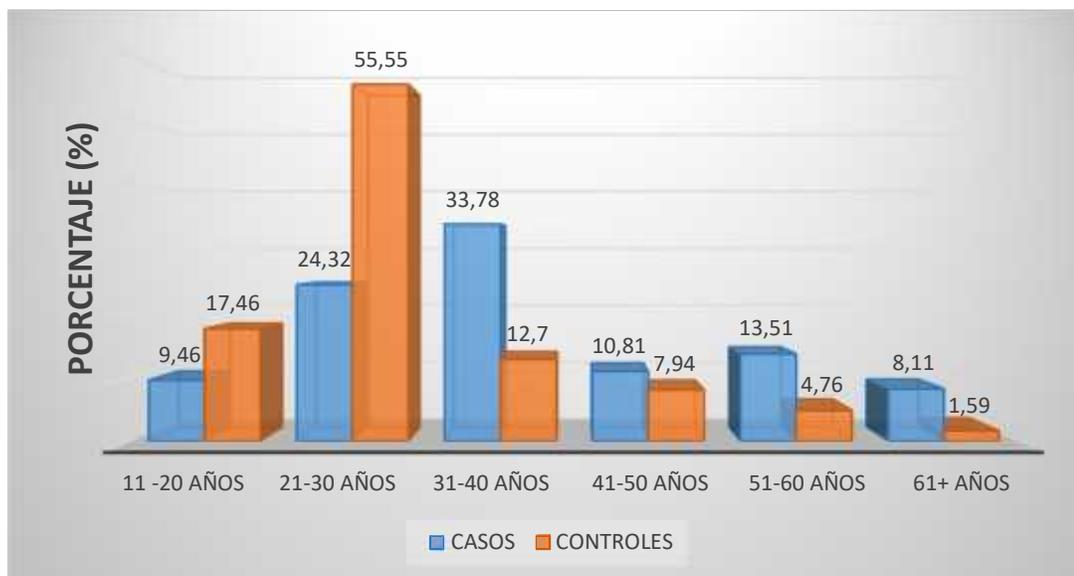


Figura 11: Comparación de distribución de la edad en las pacientes de sexo femenino incorporadas en el estudio como caso o control.

A. Comparación de las características clínicas reportadas por la población de pacientes durante el curso de la enfermedad.

Las características clínicas de los pacientes lúpicos son muy variadas, abarcando desde las manifestaciones más características de la enfermedad como la sensibilidad al sol, el eritema malar y el dolor articular hasta afecciones de tipo neural como convulsiones, cefalea, mareos, alucinaciones y alteraciones hematológicas que pueden comprender trombocitopenia, leucopenia, plaquetopenia, entre otras.

Mediante el levantamiento de la historia clínica (Anexo 2) de cada paciente se logró determinar las manifestaciones clínicas más frecuentes, que presentaron al inicio y durante la enfermedad. Como se observa en la tabla 5 las manifestaciones clínicas más frecuentes que reportaron los pacientes al momento del diagnóstico fueron: el dolor articular (72.5%), eritema malar (46.25%), alteraciones hematológicas (33.75%) y nefritis lúpica (33.75%) y las que menos se presentaron fueron: úlceras orales o nasales (13,75%), serositis (22.5%), alteración neural (22.5%) y fotosensibilidad (15.0%). La frecuencia en la que se presentaron las diferentes manifestaciones clínicas fue variando con el curso de la enfermedad, incrementándose en todos los casos siendo los más evidentes úlceras orales

o nasales de 13.75% a 33.75, nefritis lúpica de 33.75% a 47.5% y alteraciones hematológicas de 33.75% a 56.25%.

Tabla 5: Comparación de la frecuencia de las manifestaciones clínicas en pacientes LES al momento de diagnóstico y durante la enfermedad. Se muestra la variación en la frecuencia de las manifestaciones clínicas que presentaron los pacientes LES al momento de diagnóstico y durante la enfermedad

Característica clínicas	Al diagnóstico				Durante la enfermedad			
	Presente		Ausente		Presente		Ausente	
	n	%	n	%	n	%	N	%
Eritema malar	37	46,25	43	53,75	46	57,5	34	42,5
Fotosensibilidad	12	15	68	85	24	30	56	70
Dolor articular	58	72,5	22	27,5	64	80	16	20
Ulceras orales o nasales	11	13,75	69	86,25	27	33,75	53	66,25
Serositis	18	22,5	62	77,5	18	22,5	62	77,5
Nefritis lúpica	27	33,75	53	66,25	38	47,5	42	52,5
Alteración neural	18	22,5	62	77,5	23	28,75	57	71,25
Alteración hematológica	27	33,75	53	61,25	45	56,25	35	43,75

B. Optimización del PCR-RFLP para la determinación del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4

Para determinar el polimorfismo de la posición +49 en el exón 1 del gen CTLA-4 se recurrió a un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa por restricción enzimática. Se realizó la optimización de la técnica de PCR-RFLP en dos etapas, partiendo del protocolo propuesto por Imen Sfar y colaboradores en 2009. La primera etapa tuvo como meta obtener un producto amplificado de PCR de 195 pb. Durante el primer ensayo se utilizaron las concentraciones de reactivos (tabla 6) y protocolo de termociclado (tabla 7) propuesto por Imen Sfar y colaboradores (2009), programando un gradiente de la temperatura de alineamiento de 50 °C a 60 °C con el objetivo de encontrar la temperatura óptima.

Como resultado del primer ensayo se evidenció la amplificación de ADN con la presencia de dos bandas (figura 12). Con la ayuda del software Lab Image Versión 3.3.0 (Kapelan Bio-Imagin Solutions,) se calcularon los pesos moléculas de ambas bandas, la primera correspondía al fragmento esperado de 195 pb y la otra banda inespecífica con un peso de 131 pb. Se observó también que la temperatura óptima de amplificación se encontraba en un rango de 53 °C a 57 °C siendo la temperatura de hibridación ideal a 55 °C que produjo bandas mejor definidas en el revelado electroforético. En la tabla 7 se muestran otros cambios importantes que se realizaron en el proceso de optimización.

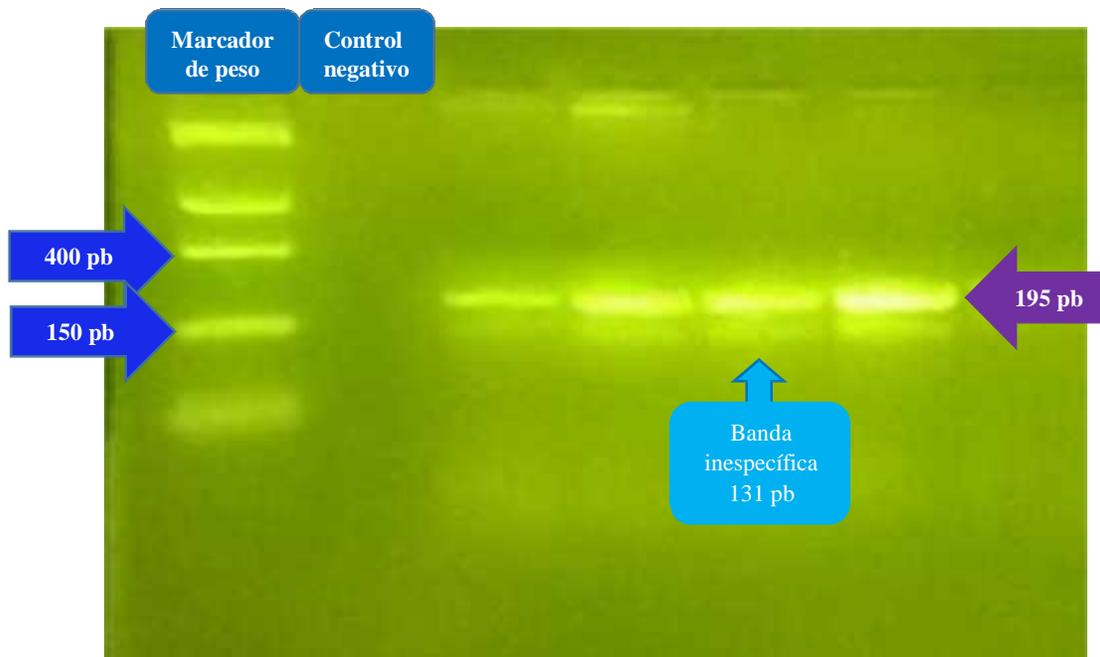


Figura 12: Fotografía de la corrida electroforética del primer ensayo para la optimización de PCR del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4. En el primer pozo se encuentra el marcador de peso molecular y en los siguientes pozos una muestra amplificada con un fragmento de 195 pb correspondiente al gen CTLA-4 y una banda inespecífica de 131 pb.

En el proceso de optimización de la PCR con el objetivo de eliminar la amplificación de bandas inespecíficas se disminuyó la concentración de MgCl₂ de 1.5 mM a 1 mM y en el protocolo de termociclado se incrementó la temperatura de activación de la Taq polimerasa de 94 °C a 95 °C y el tiempo de activación de 5 min a 10 min., en el ciclo de amplificación se realizó una disminución en los tiempos de desnaturalización,

alineamiento y extensión y se incrementó el número de ciclos. Las condiciones óptimas de la PCR se muestran en las tablas 6 y 7.

Tabla 6: Modificación realizada en el protocolo de preparación de Mix para PCR propuesto por Imen Sfar y cols.

Reactivo	Protocolo (Imen y cols.)	Protocolo modificado
Buffer	1 X	1 X
dNTPs	0.2 mM	0.2 mM
Forward	0.5 uM	0.5 uM
Reverse	0.5 uM	0.5 uM
MgCl ₂	1.5 mM	1.0 mM
Taq	0.08 U/μl	0.08 U/μl

Tabla 7: Comparación entre el protocolo de termociclado propuesto por Imen y cols. y protocolo optimizado

Protocolo de termociclado		Etapa				
		Des-naturalización inicial	Ciclo de amplificación			Extensión final
Imen y cols.	Temperatura	94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C
	Tiempo	5 min	40 seg	30 seg	1 min	7 min
	N° de ciclos	1 ciclo	30 ciclos			1 ciclo
Optimizado	Temperatura	95 °C	95 °C	55 °C	72 °C	72 °C
	Tiempo	10 min.	10 seg	30 seg	30 seg	10 min
	N° de ciclos	1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo

En la segunda etapa de la optimización se realizó la digestión enzimática de los productos de amplificación PCR con la enzima *Kpn I* de acuerdo al protocolo de preparación del reactivo propuesto por el fabricante de la enzima. (Anexo 7) Para el revelado se realizó a una electroforesis en gel de agarosa al 4%. Como resultado de la digestión enzimática se obtuvieron dos fragmentos de 195 pb y 172 pb para los alelos A y G respectivamente (figura 13).

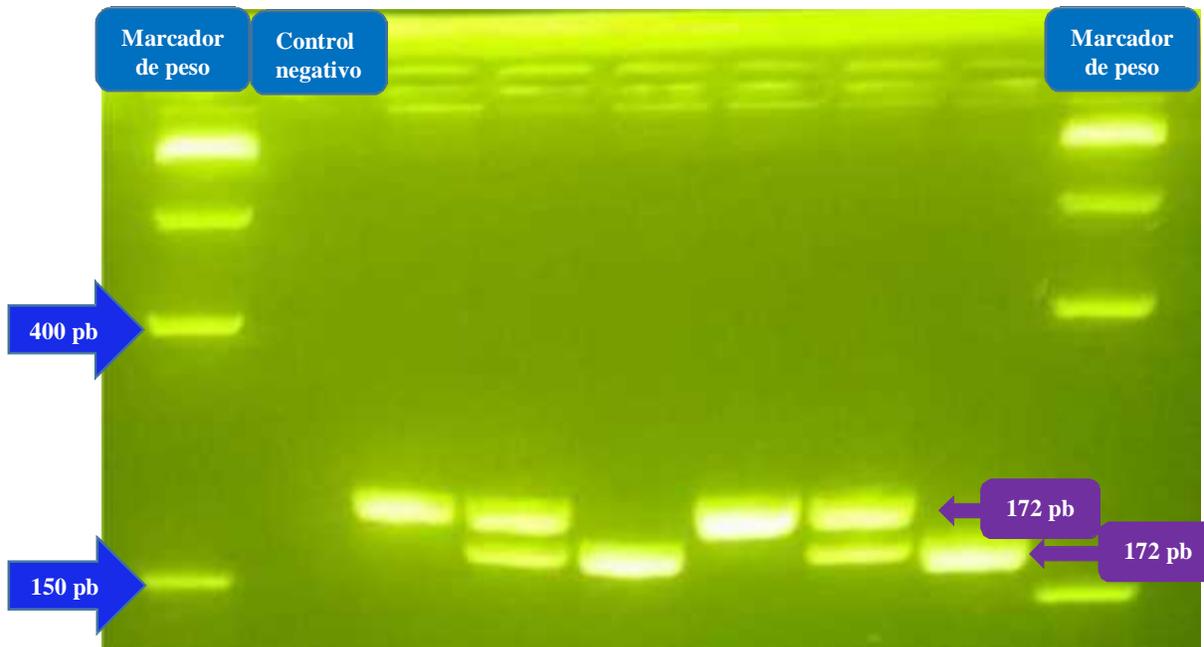


Figura 13: Fotografía de la electroforesis de los productos de digestión enzimática con *Kpn I* que determina el polimorfismo +49 (A/G) del gen *CTLA-4*. En los pozos 1 y 4 se observa una banda de 195 pb que corresponde a homocigoto para el alelo A, en los pozos 2 y 5 dos fragmentos de 195 pb y 172 pb heterocigoto y en 3 y 6 homocigoto para el alelo G con una banda de 195 pb.

C. Frecuencia genotípica del polimorfismo +49 (A/G) del gen *CTLA-4* en pacientes con LES y pacientes aparentemente sanos.

Para determinar si existe asociación entre el polimorfismo +49 (A/G) del gen *CTLA-4* y la susceptibilidad a lupus se realizó el cálculo de las frecuencias genotípicas y alélicas que permitieron conocer la proporción de cada genotipo y alelo en los grupos de estudio. También, se realizó el cálculo del OR que permitió conocer el riesgo de que el lupus o alguna de sus manifestaciones se presente o no en la población.

Los pacientes lúpicos estudiados se caracterizaron por presentar en mayor frecuencia el genotipo G/G (21.25%) con respecto al grupo control (7.50%), el valor del Chi-cuadrado 6.14 con un valor $p=0.01$ indica que existe una diferencia significativa entre los dos grupos de estudio (tabla 8). El valor de $OR= 3.33$ indica que en nuestra población existe una asociación positiva entre el genotipo G/G y riesgo a la enfermedad. Los pacientes con este genotipo tienen 3 veces más riesgo a desarrollar lupus que los pacientes que no tienen este genotipo.

Tabla 8: Comparación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 en pacientes con LES y grupo control.

Polimorfismo genotípico CTLA-4					Chi-cuadrado	
					OR(IC)*	X ² (P = 0.5)
A(Thr)/A(Thr)	36	45.00	45	56.25	0.64 (0.34-1.19)	2.03 (p=0.15)
A(Thr)/G(Ala)	27	33.75	29	36.25	0.90 (0.47-1.72)	0.11 (p=0.740)
G(Ala)/G(Thr)	17	21.25	6	7.50	3.33 (1.24-8.95)	6.14 (p=0.01)

D. Frecuencia alélica del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 en pacientes con LES y pacientes aparentemente sanos.

Con relación a las frecuencias alélicas, el alelo A (OR=0.56; IC=0.35-0.90) muestra una asociación negativa que otorga protección frente a la enfermedad y en contraste el alelo G (OR=1.79; IC=1.11-2.88) representa una asociación positiva que predispone a duplicar el riesgo para el desarrollo de lupus, como se observa en la tabla 9.

Tabla 9: Comparación de las frecuencias alélicas del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 en pacientes con LES y grupo control.

Polimorfismo alélico CTLA-4	Pacientes		Controles		OR(IC)*	Chi-cuadrado X ² (P = 0.5)
	(N)	%	(N)	%		
Alelo A (Thr)	99	61.88	119	74.38	0.56 (0.35-0.90)	5.76 (p=0.02)
Alelo G (Ala)	61	38.13	41	25.63	1.79 (1.11-2.88)	5.76 (p=0.02)

E. Asociación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 en pacientes lúpicos y manifestaciones clínicas durante la enfermedad.

Debido a las complicaciones de la enfermedad y que surgen con el desarrollo de la misma se hizo necesario evaluar una posible asociación entre el polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4, con las manifestaciones clínicas que se presentaron en los pacientes lúpicos durante la enfermedad. El análisis de la relación entre las frecuencias genotípicas del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 y las manifestaciones clínicas reveló la asociación significativa con nefritis lúpica y alteraciones hematológicas. (Tabla 10)

Se encontró que el genotipo A/A está presente en el 70.83% de los pacientes que desarrollaron fotosensibilidad frente al 33.93% de los pacientes que no tiene sensibilidad al sol. (OR=4.73; IC.= 1.67-13.38; $X^2=9.24$; $p=0.002$), el genotipo A/G está presente en el 16.67% de los pacientes con fotosensibilidad frente al 41.07% de los que no desarrollo fotosensibilidad (OR=0.29; IC.=0.09-0.95; $X^2=4.48$; $p=0.034$)

El genotipo A/G se encontró en el 55.56% de los pacientes con serositis frente al 27.42% de los pacientes que no tuvieron serositis (OR=3.31; IC.=1.12-9.78; $X^2=4.94$; $p=0.026$)

El 18.52% de los pacientes con el polimorfismo A/G desarrollaron úlceras orales o nasales frente al 41.51% que no las tuvo (OR=0.32; IC.= 0.10-0.98; $X^2= 4.23$; $p=0.040$)

De igual manera se encontró asociación significativa con las alteraciones hematológicas y nefritis lúpica. El genotipo A/G se presentó en el 44.44% de los pacientes con alteraciones hematológicas frente al 20.0% que no tuvo ninguna alteración hematológica (OR=3.20; IC.= 1.16-8.84; $X^2=5.26$; $p=0.022$).

Se encontró también que el genotipo A/G es un factor de riesgo para el desarrollo de nefritis lúpica al estar presente en el 55.26% de los pacientes con esta alteración frente al 14.28% de los paciente sin ninguna alteración renal (OR=7.41; IC.= 2.53-21.72; $X^2=14.98$; $p=0.0001$), por otra parte el genotipo A/A estuvo presente en el 28.95% de pacientes con alteración renal frente al 59.52% que no desarrollaron nefritis (OR=0.28; IC.=0.11-0.70; $X^2=7.53$; $p=0.006$) siendo un factor de protección para el desarrollo de nefritis lúpica.

Tabla 10: Asociación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 en pacientes lúpicos con las manifestaciones clínicas.

Manifestaciones clínicas	Polimorfismo genotípico CTLA-4	PRESENTE		AUSENTE		OR(IC)*	Chi-cuadrado X ² (p = 0.5)
		N	%	N	%		
Eritema	A(Thr)/A(Thr)	17	36.96	19	55.88	0.46 (0.19-1.14)	2.83 (p=0.09)
	A(Thr)/G(Ala)	19	41.30	8	23.53	2.29 (0.85-6.13)	2.76 (p=0.10)
	G(Ala)/G(Thr)	10	21.74	7	20.59	1.07 (0.36-3.18)	0.02 (p=0.90)
Fotosensibilidad	A(Thr)/A(Thr)	17	70.83	19	33.93	4.73 (1.67-13.38)	9.24 (p=0.002)
	A(Thr)/G(Ala)	4	16.67	23	41.07	0.29 (0.09-0.95)	4.48 (p=0.034)
	G(Ala)/G(Thr)	3	12.50	14	25.0	0.43 (0.11-1.66)	1.57 (p=0.210)
Dolor Articular	A(Thr)/A(Thr)	28	43.75	8	50.0	0.78 (0.26-2.33)	0.20 (p=0.653)
	A(Thr)/G(Ala)	23	35.94	4	25.0	1.68 (0.49-5.82)	0.68 (p=0.408)
	G(Ala)/G(Thr)	13	20.31	4	25.0	0.76 (0.21-2.76)	0.17 (p=0.682)
Serositis	A(Thr)/A(Thr)	5	27.78	31	50.0	0.38 (0.12-1.21)	2.78 (p=0.095)
	A(Thr)/G(Ala)	10	55.56	17	27.42	3.31 (1.12-9.78)	4.94 (p=0.026)
	G(Ala)/G(Thr)	3	16.67	14	22.58	0.68 (0.17-2.71)	0.29 (p=0.589)
Renales	A(Thr)/A(Thr)	11	28.95	25	59.52	0.28 (0.11-0.70)	7.53 (p=0.006)
	A(Thr)/G(Ala)	21	55.26	6	14.28	7.41 (2.53-21.72)	14.98 (p=0.0001)
	G(Ala)/G(Thr)	6	15.79	11	26.19	0.53 (0.17-1.60)	1.30 (p=0.256)
Neurales	A(Thr)/A(Thr)	7	30.43	29	50.88	0.42 (0.15-1.18)	2.77 (p=0.096)
	A(Thr)/G(Ala)	10	43.48	17	29.82	1.81 (0.66-4.92)	1.37 (p=0.24)
	G(Ala)/G(Thr)	6	26.09	11	19.30	1.48 (0.47-4.61)	0.45 (p=0.502)
Ulceras orales o nasales	A(Thr)/A(Thr)	15	55.56	21	39.62	1.91 (0.74-4.86)	1.83 (p=0.176)
	A(Thr)/G(Ala)	5	18.52	22	41.51	0.32 (0.10-0.98)	4.23 (p=0.040)
	G(Ala)/G(Thr)	7	25.92	10	18.87	1.50 (0.50-4.53)	0.53 (p=0.466)
Hematológica	A(Thr)/A(Thr)	14	31.11	22	62.86	0.27 (0.10-0.68)	8.02 (p=0.004)
	A(Thr)/G(Ala)	20	44.44	7	20.0	3.20 (1.16-8.84)	5.26 (p=0.022)
	G(Ala)/G(Thr)	11	24.44	6	17.14	1.56 (0.51-4.75)	0.62 (p=0.428)

F. Asociación de las frecuencias alélicas con del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 en pacientes lúpicos y con las manifestaciones durante la enfermedad.

Se encontró asociación significativa entre el polimorfismo alélico +49 (A/G) del gen CTLA-4 con el desarrollo de fotosensibilidad y alteraciones hematológicas que se presentaron durante el transcurso de la enfermedad. (Tabla 11)

El alelo G estuvo presente en el 20.83% de los pacientes que desarrollaron fotosensibilidad frente al 45.54% de los pacientes que tuvieron sensibilidad al sol (OR=0.31; IC.= 0.14-0.69; $X^2=8.69$; $p=0.003$) siendo un alelo de protección para el desarrollo de sensibilidad solar.

Por otra parte el alelo A mostro ser un alelo de protección para el desarrollo de alteraciones hematológicas al estar presente en el 53.33% frente al 72.86% que no tuvo alteraciones de tipo hematológico (OR=0.42; IC.=0.22-0.83; $X^2=6.36$; $p=0.012$) y contrariamente el alelo G se clasificó como un factor de riesgo para el desarrollo de alteraciones hematológicas estando presente en el 46.67% de los pacientes que si las tuvieron frente al 27.14% de los pacientes que no sufrieron de alteraciones hematológicas. (OR=2.35; IC.=1.20-4.59; $X^2=6.36$; $p=0.012$). Desde el punto de vista polimórfico a nivel del alelo no se evidenció asociaciones de protección o riesgo con las manifestaciones clínicas como eritema malar, dolor articular, serositis, nefropatía, alteración neural y úlceras orales.

Tabla 11: Asociación de las frecuencias alélicas del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 en pacientes lúpicos con las manifestaciones clínicas.

Manifestaciones clínicas	Polimorfismo alélico CTLA-4	PRESENTE		AUSENTE		OR(IC)*	Chi-cuadrado X^2 (p = 0.5)
		N	%	N	%		
		Eritema	Alelo A (Thr)	53	57.61		
	Alelo G (Ala)	39	42.39	22	32.35	1.54 (0.80-2.96)	1.67 (p=0.20)
Fotosensibilidad	Alelo A (Thr)	38	79.17	61	54.46	3.18 (1.44-7.00)	8.69 (p=0.003)
	Alelo G (Ala)	10	20.83	51	45.54	0.31 (0.14-0.69)	8.69 (p=0.003)
Dolor Articular	Alelo A (Thr)	79	61.72	20	62.5	0.97 (0.43-2.15)	0.01 (p=0.935)
	Alelo G (Ala)	49	38.28	12	37.5	1.03 (0.46-2.30)	0.01 (p=0.935)
	Alelo G (Ala)	42	46.67	19	27.14	2.35 (1.20-4.59)	6.36 (p=0.012)

Continuación Tabla 11: Asociación de las frecuencias alélicas del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 en pacientes lúpicos con las manifestaciones clínicas acumuladas.

Manifestaciones clínicas	Polimorfismo alélico CTLA-4	PRESENTE		AUSENTE		OR(IC)*	Chi-cuadrado X ² (p = 0.5)
		N	%	N	%		
Serositis	Alelo A (Thr)	20	55.56	79	63.71	0.71 (0.34-1.51)	0.79 (p=0.375)
	Alelo G (Ala)	16	44.44	45	36.29	1.40 (0.66-2.98)	0.79 (p=0.375)
Renales	Alelo A (Thr)	43	56.58	56	66.67	0.65 (0.34-1.24)	1.72 (p=0.189)
	Alelo G (Ala)	33	43.42	23	27.38	1.53 (0.80-2.92)	1.72 (p=0.189)
Neural	Alelo A (Thr)	24	52.17	75	65.79	0.57 (0.28-1.14)	2.58 (p=0.108)
	Alelo G (Ala)	22	47.83	39	34.21	1.76 (0.88-3.54)	2.58 (p=0.108)
Ulceras orales o nasales	Alelo A (Thr)	35	64.81	64	60.38	1.21 (0.61-2.39)	0.30 (p=0.585)
	Alelo G (Ala)	19	35.18	42	39.62	0.83 (0.42-1.63)	0.30 (p=0.585)
Hematológica	Alelo A (Thr)	48	53.33	51	72.86	0.42 (0.22-0.83)	6.36 (p=0.012)
	Alelo G (Ala)	42	46.67	19	27.14	2.35 (1.20-4.59)	6.36 (p=0.012)

XII. DISCUSIÓN

Desde el año 2009 el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS ha observado el incremento de casos nuevos de lupus cada año. En promedio por año se confirmaron por laboratorio 131 casos nuevos de LES, en el año 2014 se diagnosticaron 125 casos nuevos de LES y en el año 2015 entre los meses de enero y julio se reportaron 65 casos nuevos. Por este motivo, en la presente tesis se optimizó un nuevo método molecular que permita determinar la susceptibilidad genética a lupus y predecir el posible riesgo de desarrollar alguna de sus manifestaciones clínicas, de esta forma sería posible aminorar el daño orgánico y sistémico producido por la enfermedad.

La población del estudio estuvo constituida por 80 pacientes lúpicos de los cuales 74 (92.5%) fueron mujeres y 6 (7.5%) varones, con una relación mujer varón de 9:1. De acuerdo a un estudio realizado por Lahita, R. en 1999, antes de la pubertad la relación mujer-varón en pacientes con lupus varía de 10:1 hasta 15:1, por su parte Yacoub y cols. mencionan que esta relación después de la menopausia disminuye a 8:1 (Yacoub, 2004). Datos similares son expuestos en una publicación de Norman Talal en 1979, quien explica que la actividad de las hormonas sexuales podría explicar la mayor predisposición en mujeres, siendo la relación mujer-varón en el lupus de 15:1 durante la pubertad y que decrece en orden de 2:1 en grupos de mayor edad. (Talal, 1979). Por lo que la relación de afectación mujer: varón encontrado en el presente estudio estaría de acuerdo a los datos encontrados en la literatura, confirmando que el lupus afecta en mayor proporción a mujeres.

La mayor proporción de las mujeres lúpicas estuvo comprendida entre los rangos de edad de 21 a 30 años, 31 a 40 años y 41 a 50 años lo que corrobora que el 68.94 % se encuentra entre los 21 a 50 años. De acuerdo a los datos publicados en la Encuesta Nacional de Demografía y Salud (2008) la edad fértil en nuestro país es de 15 a 49 años que representa el 46% de la población femenina de los cuales el 20.8% se encuentra en el rango de edad de 15 a 19 años, 32.4% de 20 a 29 años, 26.6% de 30 a 39 años y 20.3% de 40 a 49 años. (Ministerio de Salud Deportes del Estado Plurinacional de Bolivia, 2009) En el presente estudio se estableció que el 74.35% de las pacientes lúpicas se encontraba dentro del rango de edad fértil.

Resultados de un estudio realizado por Hopkinson y cols. en población lúpica de raza blanca el 11.96% se encuentra en el rango de edad de 20-29 años, 15.38% de 30-39 años, 25.64% de 40 a 49 años, 20.51% de 50 a 59 años, 19.68% de 60 a 69 años, y el 3.42% de 80 años o más. (Hopkinson, Doherty, & Powell, 1994).

De esta forma se demuestra que la enfermedad afecta en mayor proporción a mujeres en edad fértil y esto podría deberse a la implicación de los factores hormonales que muchos estudios involucran como un factor predisponente a lupus. Actualmente continúan en estudio los mecanismos por los cuales las hormonas pueden crear la predisposición a la enfermedad o la exacerbación de la misma.

En cuanto a las características clínicas que se manifestaron en la población estudiada, se decidió comparar las manifestaciones clínicas presentes al momento del diagnóstico de la enfermedad y las que fueron desarrollando los pacientes como consecuencias de la misma. En este análisis no se consideró establecer relaciones entre el tiempo transcurrido desde el inicio de la enfermedad con la aparición de una determinada manifestación clínica. Se evidenció que el dolor articular (72.5%), eritema malar (46.25%), alteraciones hematológicas (33.75%) y nefritis lúpica (33.75%) fueron las más frecuentes al inicio de la enfermedad y se estableció también que como consecuencia del transcurso de la enfermedad la frecuencia de estas manifestaciones fue incrementando: el dolor articular (80%), eritema malar (57.5%), alteraciones hematológicas (56.25%), nefritis lúpica (47.5%) y úlceras orales o nasales (33.75%).

Hopkinson y colaboradores realizaron un estudio sobre la incidencia y prevalencia de las manifestaciones clínicas de lupus en razas específicas como caucásicos y africanos y encontraron que al inicio de la enfermedad las manifestaciones más frecuentes fueron artritis (62.58%), fotosensibilidad (23.13%), úlceras orales o nasales (15.65%), eritema malar (10.88%) y las manifestaciones acumuladas más frecuentes: artritis (61.90%), leucopenia (54.42%), fotosensibilidad (24.69%), úlceras orales o nasales (25.17%) y leucopenia (19.73%). No estudiaron el compromiso renal. (Hopkinson, Doherty, & Powell, 1994)

Otro estudio realizado Velásquez y colaboradores en población colombiana, indica que las características clínicas más frecuentes al inicio de la enfermedad en un grupo de 34

pacientes lúpicos fueron: compromiso hematológico (79.4%), artritis (76.5%), compromiso renal (58.8%) fotosensibilidad (47.1%), serositis (44.1%), úlceras orales o nasales (44.1%) y eritema malar (20.6%). (Velásquez, Anaya, Rodríguez, Vargas, & Ramirez, 2011).

En el presente estudio se demuestra que en nuestra población el eritema malar se presenta con una frecuencia de 57.5 % mucho mayor a lo reportado en la literatura y en cambio otras manifestaciones que se reportan de forma frecuente en la bibliografía como la fotosensibilidad y la serositis se encuentran con poca frecuencia en la población estudiada (30% y 22.5%).

Es evidente que existe incremento de las complicaciones orgánicas son ocasionadas en muchos casos por el tiempo de duración de la enfermedad, el esquema de tratamiento y el apego al tratamiento por parte de los pacientes.

Una de las complicaciones más frecuentes de la enfermedad y de peor pronóstico es la nefritis lúpica, en los Estados Unidos cerca del 35 % de los pacientes adultos con LES tienen evidencia de daño renal al momento de diagnóstico, y se pronostica que el 50% de los casos desarrollaran algún tipo de daño renal durante los primeros 10 años de la enfermedad. (Hahn, y otros, 2012)

La etapa experimental del estudio se inició con la optimización del protocolo de PCR-RFLP partiendo de la técnica y protocolo de termociclado propuesto por Imen Sfar y colaboradores, desde el primer ensayo se obtuvo la banda esperada de 195 pb, y llamó la atención la presencia de una banda inespecífica de 131 pb, por lo que en diferentes ensayos se disminuyó la concentración de $MgCl_2$ de 1.5 mM a 1 mM debido a que la concentración elevada de Mg^{2++} incrementa la probabilidad de unión no específica al cebador y la formación de producto no deseado y en el protocolo de termociclado se incrementó la temperatura de activación de la Taq polimerasa de 94 °C a 95 °C y el tiempo de 5 a 10 minutos el objeto de este cambio fue el de reducir la probabilidad de amplificaciones inespecíficas; en el ciclo de amplificación se realizó un aumento en la temperatura y el tiempo de desnaturalización para separar eficientemente el ADN; en la etapa de amplificación se incrementó el número de ciclos porque se disminuyó la concentración de los reactivos y el tiempo de extensión final fue incrementado de 7 a 10 minutos para

extender completamente el fragmento de interés (Tablas 5 y 6). Sin embargo, la amplificación de la banda inespecífica persistía en todas las muestras amplificadas. Finalmente para cerciorarse de que no fuera un error en el diseño de primers se realizó un análisis de especificidad con las herramientas de la base de datos BLASTA obteniendo una especificidad del 100% para el gen CTLA-4. Se procedió a realizar la restricción de fragmentos mediante digestión enzimática de los productos de PCR con la enzima *Kpn I* observando que se presentaban fragmentos de 195 y 172 pb y la banda inespecífica de 131 pb había sido cortada por la enzima.

Estudios similares sobre el polimorfismo +49 (A/G) del CTLA-4 que hicieron uso de distintos primers también muestran la presencia de la banda inespecífica. Horst Donner y sus colaboradores al estudiar el polimorfismo +49 (A/G) en pacientes con enfermedad de Graves y Diabetes Mellitus tipo I mediante un ensayo de PCR-FLP mostraron en sus resultados una banda inespecífica indicando que es una amplificación que está presente en todas las muestras analizadas y que era eliminada después de la digestión enzimática con *BbvI* (Donner, y otros, 1997). Otro estudio de asociación de los polimorfismo +49 (A/G) y 318 (C/T) con esclerosis sistémica en pacientes italianos reportaron la presencia de bandas inespecíficas en ambos polimorfismos. En el caso del polimorfismo +49 (A/G) una banda no alelo específica de 229 pb que para fines prácticos de ese estudio tomaron como control de amplificación y una banda de 296 pb en el caso del polimorfismo 318 (C/T) y tomaron en cuenta estas amplificaciones como control. Después de la digestión enzimática obtuvieron solo las bandas de los tamaños esperados. (Balbi, y otros, 2007). Debido a los antecedentes acerca de la banda, para los fines de este estudio, esta fue definida como control de amplificación.

Los resultados de las pruebas moleculares muestran que la frecuencia de los polimorfismo genotípicos (A/A, A/G, G/G) en pacientes fue: 45.00%, 33.75%, 21.25% y en controles: 56.25%, 36.25%, 7.5% respectivamente. El genotipo G/G estuvo presente con mayor frecuencia en el grupo de pacientes que en controles con un OR 3.33 (1.24-8.95) que implica 3 veces más riesgo a desarrollar la enfermedad. Y la distribución de las frecuencias alélicas (A y G) en pacientes: 61.88% y 38.13% y en el grupo control: 74.38% y 25.63%, siendo el alelo G de riesgo y el alelo A de protección.

Resultados similares fueron expuestos por Ahmed y cols. (2009) en un estudio de asociación del polimorfismo +49 (A/G) con lupus en población japonesa. Determinaron que el genotipo G/G fue más frecuente en pacientes (48.7%) que en el grupo control (31.0%) con un OR 1.72 (1.20-2.40) siendo un genotipo de riesgo.

En contraposición a los resultados obtenidos en el presente estudio Shooja y cols. (2004) determinaron que en población iraní existe una correlación importante entre el genotipo A/A (67.2% vs. 41.1%, $p=0.0001$, OR= 2.93, CI= 1.99-4.32) y la susceptibilidad a desarrollar lupus; en contraste el genotipo A/G (49.7% vs. 27.8%, $p=0.0001$, OR=0.39, CI=0.26-0.57) y G/G (9.2% vs. 5.0%, $p=0.06$, OR=0.51 (0.23-1.12) son más frecuentes en el grupo control. (Shooja, y otros, 2104).

La distribución genotípica y alélica del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 varía de acuerdo al grupo poblacional estudiado al igual que su asociación o no con la susceptibilidad a padecer lupus. El presente estudio realizado en población mixta boliviana y principalmente paceña se encontró que el genotipo G/G se encuentra en mayor frecuencia en los pacientes LES que en el grupo de pacientes aparentemente sanos; por lo tanto el alelo G representa un factor de riesgo a desarrollar lupus, en contraste el alelo A especialmente en homocigosis representa un factor de protección a LES.

En la actualidad se desconocen los mecanismos por los cuales el polimorfismo +49 (A/G) altera la función inhibidora de la proteína CTLA-4. Sin embargo, la investigación más reciente al respecto fue realizada por Kouki y cols. (2015) en la que estudiaron *in vitro* cómo afecta el polimorfismo +49 (A/G) en la función inhibitoria del CTLA-4 y su relación la patogénesis de la enfermedad de Grave's, en sus resultados afirman que la proliferación de células T de los sujetos con el polimorfismo G/G es mayor tanto en pacientes como en el grupo control, y que el genotipo G/G tiene correlación con la función reducida de la proteína CTLA-4. (Kouiki, y otros, 2015). Lo que se podría traducir como: el polimorfismo G/G en el codón 17 del gen que codifica la proteína CTLA-4 disminuye la eficiencia en la capacidad inhibitoria de la proteína CTLA-4.

Respecto a la asociación entre el polimorfismo del gen estudiado y las manifestaciones clínicas expresadas en los pacientes lúpicos se encontró que el polimorfismo A/G es un factor de riesgo para el desarrollo de alteraciones hematológicas y nefritis lúpica, pero que

se comporta también como un factor protector para el desarrollo de serositis, fotosensibilidad y úlceras orales o nasales. Por otra parte el polimorfismo A/A es un factor de protección para el desarrollo de alteraciones hematológicas y nefritis lúpica, siendo a su vez un factor de riesgo para el desarrollo de fotosensibilidad.

La asociación de las manifestaciones clínicas con el polimorfismo alélico mostró que el alelo G es un factor de riesgo para el desarrollo de alteraciones hematológicas, pero un factor protector para fotosensibilidad, y el alelo A tuvo un papel protector para el desarrollo de alteraciones hematológicas.

No se encontró en la bibliografía estudios que hayan relacionado el polimorfismo +49 (A/G) con ninguna complicación de la enfermedad por lo que este sería el primer estudio que analizó la asociación del polimorfismo +49 (A/G) del gen CTLA-4 con manifestaciones clínicas de la enfermedad.

XIII. CONCLUSIONES

Los pacientes lúpicos estudiados al momento del diagnóstico de la enfermedad refirieron con mayor frecuencia dolor articular (72%), eritema malar (46%), nefritis lúpica y alteraciones hematológicas. En el transcurso de la enfermedad presentaron las manifestaciones antes mencionadas pero con un incremento en la frecuencia de las mismas.

Se optimizó una prueba de PCR-RFLP para identificar el polimorfismo en la posición +49 en el exón 1 del gen CTLA-4. Los cambios realizados en el protocolo permitieron obtener fragmentos de 195 y 172 pb que corresponden a los alelos A y G respectivamente.

Se estableció que el genotipo G/G del gen CTLA-4 incrementa tres veces el riesgo de padecer lupus. Y que el hecho de que el paciente porte en su genotipo el alelo G implica que tenga dos veces más probabilidad de desarrollar lupus. Así mismo se demostró que el alelo A en el genotipo de los pacientes representa un factor protector hacia la enfermedad.

El análisis de la relación entre el polimorfismo del gen CTLA-4 y la susceptibilidad a las manifestaciones clínicas de lupus permitió demostrar que los pacientes lúpicos

heterocigotos A/G tienen mayor riesgo de padecer nefropatía lúpica, serositis y alteraciones hematológicas y que el genotipo A/A predispone a la sensibilidad a la radiación solar. Por otra parte el genotipo A/A en pacientes lúpicos tiene un carácter protector contra problemas hematológicos y renales; el genotipo A/G es de carácter protector para el desarrollo de úlceras y sensibilidad a la luz solar. Desde el punto de vista del polimorfismo alélico se observó que el alelo G representa un factor de riesgo para alteraciones hematológicas y como factor protector para la sensibilidad a la radiación UV. Finalmente el alelo A del gen CTLA-4 es un factor protector para manifestaciones hematológicas.

XIV. RECOMENDACIONES

Al no existir un marcador serológico de laboratorio que prediga el tipo de daño orgánico que desarrollara el paciente producto del lupus eritematoso sistémico se inició la búsqueda de marcadores genéticos que permitan predecir que órgano será afectado en el lupus. El polimorfismo G/G en la posición +49 del gen CTLA-4 es un factor de riesgo para el desarrollo de lupus y algunas de sus complicaciones clínicas, se hace evidente continuar el estudio para incrementar el tamaño muestral y asociar el polimorfismo de este gen con otros marcadores genéticos (HLA y otros) para incrementar el poder predictivo de estos marcadores en el estudio de asociación con la enfermedad y sus manifestaciones clínicas.

XV. BIBLIOGRAFIA

- 5 symptoms of Neonatal Lupus*. (Septiembre de 2014). Recuperado el 24 de junio de 2016, de Find Arthritis treatment: <http://www.findarthritistreatment.com/5-symptoms-of-neonatal-lupus/>
- Aguirre, A., López, R., & Cuadrado, J. (2010). Lupus inducido por fármacos. *Medicina clínica*, 124-129.
- Ahmed, s., Ihara, K., Kanemistu, S., Nakashima, H., Otsuka, T., Tzusaka, K., . . . T., H. (2001). Association of CTLA-4 but not CD-28 gene polymorphism with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Rheumatology*, 662-667.
- Álvarez, C., Ampuero, R., Barrientos, F., González, F., & Gonzales, F. (2012). *Patologías Reumatológicas*. (S. C. Reumatología, Ed.) Chile. Recuperado el 25 de Mayo de 2016, de https://issuu.com/franciscagonzalezbarria/docs/patologias_reumatologicas
- Anaya, J., Shoenfeld, Y., Correa, P., García, M., & Cervera, R. (2005). *Autoinmunidad y enfermedad Autoinmune*.
- Arellano, C., & otros. (2012). *Diagnóstico y tratamiento de lupus eritematosos mucocutáneos*.
- Balbi, G., Ferrera, F., Rizzi, M., Piccioli, P., Morabito, A., Cardamonte, L., . . . Pistillo, P. (2007). Association of -318 C/T and +49 A/G cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorfisms with a clinical subset of italian patients with systemic sclerosis. *Clinical and Experimental Immunology*, 40-47.
- Bertsias, G., Cervera, E., & Dimitrios, R. (2012). *Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis and clinical features*.
- Bethencourt, J. (2014). *Lupus eritematosos sistémico*. Tenerife, España. Obtenido de www.aeped.es/protocolos/.
- Bielsa, M., & Rodríguez, C. (Julio-Septiembre de 2010). Manifestaciones cutaneas del lupus eritematoso. *Inmunología*, 29(3), 100-110.
- BIOLAB. (2016). *New England BIOLAB*. Recuperado el Junio de 2016, de New England BIOLAB: <https://www.neb.com/products/restriction-endonucleases/restriction-endonucleases/types-of-restriction-endonucleases>
- Chen, H., Chen, Y., Chen, T., Lan, J., Lin, C., & Chen, D. (2011). Risk of herpes zoster in patients with systemic lupus erythematosus: a three-year follow-up study using a nation wide population-based cohort. *Clinica Science*, 1177-1182.
- Cooper, G., Gilbert, K., Greidinger, E., James, J., Pfau, J., Reinlib, L., . . . Rose, N. (2009). Recent avances and opportunities in research on lupus: enviromental influences and mechanism of disease. *Ciencia & saude coletiva*, 1865-1876.
- De la Osa, J., & Rodríguez, E. (23 de 12 de 2013). *Consultas médicas*. Recuperado el 23 de diciembre de 2013, de http://consultas.cuba.cu/consultas.php?id_cat=3&letr=l&id_cons=45&pagina=2

- Donner, H., Rau, H., Walfish, P., Braun, J., Siegmund, T., Finke, R., . . . Badenhoop, K. (1997). CTLA4 Alanine-17 Confers Genetic susceptibility to Graves Disease and to Type 1 Diabetes Mellitus. *Journal of clinical Endocrinology and Metabolism*, 143-146.
- Enberg, M., Kahn, M., Goity, C., Villalon, M., Zamorano, J., & Figueroa, F. (2009). Infecciones en pacientes con lupus eritematoso sistémico. *Revista médica de Chile*, 1367-1374.
- Eriquez, M. (2013). Fisiopatología del lupus eritematoso sistémico. *Revista de medicina e investigación*, 8-16.
- Gómez, J., & Cervera, R. (2008). Lupus eritematoso sistémico. *Medicina & Laboratorio*, 14(68), 211-223.
- Hahn, B., McMahon, M., Wilkinson, A., Wallace, W., Yazdany, J., Ramsey, R., . . . Grossman, J. (2012). American College of Rheumatology Guidelines for Screening, Case Definition, Treatment and Management of Lupus Nephritis. *Arthritis Care Res*, 797-808.
- Holubar, K. (2006). History of lupus erythematosus. *Acta Dermatoven APA*, 15, págs. 191-194.
- Hopkinson, N., Doherty, M., & Powell, R. (1994). Clinical features and race-specific incidence/prevalence rates of systemic lupus erythematosus in a geographically complete cohort of patients. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 675-680.
- Jiménez, J., Hidalgo, C., Sabio, J., Ruiz, G., Ramo, M., Robles, A. G., . . . Sáez, L. (2011). *LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO 2011, GUÍAS CLÍNICAS DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES SISTÉMICAS*. SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MEDICINA INTERNA (SEMI), Grupo de Estudio de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas (GEAS).
- Kek, C., Suat, P., Ching, C., Si, T., & Lay, L. (2010). Study of the CTLA-4 gene polymorphisms in systemic. *Annals of Hum an Biology*, 275-281.
- Kouiki, T., Sawai, Y., Gardine, C., Fisfalen, M., Alegre, M., & DeGroot, L. (2015). CTLA-4 Gene polymorphism al position 49 in exon 1 reduces de inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pthogenesis of Grave´s disease. *The journal of immunology*, 6606-6611.
- Koukina, E. (2014). Autoanticuerpos como Biomarcadores de actividad de la enfermedad del lupus eritematoso sistémico (Tema actualizado). *Revista cCubana de Medicina*.
- Lahita, R., H., K., & Fishman, J. (1981). Increased 16 alpha-hydroxylation os estradiol in systemic lupus erithematosus. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 174-178.
- Lee, Y., Harley, J., & Nath, S. (2005). CTLA-4polymorphisms and systemic lupus erythematosus (SLE):. *Hum Genet*, 261-367.
- Liu, C., Manzi, S., & Ahearn, J. (2005). Biomarkers of systemic lupus erithematosus: a review and perspective. 546.
- Liu, J., & Zhang, X. (2013). CTLA-4 Polymorphisms and Systemic Lupus. *GENETIC TESTING AND MOLECULAR BIOMARKERS*, 226-231.

- López, A. (Mayo de 1990). Anticuerpos Antifosfolípido en el Lupus Eritematosos Sistémico. *Anticuerpos Antifosfolípido en el Lupus Eritematosos Sistémico*. Barcelona, España: Facultad de Medicina - Universidad de Barcelona.
- Ministerio de Salud Deportes del Estado Plurinacional de Bolivia. (2009). *Encuesta Nacional de Demografía y Salud 2008*. Recuperado el 29 de Agosto de 2016, de <http://www.ops.org.bo/textocompleto/nendsa32182.pdf>
- Molina, J. (1989). Principales autoanticuerpos en lupus eritematoso sistémico y esclerosis sistémica. *Acta médica colombiana*, 14(2), 58-64.
- Muñoz, C., Pinto, L., Velasquez, C., Márquez, J., & Restrepo, M. (2013). Complicaciones infecciosas en lupus etitematoso sistémico. *Revista Colombiana de Reumatología*, 141-147.
- Nucamendi, G., Guillén, G., & Sánchez, E. (21-27 de Julio de 2103). *Dirección general de epidemiología México*. (S. d. salud, Ed.) Recuperado el 25 de Mayo de 2106, de <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2013/semanas/sem30/pdf/edit3013.pdf>
- Peñaranda, E., Méndez, R., Rondón, F., Restrepo, J., Quintana, G., & Iglesias, A. (Marzo de 2011). Historia sobre el papel de las hormonas y los anticonceptivos en el lupus. *Revista colombiana de Reumatología*, 18(1), 8-25.
- Potter, B. (1993). History of disease called lupus. *Journal of the History od medicine and allied sciences*, 48, 80-90.
- Pretel, M., Marqués, L., & España, A. (2012). Luús eritematosos inducido por fármacos. *Actas Dermo-Sifilograficas*, 18-23.
- Pullman, R. J., Lukác, j., Skerenová, M., Rovensky, J., Hybenová, J., Melus, V., . . . Hyrdel, R. (1999). Cytotoxic T lymphocyte antigen 4. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 725-729.
- Rodriguez, C., & Chacon, T. (2012). Taller de genética. *Taller de genética (tecnología de ADN recombinante y enzimas de restricción)*. Cordoba, Argentina.
- Rudd, C. (2008). The reverse stop- signal model for CTLA-4 function. *Nature Reviews*, 153-160.
- Sánchez, J., Catillo, M., & García, F. (2010). *Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, Manual de información para pacientes y familiares*. (A. Asoxiación de Autoinmunes y lúpicos de Sevilla, Ed.) Sevilla, España.
- Sanchez, S., Barajas, G., Ramirez, E., Moreno, A., & Barbosa, O. (2004). Lupus eritematoso: enfermedad autoinmune sistémica y órgano específica. *Revista Biomédica*, 173-180.
- Shooja, M., Amoli, M., Aghaie, m., Khashayar, P., Javid, N., Shakeri, F., . . . Mohammadi, Z. (2104). CTLA-4 polymorphism in Iranian patients with systemic lupus erithematosus. *American journal of experimental and clinical research*, 1(4), 68-71.
- Slamunic, I. (2010). Laboratory diagnosis of autoimmune diseases – new technologies, old dilemas. *Biochemia medic*.
- Stringa, O., & Troelli, P. (2006). *Concenso sobre diagnóstico y tratamiento de lupus eritematoso* (1 ed.). Argentina.

- Talal, N. (1979). Systemic lupus erythematosus, autoimmunity, sex and inheritance. *The New England Journal of Medicine*, 838-839.
- Teft, W., Kirchof, M., & Madrenas, J. (2006). A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annual Review of Immunology*, 65-98.
- Velásquez, C., Anaya, A., Rodríguez, L., Vargas, F., & Ramirez, L. (2011). Manifestaciones cutáneas de lupus eritematoso sistémico temprano y correlación con la actividad sistémica. *IATREIA*, 359-364.
- Velázquez, R., Jimenez, S., Ramírez, J., Aguilar, I., Salas, G., Baca, V., & Orozco, L. (2012). Lupus Eritematoso Sistémico (LES) genómica de la enfermedad. *Gaceta Médica de Mexico*, 371-380.
- Virella, G. (2007). *Medical Immunology*.
- Walker, L., & Samson, D. (2015). Confusing signals: Recent progress in CTLA-4 biology. *Trends in Immunology*, 36(2), 63-69.
- Yacoub, S. (2004). Gender differences in systemic lupus erythematosus. *Gender Medicine*, 12-17.

ANEXOS

Anexo 1

COMITÉ NACIONAL DE BIÓÉTICA COMISIÓN DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN (CEI)

16. HOJA DE INFORMACIÓN AL PARTICIPANTE

Asociación genética entre los portadores de los genes CTLA-4 y HLA-G con susceptibilidad a Lupus, en la etiología patogénica y niveles de complejos inmunes circulantes.

Este estudio ha diagnosticado Lupus Eritematoso Sistémico. El Lupus es una enfermedad autoinmune, de causa aún desconocida, el 90% de los casos ocurren en mujeres y en menor medida en hombres. Pero también es posible en hombres. Se sabe que entre los factores que predisponen a desarrollar la enfermedad, se encuentran el uso de anticonceptivos orales, la exposición al sol, el uso de antipsicóticos, el uso de ciertos medicamentos, como los virus, puede haber una transmisión (como sucede con el color de los ojos o color de cabello). En este estudio a través de exámenes de laboratorio, deseamos estudiar en una muestra de su sangre los niveles de ciertos anticuerpos, para aclarar el diagnóstico de la enfermedad. Si usted decide participar en este estudio, a usted, a sus hijos o a sus familiares, indicaremos que debe evitar complicaciones. En primer lugar, ya se han hecho en otros países y en personas de diferentes razas, en La Paz, se ha hecho la primera vez que se hagan estos exámenes.

Si usted decide participar en este estudio y su médico tratante está de acuerdo, el personal de salud de nuestro equipo de bioética, hará algunas preguntas sobre su estado de salud y lo examinará. Luego le tomaremos una muestra de 9 mL de sangre. Para ello utilizaremos una jeringa y aguja nuevas para realizar la punción en su brazo y obtener la muestra de sangre que será analizada en nuestros laboratorios. Esta prueba puede causar algunas molestias como sentir un dolor muy pasajero en el momento de la punción. Algunas veces puede presentarse un pequeño moretón en el lugar del pinchazo, si le sucediera a usted, por favor comuníquese inmediatamente con nosotros para recibir instrucciones o la indicación de tratamiento que nosotros le daremos sin costo alguno. Usted podrá recoger los resultados de sus exámenes a los siete días después de haberle tomado la muestra de sangre. El examen es sencillo y la toma de muestra tendrá una duración de aproximadamente 10 minutos. El sobrante de la sangre que usaremos para hacer las pruebas de laboratorio, será con ese fin y en función a los conocimientos sobre la enfermedad utilizaremos el sobrante que se guardó dentro de unos meses o años para hacer otros estudios complementarios que nos puedan ayudar a tener un diagnóstico de Lupus.

Beneficios y riesgos

Tiene como beneficio determinar la probabilidad genética de enfermar con lupus o de sufrir sus complicaciones. Los estudios a ser efectuados no tendrán ningún riesgo para usted.

Anexo 2

SELADIS FORMULARIO DE HISTORIA PACIENTES
CLINICA LES

CODIGO _____
FECHA ____/____/____

■ 1. DATOS PERSONALES

Apellidos Y Nombres: _____ Edad actual: ____ Genero: M F
Fecha de Naímiento ____ / ____ / ____ Lugar ae Nac. _____ Residencia: _____
Ocupación: _____ Estado civil _____ Raza: _____
Dirección Actual _____ Tell.: Celular _____ Dom: _____

2. DATOS CRONOLOGICOS

Edad de aparición del primer sintoma ____ Edad de Dx de LES ____ Duración de LES ----

3. ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLOGICOS

Fuma: Alcohol: **Nunca** En algún momento ____ En la actualidad ____
Anticonceptivos: **Nunca** En algún momento ____ En la actualidad ____
Gesta: ____ Para: **Nunca** En algún momento ____ En la actualidad ____
Ab : _____

4. ANTECEDENTES FAMILIARES

Familiar con LES Familiar con otra patología _____

5. MANIFESTACIONES AL INICIO DE LA ENFERMEDAD

Erupción Malar ____ Fotosensibilidad ____ Ulceras orales ____ Artritis ____ Serositis ____ Afectación renal ____
Alteración hematica ____ Alteración neurai ____ Otros _____

6. MANIFESTACIONES ACUMULADAS DE LA ENFERMEDAD

Erupción Malar ____ Fotosensibilidad ____ Ulceras orales ____ Artritis ____ Serositis ____ Afectación renal ____
Alteración hematica ____ Alteración neurai ____ Otros _____

7. MANIFESTACIONES EN LOS ULTIMOS 10 OIAS

Erupción Malar ____ Fotosensibilidad ____ Ulceras orales ____ Artritis ____ Serositis ____ Afectación renal ____
Alteración hematica ____ Alteración neurai ____ Otros _____

8. LABORATORIOS INICIALES

Os-DNA _____ **ANA** _____ anti-Sm _____ Anticardiolipinas _____
Otros _____

9. TRATAMIENTO ATUAL

10. PATIOLOGIAS ASOCIADAS

nroidopatia autoinmune ____ Ulcera Duodenal ____ Hepatopatía ____ EPOC ____ Diabetes ____ Dislipidemia ____
HAS ____ Sd Sjogren ____ Sd. Antifosfolipidico ____ EMTC ____ Otros _____

Medico tratante: _____ Especialidad: _____
Observaciones: _____

Anexo 3

SELADIS	FORMULARIO DE HISTORIA CLINICA LES	CONTROLES
----------------	---	------------------

CODIGO ----,-----,---
FECHA ____: ____ / ____

1. DATOS PERSONALES

Apellidos y Nombres: ----- Edad actual: ____ Genero: M F

Fecha de Nacimiento: ____ Lugar de Nac: ____ Residencia: -----

Ocupación: ----- Estado civil: _____ Raza: _____

Dirección Actual: _____ Telf.: Celular ----- Dom: _____

2. ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLOGICOS

Fuma: Nunca ___ En algún momento ___ En la actualidad ___

Alcohol: Nunca ___ En algún momento ___ En la actualidad ___

Anti Nunca ___ En algún momento ___ En la actualidad ___

conceptivos: Nunca ___ En algún momento ___ En la actualidad ___

Drogas:

Gesta: ____ Para: ____ Ab: _____

3. ANTECEDENTES FAMILIARES

Familiar con LES _____ Familiar con otra patología -----

4. TRATAMIENTO ATUAL

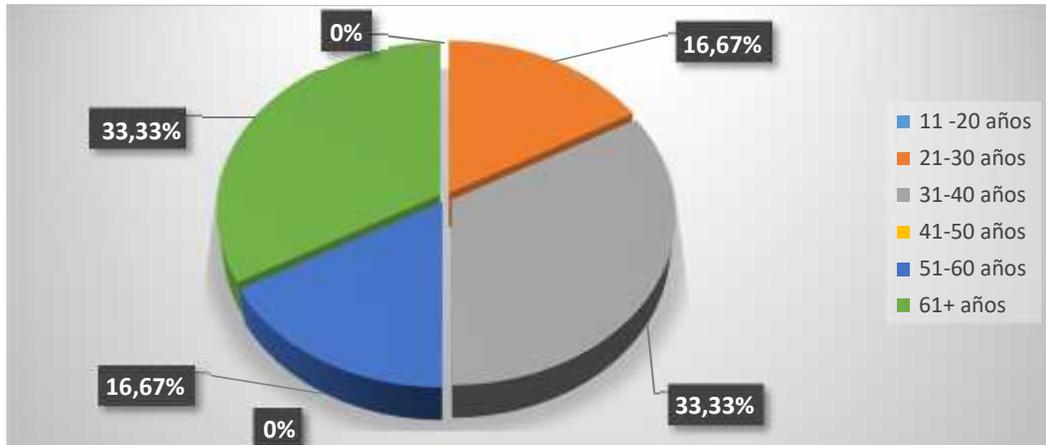
5. PATOLOGIA ACTUAL

SI_NO Cua ■ -----

Observaciones: -----

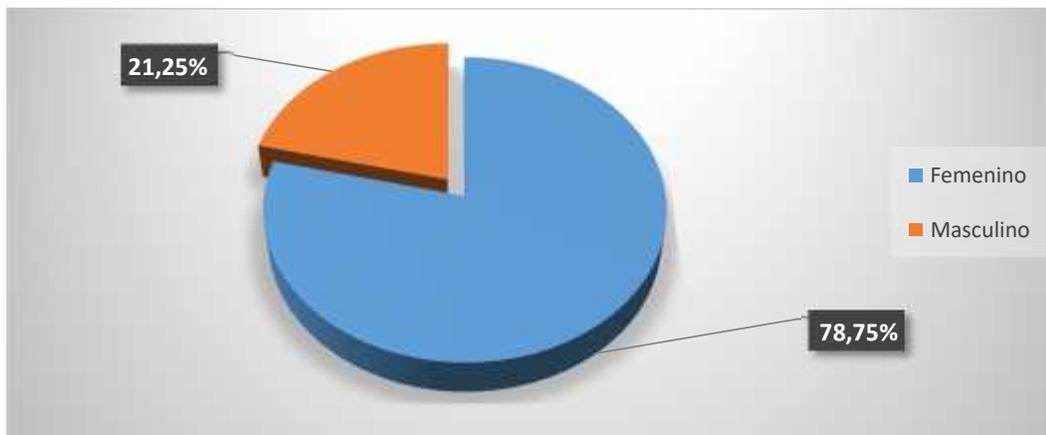
Anexo 4

Gráfico de la distribución de la edad en pacientes lúpicos de sexo masculino. El 33.33% se encuentra dentro del rango de 31 a 40 años, 33.33% 61 años o más, 16.67% de 21 a 30 años y 16.67% de 51 a 60 años



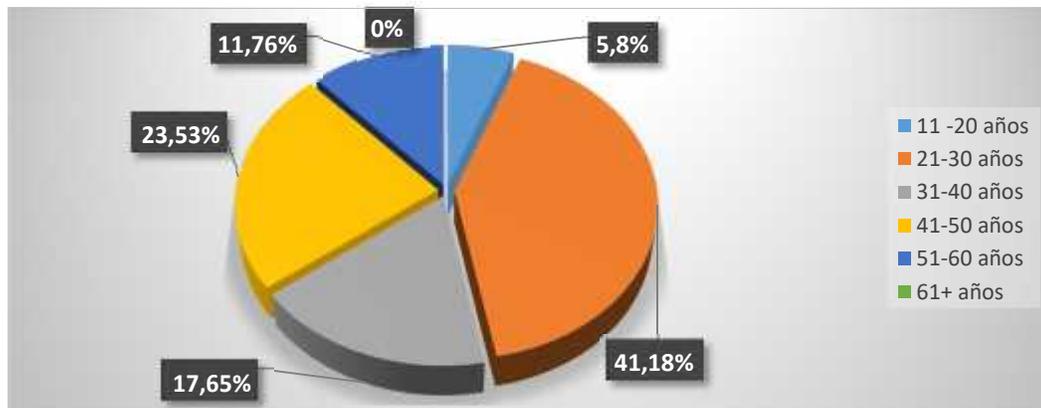
Anexo 5

Gráfico de la distribución del sexo en el grupo control. El 78,75% son mujeres y el 21,25% varones.



Anexo 6

Gráfico de la distribución de la edad en el sexo masculino del grupo control. El 41,18% se encuentra dentro del rango de edad de 21-30 años, 23,53% de 41-50 años, 17,65% de 31-40 años, 11,76% 51-60 años y el 5,8% de 11-20 años.



Anexo 7

Protocolo de digestión enzimática

Recommended Protocol for Digestion

- Add:

nuclease-free water	16 μ L
10X Buffer KpnI	2 μ L
DNA (0.5-1 μ g/ μ L)	1 μ L
KpnI	0.5-2 μ L*,**
 - Mix gently and spin down for a few seconds.
 - Incubate at 37°C for 1-16 hours**.
- The digestion reaction may be scaled either up or down.

Recommended Protocol for Digestion of PCR Products Directly after Amplification

- Add:

PCR reaction mixture	10 μ L (~0.1-0.5 μ g of DNA)
nuclease-free water	18 μ L
10X Buffer KpnI	2 μ L
KpnI	1-2 μ L*,**
- Mix gently and spin down for a few seconds.
- Incubate at 37°C for 1-16 hours**.

* This volume of the enzyme is recommended for preparations of standard concentrations (10 U/ μ L), whereas HC enzymes (50 U/ μ L) should be diluted with Dilution Buffer to obtain 10 U/ μ L concentration.

** See Overdigestion Assay.

Cálculos para la preparación del Mix PCR

- **Hidratación de primers**

$$= \frac{\cdot}{\cdot} =$$

$$= \frac{\cdot}{\cdot} =$$

- **Dilución de primers**

$$- = \quad - =$$

- **dNTPs 25 mM a 5 mM**

$$= =$$

- **MgCl₂**

$$= = \cdot$$

Asociación de pacientes lúpicos “ASBOLUP”

