

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y
BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE
DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD
LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD E
INMUNOGENÉTICA



ASOCIACIÓN GENÉTICA DEL POLIMORFISMO DEL
LOCUS HLA- G CON LA SUSCEPTIBILIDAD A
CONTRAER LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO Y LAS
MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD

Trabajo de post-grado para la obtención del Grado de Especialidad en Diagnóstico de Laboratorio en Salud, Mención Inmunología “Histocompatibilidad e Inmunogenética”

POR: Lic. GABRIELA CAROLA GUERRA MONRROY

TUTOR: Dr. LUIS FERNANDO SOSA TORDOYA, Esp.

LA PAZ – BOLIVIA
Julio, 2018

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO DE DIAGNOSTICO E
INVESTIGACION EN SALUD**

Trabajo de post-grado:

**ASOCIACIÓN GENÉTICA DEL POLIMORFISMO DEL LOCUS HLA- G CON
LA SUSCEPTIBILIDAD A CONTRAER LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO
Y LAS MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD**

Presentado por: Lic. Gabriela Carola Guerra Monrroy

Para optar por el grado académico de “Especialista en Diagnostico de Laboratorio en Salud, mención Inmunología, sub-mención Histocompatibilidad e Inmunogenética”

Nota numeral:

Nota literal:

Ha sido:.....

Tutor: Dr. Luis Fernando Sosa Tordoya, Esp.

Tribunal: Dra. Heidy de Salgueiro MS,

Tribunal: Dra. Ana Cruz Quispe, Esp

Tribunal: M. Cs. Sergio Emilio Quispe Mayta

Ante todo, amar y servir

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Mi mamá Anabel, por darme la vida, quererme mucho, creer en mí, porque siempre me apoyaste y sobre todo por ser mi ejemplo a seguir, por ser una mujer luchadora y emprendedora, todo esto te lo debo a ti. A mi papa Gonzalo, por los consejos, enseñanzas y apoyo incondicional que siempre me brinda en los bueno y malos momentos. Los amo infinitamente.

Al doctor Luis Fernando Sosa Tordoya por haber confiado en mí, por la paciencia, por su valiosa orientación y apoyo para seguir en este apasionado camino de la inmunología, por brindarme de forma incondicional sus conocimientos y sobre todo por la amistad que me brindo.

Mis agradecimientos por la colaboración a mi equipo de trabajo, al Dr. Sergio Cabrera y al Dr. José Luis Choquehuanca, que me brindaron todo su apoyo, consejos y conocimiento, sin los cuales este trabajo no sería posible.

Agradecer de forma especial a las guerreras de esta tesis, al grupo ASBOLUP, son la fuente principal de inspiración para culminar este trabajo y de seguir luchando con la fuerza que ustedes lo hacen contra la enfermedad.

Gracias a mis hermanos, a mis amados sobrino Jacques y Alexander por su apoyo, a Miguel Villegas por apoyarme, alentarme y hacer que todo sea más fácil y lindo a tu lado, a mis familiares y amigos que siempre me brindaron palabras de aliento y apoyo.

Tabla de contenido

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES	3
III. JUSTIFICACIÓN.	5
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
V. MARCO TEÓRICO	7
1. GENERALIDADES.....	7
2. HISTORIA.....	7
3. EPIDEMIOLOGÍA.....	9
a. NIVEL MUNDIAL:	9
b. A NIVEL LATINOAMERICANO:	11
c. A NIVEL NACIONAL:.....	11
4. DIAGNÓSTICO.....	12
4.1 Criterios de diagnóstico de LES según el Colegio Americano de Reumatología.....	13
4.2 Criterios de las Clínicas Colaboradoras Internacionales de Lupus Sistémico (SLICC).....	15
5. AUTOANTICUERPOS EN LES.....	17
a. Anticuerpos antinucleares	19
b. Anticuerpos anti-ADN.....	19
c. Anticuerpos anti-histona y anti Nucleosoma.....	20
d. Anticuerpos anti-Ro/ssA y anti-La/ssB	21
e. Anticuerpos anti-Smith (anti-Sm) y anti-RNP	21
f. Sistema del complemento	22
6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	23
a. Manifestaciones mococutáneas.....	23
b. Manifestaciones renales.....	23
c. Manifestaciones musculo esqueléticas	24
d. Manifestaciones hematológicas.....	24
e. Manifestaciones vasculares.....	24
7. FISIOPATOLOGÍA	25
7.1 Factores desencadenantes.....	27

a. Efectos de las hormonas sexuales sobre los Linfocitos T:	30
b. Efectos de las hormonas sexuales sobre los Linfocitos B	30
c. Efectos de las hormonas sexuales sobre la producción de citoquinas:	31
7.2 Mecanismos epigenéticos	35
8. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD	38
a) Tipos de moléculas HLA	38
b) Moléculas HLA clase I.....	39
c) Moléculas HLA clase II.....	41
d) Expresión del HLA en enfermedades autoinmunes.....	43
9. EXPRESIÓN DEL HLA-G, POLIMORFISMO Y FUNCIÓN	44
a) Distribución del HLA-G	48
b) Polimorfismo de HLA-G.....	48
c) Polimerización	50
d) Polimorfismos de la región HLA-G 3' no traducida (UTR)	51
e) Funciones inmunológicas	52
10. INMUNOGENÉTICA COMO INSTRUMENTO DE DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES.....	59
✓ PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	59
VI. OBJETIVOS	62
VII. DISEÑO METODOLOGICO	63
a) Diseño del estudio.....	63
i. Tipo de diseño	63
ii. Flujograma de la investigación	63
b) Población en estudio.....	63
c) Descripción de la población.....	64
i. Grupo caso	64
ii. Grupo control.....	64
iii. Criterios de exclusión	65
d) Tamaño de la muestra	65
e) Lugar.....	65
f) Financiamiento.....	65
VIII. MATERIAL Y METODOS	66
a) Toma de muestra.....	66

b) Pretratamiento de la muestra.....	66
c) Extracción y cuantificación de ADN	66
d) Primers empleados para la hibridación la secuencia de 14 pb de la región 3' UTR del gen HLA-G	67
e) Optimización de la PCR	68
• Condiciones de la temperatura de hibridación la PCR	69
f) Revelado de los productos de PCR amplificados.....	69
g) Interpretación de resultados	69
h) Evaluación inmunoserológica.....	70
i) Análisis estadísticos	71
j) Aspectos éticos	71
IX. RESULTADOS.....	73
X. DISCUSION.....	81
XI. CONCLUSIONES	92
XII. RECOMENDACIONES	94
XIII. BIBLIOGRAFIA	95
XIV. ANEXOS.....	98

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Antecedentes históricos sobre la descripción del Lupus Eritematoso Sistémico	8
Tabla N°2. Criterios del ACR de 1982 revisados en 1997 para el diagnóstico de LES..	14
Tabla N°3. Criterios SLICC del 2012 para el diagnóstico de LES	16
Tabla N°4. Autoanticuerpos en el criterio y diagnóstico del LES	18
Tabla N°5. Cálculos realizados para obtención de concentraciones ideales de los reactivos para la elaboración del Master MIX de la PCR	68
Tabla N°6. Datos descriptivos y demográficos de pacientes lúpicos y controles	73
Tabla N°7. Comparación entre las condiciones de temperatura y ciclaje de la PCR propuesta por C.R. Consiglio et al. (2011) y las condiciones de temperatura y ciclaje de la PCR optimizada en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética.	75
Tabla N°8. Comparación de las condiciones para la preparación del Master MIX propuestas por C.R. Consiglio et al. (2011) y las condiciones del Master Mix optimizadas en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética.....	76
Tabla N°9. Frecuencias genotípicas, alélicas, Odds Ratio (OR) y Chi cuadrado (X^2) obtenidos para la asociación del polimorfismo del Locus HLAG entre pacientes - controles y la posible susceptibilidad a LES	79
Tabla N°10. Asociación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo HLA-G de pacientes lúpicos con las manifestaciones clínicas reportadas en el transcurso de su enfermedad.....	80

INDICE DE FIGURAS

Figura N°1. Mecanismos para la inducción y amplificación de la autoinmunidad en LES.....	27
Figura N°2. Comunicación bidireccional entre el sistema neuroendocrino y el sistema inmune.....	29
Figura N°3. Ubicación de los genes HLA clase I, II y III en el brazo corto del cromosoma 6.....	39
Figura N°4. Molécula HLA clase I	40
Figura N°5. Estructura tridimensional HLA clase I.....	41
Figura N°6. Molécula HLA clase II.....	42
Figura N°7. Representación de las isoformas del HLA-G	46
Figura N°8. Mapa del complejo mayor de Histocompatibilidad en la región cromosómica 6p21.3.....	47
Figura N°9. Funciones tolerogénicas de HLA-G mediante la unión a receptores expresados en diferentes tipos de células inmunitarias.....	54
Figura N°10. Proceso de la Reacción en Cadena Polimerasa.....	62

INDICE DE FOTOGRAFIAS

- Fotografía N°1.** Gel de agarosa con la presencia de las distintas bandas amplificadas de los casos y controles y control negativo..... **70**
- Fotografía N°2.** Comparación de corridas electroforéticas de los productos amplificados bajos las condiciones de PCR propuestas en el protocolo de C.R. Consiglio et al. (2011) “A” y el protocolo optimizado en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS “B”..... **76**
- Fotografía N°3.** Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 5% con los productos amplificados del grupo control y pacientes lúpicos bajos las condiciones de PCR optimizadas en el laboratorio de Histocompatibilidad e inmunogenética..... **77**

RESUMEN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad inflamatoria del tejido conectivo de etiología desconocida, con presentación clínica diversa por su carácter sistémico. Se caracteriza por sus periodos clínicos de remisión y brote de la enfermedad, que pueden conducir al desarrollo de daño acumulado sobre uno o más órganos o sistema.

Se han descrito varios factores predisponentes a la enfermedad, entre ellos los genéticos. Uno de los factores genéticos descrito como factor de riesgo a la enfermedad es el polimorfismo de Inserción/Delección (Ins/Del) una secuencia de 14 pb localizado en la región no traducida 3' (3' UTR) del gen HLA-G, mismo que en diferentes estudios poblacionales, ya sea homocigosis o heterocigosis ha sido asociado como factor de riesgo para el desarrollo de LES.

Por lo tanto, el presente estudio evaluó la posible asociación entre el polimorfismo genético de la proteína sHLA-G, con la susceptibilidad a Lupus Eritematoso Sistémico y sus manifestaciones clínicas en pacientes lúpicos atendidos en el Instituto SELADIS entre las gestiones 2014 al 2016.

Se incluyó a 232 pacientes, distribuidos en 120 pacientes lúpicos y 112 pacientes control. Se obtuvo el material genético a partir de sangre periférica para luego realizar la genotipificación del polimorfismo (Ins/Del) de 14 pb presente en la región 3' UTR del gen HLA-G mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Mediante un estudio caso-control se determinó las frecuencias alélicas y genotípicas del gen en evaluación, se empleó una prueba molecular optimizada en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS, a partir del polimorfismo encontrado en cada sujeto de análisis, se estableció si estos eran factores de riesgo o protección a la enfermedad.

Mediante los métodos estadísticos Odds Ratio (OR) y Chi cuadrado (X^2) y valor p (<0.05), a un nivel de significancia del 5 %, se estableció la significancia de los datos encontrados.

Se observó que los pacientes lúpicos tienen mayor frecuencia de expresión del genotipo Ins/Del (OR=1.72, $p<0.05$); mientras que, la presencia del genotipo homocigoto Ins/Ins es más frecuente en el grupo control (OR=0.29, $p<0.001$), mostrándose el primer genotipo un factor de riesgo y el segundo, un factor de protección a padecer LES respectivamente.

Con respecto al análisis de asociación entre las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo del HLA-G con las manifestaciones clínicas, se observó que el polimorfismo Ins/Del (OR=8.64; $p=0.001$), es factor de riesgo para el desarrollo de las manifestaciones dermatológicas, y que los genotipos Del/Del e Ins/Ins son factores de protección para los pacientes lúpicos con valores de OR de 0.25 y 0.30 respectivamente.

Las manifestaciones hematológicas presentan el polimorfismo Del/Del (OR=2.75, $p=0.0140$) como un factor de riesgo y el polimorfismo Del/Ins (OR=0.43, $p=0.0364$) como un factor de protección.

Los resultados del presente estudio permiten concluir que el genotipo Ins/Del y el alelo deleción son factores de riesgo a padecer la enfermedad; y los genotipos que representan riesgo con las manifestaciones clínicas de la enfermedad son: Ins/Del para manifestaciones dermatológicas y Del/Del para las manifestaciones hematológicas.

PALABRAS CLAVE: Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH), Antígeno Leucocitario Humano (HLA), Lupus Eritematoso Sistémico (LES), HLA-G, asociación genética

SUMMARY

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an inflammatory disease of the connective tissue of unknown etiology, with diverse clinical presentation due to its systemic character. It is characterized by its clinical periods of remission and outbreak, which can lead to the development of cumulative damage to one or more organs or system.

Several predisposing factors to the disease have been described, among them the genetic ones. One genetic factor described as risk factor for the disease is the insertion/deletion polymorphism (Ins / Del) of a 14 pb sequence located in the 3' untranslated region (3' UTR) of the HLA-G gene, that in different population studies, either homozygosis or heterozygosis has been associated as a risk factor for the development of SLE.

Therefore, the present study evaluated the possible association between the genetic polymorphism of the sHLA-G protein, with the susceptibility to systemic lupus erythematosus and its clinical manifestations in lupus patients who attended at the SELADIS Institute between 2014 and 2106.

232 patients were included, distributed in 120 lupus patients and 112 patient control. The genetic material was obtained from peripheral blood, the genotyping of the polymorphism (Ins / Del) of 14 pb present in the 3' UTR region of the HLA-G gene was performed by polymerase chain reaction.

Through a case-control study, the allelic and genotypic frequencies of the gene under evaluation were determined, an optimized molecular test in the SELADIS Institute was use. Based on the polymorphism found for each patient, we evaluate if they were eighther a risk factors or protection to the disease.

Using the statistical methods Odds Ratio (OR), Chi squared (X²) and p value (<0.05), a level of significance of 5% for the data found was established.

It was observed that lupus patients have a higher frequency of expression of the Ins / Del genotype (OR = 1.72, $p < 0.05$); whereas, the presence of the homozygous Ins / Ins genotype were more frequent in the control group (OR = 0.29, $p < 0.001$), showing the first genotype a risk factor and the second, a protection factor for LES respectively.

Regarding to the association analysis between the allelic and genotypic frequencies of the HLA-G polymorphism with clinical manifestations, its has been established that the Ins / Del polymorphism (OR = 8.64, $p = 0.001$), is a risk factor for the development of the dermatological manifestations, and the Del / Del and Ins / Ins genotypes are protection factors for lupus, with OR values of 0.25 and 0.30 respectively.

The hematological manifestations showed the Del / Del polymorphism (OR = 2.75, $p = 0.014$) as a risk factor and the Del / Ins polymorphism (OR = 0.43, $p = 0.0364$) as a protection factor.

The results of this study allow us to conclude that the Ins / Del genotype and the deletion allele are risk factors for the disease; and the genotypes Ins / Del and Del / Del represent a risk to dermatological and hematological clinical manifestations.

KEYWORDS: Principal Histocompatibility Complex (PHC), Human Leukocyte Antigen (HLA), Systemic Lupus Erythematosus (SLE), HLA-G, genetic association.

I. INTRODUCCIÓN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es considerado una enfermedad multisistémica, ya que puede afectar a diversos órganos como riñones, corazón, pulmones, piel, llegando a afectar incluso al sistema nervioso, hematológico (Enriquez-Mejia, 2013)

El LES es una enfermedad que afecta con una frecuencia nueve veces mayor a mujeres que a hombres, sobre todo a mujeres en edad fértil. Partiendo desde el punto de vista, el 90% de los pacientes con lupus son mujeres. Se atribuye a las hormonas femeninas un papel preponderante en el desarrollo de la enfermedad, en consecuencia, las hormonas masculinas y el cromosoma Y proveen un efecto protector.

Los factores genéticos son de suma importancia para determinar la susceptibilidad al LES y la complejidad de las manifestaciones clínicas con las que se presenta. Un gran número de genes han sido ampliamente estudiados, y se han identificado varios genes como factores predisponentes de la enfermedad, entre los cuales los genes del complejo mayor de Histocompatibilidad (CMH) representan los loci genómicos más fuertemente asociados al riesgo de padecer LES. Dentro de la región del CMH, los genes que codifican el antígeno leucocitario humano (HLA), tienen importantes funciones en la regulación del sistema inmune (SI) y han sido asociados con el desarrollo del LES. (Gómez-Puerta, 2008)

Uno de los loci que se codifica en el sistema genético HLA es el antígeno leucocitario humano G (HLA-G), esta molécula se caracteriza por la expresión restringida en células nucleadas y por tener polimorfismo genético limitado (50 variantes alélicas) con relación a otras moléculas HLA. (Nolan. Anthony Research Institute, 2015).

El HLA-G desempeña un papel importante en la inmunosupresión, realizando esta acción a través de diferentes mecanismos: inhibición de la actividad citotóxica de linfocitos T citotóxicos (CTL) y células natural killer (NK). En las enfermedades inflamatorias, se ha postulado que la expresión de HLA-G puede ser un posible mecanismo de protección de

los tejidos contra respuesta inflamatoria. (Costa-Reis & Sullivan, 2013)

En la región no traducida 3' (3 UTR) del gen *HLA-G*, existe un polimorfismo de inserción/delección (I/D) de 14 pb que ha demostrado influir en la estabilidad del ARN mensajero (mARN) de la molécula HLA-G (Gómez-Puerta, 2008). La influencia de este polimorfismo en la secuencia de nucleótidos del mARN hace que exista una menor producción de HLA-G, lo que provoca que el sistema inmunitario no sea eficientemente regulado, favoreciendo indirectamente el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes como LES. Este motivó el desarrollo de diversas investigaciones que han reportado que el polimorfismo en el fragmento de 14 pb en el gen HLA-G está asociado con riesgo de padecer LES.

Bajo el antecedente que los polimorfismos genéticos varían de un grupo poblacional a otro, motiva a que en el presente trabajo se pretenda determinar las frecuencias genotípicas y alélicas del gen HLA-G, para así poder relacionarlo o no con la susceptibilidad a padecer LES o alguna de las manifestaciones clínicas particulares de la enfermedad. De esta manera se pretende ayudar con un nuevo marcador genético como un aporte destinado a coadyuvar en el diagnóstico de la enfermedad en aquellos casos en los que la clínica y la serología no son suficientes. Por otra parte, contribuye con un marcador genético predictor de las complicaciones clínicas que puede desarrollar a mediano o largo plazo el paciente lúpico.

II. ANTECEDENTES

El factor genético en la patogénesis del LES es apoyado fuertemente por estudios en humanos y animales en los que se desarrolla espontáneamente la enfermedad. La búsqueda de genes que predisponen a una persona a desarrollar LES se ha hecho a través de los estudios de asociación de genes candidatos y el análisis de la frecuencia alélica de los loci HLA y otros genes no HLA, que han tenido un éxito mensurable en las últimas décadas. (Aifen & Wei-Hua, 2015)

Hoy por hoy se vienen realizando un gran número de estudios genéticos que apuntan hacia el polimorfismo que existe en la molécula HLA-G, en los cuales se puede apreciar una discrepancia de resultados de asociación genética que existe con respecto a LES.

Un estudio realizado en China muestra evidencias de la delección de 14 pb en la molécula HLA-G, tiene una gran implicancia en las enfermedades inflamatorias como es el Lupus Eritematoso Sistémico y la Artritis Reumatoide, se postula que el $\text{INF-}\gamma$ induce la expresión de HLA-G en la superficie celular y sobre regula los transcritos de mRNA correspondientes a las diferentes isoformas de HLA-G. (Chen, Moreau, & Donadi, 2015)

Veit y colaboradores realizaron un estudio en población brasilera en el cual evidenciaron que los pacientes heterocigotos (Ins/Del) tienen menor actividad de la enfermedad a diferencia de los pacientes homocigotos para el alelo delección (Del/Del). Además, determinaron que los pacientes que portan el genotipo Ins/Del tienen un mayor riesgo a la fotosensibilidad. (Veit, TD; Cordero, EA; Monticelo, OA. 2009).

En el año 2009 Wu y colaboradores en población china demostraron que no existía diferencia significativa en el polimorfismo Ins/Del del fragmento de 14 pb del gen HLA-G entre pacientes lúpicos y el grupo control. Demostraron por otra parte, que los pacientes lúpicos que mostraban afectación neurológica presentaban niveles elevados de HLA-G. (Wu, FX; Wu, LJ; Luo, XY; Tang, Z; Yang, MH; Xie, CM; Liu, NT; Zhou, JG; Guan, JL; Yuan, GH, 2009).

Un estudio en población brasilera, indica que en la región no traducida (3' UTR) del gen HLA-G, el sitio polimórfico (14-bp Ins/Del), se asoció con la protección al desarrollo de LES (Lucena-Silva, y otros, 2013).

Existen pocos estudios sobre el impacto de los polimorfismos de los genes HLA de clase I en pacientes latinoamericanos con Lupus Eritematoso Sistémico y en particular en población boliviana no existe datos publicados sobre este aspecto. Por lo tanto, es necesario desarrollar estudios que nos brinden información acerca del impacto de estos polimorfismos en la susceptibilidad a LES o a sus manifestaciones clínicas en pacientes bolivianos.

III. JUSTIFICACIÓN.

Los marcadores serológicos que actualmente se están empleando para el diagnóstico de lupus no son lo suficientemente específicos y sensibles para hacer un diagnóstico precoz u oportuno de la enfermedad, es así que en la mayoría de los casos la enfermedad es diagnosticada cuando el paciente ya ha hecho afectación de algún órgano o sistema.

Los aspectos antes mencionados, han motivado a los especialistas del área a buscar marcadores genéticos que permitan primero, identificar a las personas en riesgo de contraer la enfermedad o a los familiares de los pacientes lúpicos que al portar un gen de riesgo tengan una alta probabilidad de contraer la enfermedad.

Otro interés es que los marcadores genéticos en el caso del LES permitan predecir que órgano(s) pueden ser afectados por la enfermedad, permitiéndose de esta manera el empleo de medicina preventiva o medicina personalizada para cada paciente en función al alelo o alelos de riesgo que porte.

Uno de los muchos genes estudiados e identificados como candidato de riesgo a LES es el gen HLA-G y sus polimorfismos (Ins/Del, Del/Del e Ins/Ins). En estudios realizados en Europa, Asia, África y Brasil, se demuestra la existencia de asociación entre el polimorfismo genético del gen HLA-G, con el LES y a algunas de sus manifestaciones clínicas.

En nuestro país no se ha realizado un estudio similar para evaluar el potencial que tiene este gen en la predicción del riesgo de la enfermedad o en la predicción de las consecuencias orgánicas que la enfermedad puede producir en los pacientes bolivianos. Si los resultados del estudio corroboran la existencia de asociaciones positivas entre el polimorfismo genético y el riesgo a la enfermedad y/o a sus manifestaciones clínicas, permitirá que los médicos especialistas puedan realizar un diagnóstico más temprano y certero de la enfermedad, que tengan un mejor conocimiento de la progresión de la enfermedad, así como evaluar e implementar nuevas estrategias terapéuticas específicas para cada paciente que le permitan a este sobrellevar de mejor manera la enfermedad.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El lupus eritematoso sistémico al ser una enfermedad autoinmune crónica de orden invalidante implica un serio problema socioeconómico para el paciente y para su entorno familiar y para la seguridad social.

La experiencia en presentación de servicios del laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS ha permitido establecer que la mayoría de los pacientes lúpicos no cuentan con un seguro médico que coadyuve con los gastos que se deben efectuar para realizar las pruebas de laboratorio de control y menos aún para pagar el alto costo del tratamiento. El hecho de no poder cumplir un régimen terapéutico adecuado implica para este grupo de pacientes desarrollar nefropatía lúpica o padecer afecciones en el sistema nervioso central, entre otras, entidades que requieren tratamientos más costosos. Estos aspectos en general condicionan a este grupo de pacientes a sucumbir ante las complicaciones de la enfermedad.

La medicina preventiva y la medicina personalizada son estrategias médicas que están en proceso de desarrollo e implementación con el fin de conocer las características clínicas de cada persona que padece de alguna enfermedad. Estas nuevas estrategias clínicas permiten que pacientes reciban intervenciones oportunas para retardar en desarrollo de la enfermedad o para controlar terapéuticamente las consecuencias propias de la enfermedad mediante la administración de la terapia específica que requiere el paciente en función a sus características clínicas y genéticas.

Dado el impacto socio económico que tiene esta enfermedad y con la responsabilidad de contribuir en el campo de la medicina preventiva y personalizada, el presente trabajo se plantea la siguiente pregunta de investigación.

¿En qué medida el polimorfismo Ins/Del existente en el exón 8 de la molécula HLA-G está asociado al Lupus Eritematoso Sistémico o a las manifestaciones clínicas en la población de pacientes lúpicos bolivianos?

V. MARCO TEÓRICO

1. GENERALIDADES

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmune, inflamatoria de etiología desconocida en la que los órganos, tejidos y células se dañan por la adherencia de complejos inmunitarios y diversos autoanticuerpos dirigidos contra un amplio espectro de antígenos nucleares, dando lugar a múltiples manifestaciones clínicas y compromiso orgánico característicos de la enfermedad.

Al ser, una enfermedad de etiología desconocida, se conoce que diferentes factores están asociados a dicha enfermedad, como ser: factores genéticos, hormonales y ambientales, químicos y biológicos que interaccionan de una forma compleja en su clínica, dando como resultado una pérdida de la tolerancia del organismo a sus propios constituyentes, la producción de autoanticuerpos, la formación de complejos inmunes y daño tisular. (Salud, 2005) Con frecuencia se detectan factores desencadenantes, como la exposición a la luz ultravioleta, las situaciones de estrés, infecciones o ciertos fármacos.

Afecta predominantemente a mujeres en edad fértil, con una relación mujer/hombre de 9/1. Es habitual su inicio entre la segunda y cuarta décadas de la vida, aunque se puede presentar a cualquier edad. Aparece en todas las razas, si bien la enfermedad parece ser más severa en la raza negra, y en personas de origen hispano. (Enriquez-Mejia, 2013)

2. HISTORIA

El LES es conocido desde hace más de cinco siglos, pero su denominación ha sufrido diversas variaciones a lo largo de los años debido al mejor conocimiento e individualización de la enfermedad. En las primeras descripciones de los siglos XV y XVI se utilizaba el término “lupus” (lesión parecida a la mordedura de lobo) para referirse a unas ulceraciones faciales que se extendían de forma progresiva y destructiva. (Blotzer,

1983).

En el año 1833, Biett individualizó estas lesiones cutáneas de otras parecidas (lupus tuberculoso) e introdujo el término “eritema centrífugo”, que corresponde a la forma discoide de la enfermedad. Veinte años después adoptaron por primera vez la denominación “lupus eritematoso” y se señaló el predominio de la enfermedad en el sexo femenino, así como la afección articular. Posteriormente, Kaposi en 1872 describió las lesiones faciales “en vespertilio” (murciélago), características de la enfermedad, así como la posibilidad de afectación sistémica grave. (Gómez-Puerta, 2008).

Desde el punto de vista clínico, en 1948, fueron descritas las células LE en pacientes con LES. En 1957, George Friou identificó los anticuerpos anti nucleares y Deicher, Colman y Kunkel describieron los anticuerpos anti-ADN, con lo que se validó y estandarizó nuevas técnicas para la determinación de dichos autoanticuerpos en pacientes lúpicos. (Gómez-Puerta, 2008)

Tabla N° 1 . Antecedentes históricos sobre la descripción del Lupus Eritematoso Sistémico

Época histórica	Aportes
1846 Von Hebra	Introdujo la metáfora “mariposa” para describir el Rash malar. El cual hizo la primera publicación ilustrada de Lupus Eritematoso sistémico con el “Atlas de enfermedades de la piel”
Kaposi (1837- 1902) Osler y Jadassohn	Reconocen la naturaleza sistémica de la enfermedad.
1909 Reinhart and Hauck	Falso positivo para serología para sífilis
1923 Libman and Sacks	Lesiones típicas de endocarditis en LES
1935 Baehr	Cambios glomerulares típicos
1941 Klemperer y Baehr	Enfermedad difusa de tejido conectivo
1948 Hargraves, Richmond y Morton	Descubrimiento de células LE

3. EPIDEMIOLOGÍA

Las manifestaciones clínicas del LES, su curso y pronóstico son enormemente heterogéneos, los estudios de incidencia y prevalencia son dificultosos, se hacen necesarios estudios multicéntricos observacionales, con alto grado de estandarización y suficiente número de pacientes, para poder avanzar en el conocimiento de esta compleja enfermedad. Los registros de los centros de salud permiten alcanzar tamaños muestrales grandes, reclutar pacientes no seleccionados, en condiciones de práctica clínica «real», y llevar a cabo seguimientos más prolongados que los ensayos clínicos. Esto posibilita una mejor valoración de desenlaces como el daño, la comorbilidad y la mortalidad, así como el análisis comparativo de subgrupos de pacientes. No es de extrañar, por tanto, que los registros multicéntricos de pacientes con LES y sus cohortes derivadas se hayan convertido en una herramienta fundamental en la investigación clínica sobre la enfermedad. (Iñigo Rúa-Figueroa, 2014)

Los estudios epidemiológicos del LES muestran una considerable variabilidad, debido a la heterogeneidad de la enfermedad, las características de cada comunidad, factores geográficos o ambientales y los periodos de estudio. Existen diferencias entre países, e incluso entre áreas geográficas de un mismo país. Otro factor es la diferencia metodológica entre estudios, en cuanto a las formas de detección y clasificación de los pacientes. (Manzi, 2001)

a. NIVEL MUNDIAL:

La frecuencia del LES está en aumento, fundamentalmente porque se detectan cada vez más casos de la enfermedad. Las tasas de incidencia y prevalencia difieren dependiendo de la raza y el país o área geográfica en cual se realiza el estudio. La prevalencia en la población general, en dependencia de la zona, se encuentra entre 4 y 250 casos por cada 100. 000 habitantes: en Norteamérica, Asia y en el Norte de Europa afecta a 40 de cada 100. 000 habitantes, con una mayor incidencia entre la población hispana y afroamericana. (Bermúdez Marrero, Vizcaíno Luna, 2017)

En los Estados Unidos, estudios epidemiológicos reportaron que una de cada 4.000 personas padece la enfermedad y que las mujeres la padecen de 5 a 15 veces más a menudo que los hombres. El estudio EPISER (Estudio de Prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española). evidenció una prevalencia de 9 casos por 100.000 habitantes. Otro estudio realizado en España, realizado con un tamaño muestral de 154 pacientes, mostró que el 54% tenían antecedentes patológicos familiares de LES o de alguna enfermedad del colágeno; al analizar el riesgo y considerar el número de familiares de primer grado con enfermedades autoinmunes el riesgo de padecer LES entre los años 2000 y 2016 aumentó en un 5% proporcionalmente (Bermúdez Marrero, Vizcaíno Luna, 2017)

En el año 2013 se estimaba que existían 5 millones de personas que padecían LES en todo el mundo, en España para el año 2013 se reportó que lo sufren 20.000 mil personas, y se mencionó que esa cantidad solo sería una estimación, ya que se sospechaba que existan muchos más afectados y aún no detectados. (Boletín epidemiológico, 2013)

En México informes sobre su prevalencia citan cifras de 88 por 100.000 en mujeres de 15 a 65 años de edad, tanto en la población blanca como en la población negra. (Bermúdez Marrero, Vizcaíno Luna, 2017)

De la población de niños con enfermedades reumáticas, el 2% padece LES. Hay pocos datos epidemiológicos fidedignos. La incidencia oscila entre 0,4 y 9,0 por 100.000 niños. Se presenta más en la raza negra, asiática e hindú que en la caucásica. En los menores de cuatro años la relación femenino-masculina es de 2 a 1, aumenta en la pubertad hasta 3 a 1 o de 5,5 a 1. (Marrero, 2017)

Un 15-20% de casos de LES son diagnosticados en la infancia o la adolescencia. Este grupo suele denominarse LES de inicio infantil o juvenil, con un límite superior de edad en torno a los 18 años (rango 14 – 20 años) (Pons-Estel, y otros, 2015). Su incidencia se sitúa entre los 2 y más de 20/100000 habitantes/año en población brasileña. (Mina R, 2013).

b. A NIVEL LATINOAMERICANO:

La sociedad Chilena de Reumatología (SOCHIRE) cifraba hasta el año 2013 una prevalencia de 70 a 91 casos por cada 100.000 habitantes, y en cuanto a la incidencia se podría estimar en unos 700 nuevos casos por año que corresponde a una cifra de 4 en cada 100.000 personas asemejándolo al nivel de Puerto Rico. (Iturrieta, 2013)

La revista Lupus publicó en el año 2012 una revisión sobre la incidencia del lupus realizada por el Grupo Latinoamericano de Estudio del Lupus (GLADEL), este estudio de cohorte tuvo como fin obtener datos realistas de los pacientes con LES en América Latina, para una mejor comprensión de los nuevos casos y los datos estadísticos del lupus en esta región multiétnica. Para tal fin, GLADEL reclutó un total de 1.480 pacientes con LES de distintas etnias (afro-latinoamericanos, mestizos, caucásicos, entre otros) de treinta y cuatro centros de salud de nueve países de América Latina: Argentina, Brasil, Colombia, Cuba, Chile, Guatemala, México, Perú y Venezuela. La mayoría de los pacientes incluidos, unos 645 (43,6%) eran mestizos (personas de Europa y Amerindios), y 606 eran de raza caucásica (40,9 %); y unos 174 eran afro-latinoamericanos (ALA) (11,8 %) (Red informativa de medicina avanzada (RIMA), 2012).

De acuerdo con estos investigadores, la actividad de la enfermedad fue mayor en el grupo afro-latinoamericano y menor con los caucásicos comparado con los mestizos. Además de que el bajo nivel de educación y la falta de cobertura de salud fueron algunos predictores de la actividad de la enfermedad. Asimismo, se encontró que los pacientes mestizos y ALA tienen una mayor incidencia de linfopenia, mientras que los pacientes mestizos son más propensos a sufrir daño renal en comparación con los caucásicos. (Red informativa de medicina avanzada (RIMA), 2012)

c. A NIVEL NACIONAL:

En Bolivia, el Ministerio de Salud no cuenta con datos estadísticos oficiales acerca de la prevalencia o incidencia de la enfermedad. Datos extra oficiales como los reportados por

el Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS-FCFB-UMSA, reportan que en el departamento de La Paz se confirman un promedio anual de 130 nuevos casos de lupus, donde el 90% de enfermos son mujeres en edad fértil (Pérez, 2014).

Un estudio realizado en el Hospital del Niño en la ciudad de La Paz indica que la prevalencia de LES es de 5 a 10 por 100.000 niños, estimándose que del 15 a 17% de los casos se presentan antes de los 16 años, es también menos común en niños de 10 años y raro en niños menores de 5 años, el sexo femenino es el más afectado en una taza de 10:1.

El lupus es más severo en los niños que en los adultos, donde la enfermedad renal afecta entre el 50 al 90% de niños, por lo cual, la mortalidad es mayor. Actualmente, con tratamientos agresivos en pacientes con compromiso renal la sobrevivida a 10 años puede alcanzar hasta el 85% y en pacientes sin compromiso renal hasta el 100%. Las causas de muerte de los niños con LES generalmente son el resultado de infecciones, nefritis, insuficiencia renal, enfermedades del sistema nervioso central o hemorragia pulmonar. (Mejía Salas & Mendoza Amatler, 2004)

El año 2015 para una entrevista realizada por Pagina Siete, se entrevistó tanto a pacientes como al Dr. Luis Fernando Sosa T. docente investigador del Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnostico e Investigación en Salud (SELADIS), donde se afirmó que solo en la ciudad de La Paz existen 600 casos confirmados de lupus que asistieron al Instituto SELADIS hasta el año 2015. Donde el 90% de los casos son mujeres. (Página Siete, 2015)

4. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de LES se basa en la detección de los signos clínicos y autoanticuerpos característicos. Los criterios de diagnóstico en actual vigencia del Colegio Americano de Reumatología (ACR, por sus siglas en inglés) del año 1997 y los criterios nuevos de las Clínicas Colaboradoras Internacionales de Lupus Sistémico (SLICC, por sus siglas en

inglés) del 2012 han influido para definir parámetros en los cuales se basa el diagnóstico de LES.

Cualquier paciente que presente 4 de los 11 criterios propuestos por la ACR, hace que sea probable que tenga LES, la especificidad y sensibilidad de la aplicación es estos criterios son del 95% y 75%, respectivamente. (Hannah Hahn, 2010). En muchos pacientes, los criterios se acumulan con el tiempo. Existen varias características clínicas en la enfermedad, como, por ejemplo, que los anticuerpos antinucleares (ANA) son positivos en el 98% de los pacientes durante el curso de la enfermedad, pruebas negativas repetitivas sugieren que el diagnóstico no es LES, a menos que otro autoanticuerpo esté presente. (Enriquez-Mejia, 2013)

4.1 Criterios de diagnóstico de LES según el Colegio Americano de Reumatología

El diagnóstico de LES se basa en 11 criterios, de los cuales se requiere que un paciente presente cuatro o más de estos criterios, ya sea de manera secuencial o simultáneamente, durante cualquier intervalo de la observación para poder identificar y confirmar la enfermedad. Estos criterios fueron observados en 1982 por el comité de criterios diagnósticos y terapéuticos del American Collage of Rheumatology (ACR) y fueron revisados y modificados en 1992. Las modificaciones se basaron en los “trastornos inmunológicos” de la enfermedad mediante los nuevos criterios clínicos que se observan en los pacientes lúpicos dejando atrás a técnicas antiguas como la determinación de las células LE.

Tabla N° 2 Criterios del ACR de 1982 revisados en 1997 para el diagnóstico de LES

CRITERIO	DEFINICION
1. Erupción malar	Eritema fijo, plano o elevado, sobre las eminencias malares, respetando los pliegues naso labiales
2. Erupción discoide	Zonas eritematosas elevadas con escamas queratóticas adherentes y taponamiento folicular. En las lesiones antiguas puede producirse cicatrización atrófica
3. Fotosensibilidad	Erupción cutánea desproporcionada tras exposición a la luz solar, por historia u observada por el médico
4. Úlceras orales	Úlceras orales o nasofaríngeas, normalmente indoloras, observadas por el médico
5. Artritis	Artritis no erosiva en dos o más articulaciones periféricas, con inflamación, derrame sinovial o dolor a la palpación
6. Serositis	a) Pleuritis: Claro antecedente de dolor pleurítico o frote, o signos de derrame pleural, o bien
	b) Pericarditis: comprobada por electrocardiograma o frote o signos de derrame pericárdico
7. Nefropatía	a) Proteinuria persistente mayor a 0,5g/día o mayor de 3+ sino se ha cuantificado.
	b) Cilindros celulares: pueden ser de eritrocitos, hemoglobina, granulares, tubulares o mixtos
8. Alteraciones Neurológicas	a) Convulsiones: en ausencia de tratamientos farmacológicos o alteraciones metabólicas conocidas; por ej. Uremia, cetoacidosis, o desequilibrio electrolítico, o bien
	b) Psicosis: en ausencia de tratamientos farmacológicos o alteraciones metabólicas conocidas; por ej. Uremia, cetoacidosis, o desequilibrio electrolítico.
9. Alteraciones hematológicas	a) Anemia hemolítica: con reticulocitosis
	b) Leucopenia: menos de 4.000/mm ³ en dos o en más ocasiones
	c) Linfopenia: menos de 1.500/mm ³ en dos o más ocasiones
	d) Trombocitopenia: menos de 100.000/mm ³ en ausencia de fármacos que produzcan esta alteración.
10. Alteraciones inmunológicas	a) Preparación de células LE-positivas (Este ítem fue eliminado de los criterios diagnósticos en la revisión realizada en 1992), o bien
	b) Anti-DNA: título anormal de anticuerpos contra DNA nativo, o bien
	c) Anti-Sm: Presencia de anticuerpos contra antígeno nuclear Sm.
	d) Hallazgo positivo de Anticuerpos antifosfolipídicos (AFL)(*)
11. Anticuerpos Antinucleares positivos	Un título anormal de ANA por inmunofluorescencia o análisis equivalente en cualquier momento y en ausencia de medicamentos relacionados con el síndrome de lupus de origen farmacológico.

Fuente: (Calvo Alen, 2012)

(*) Estos hallazgos se basan según:

1. Nivel sérico anormal de anticuerpos anticardiolipina IgG o IgM,
2. Resultado positivo para anticoagulante lúpico utilizando un método estándar como Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (aPTT) o la prueba de Veneno de Víbora de Russell Diluido (dVVRt)
3. Falso positivo en pruebas serológicas de sífilis (VDRL), que persiste por lo menos durante 6 meses y se confirma por pruebas de *Treponema pallidum* o prueba de absorción de anticuerpo treponémico fluorescente (FTA-Abs).

4.2 Criterios de las Clínicas Colaboradoras Internacionales de Lupus Sistémico (SLICC)

En el año 2012 el grupo SLICC revisó y validó los criterios diagnósticos del LES del ACR con el fin de mejorar la relevancia clínica, cumplir con los requisitos metodológicos rigurosos e incorporar nuevos conocimientos sobre la inmunología del LES.

Los nuevos criterios de clasificación SLICC (Sensibilidad: 94%; Especificidad: 92%) tuvieron un buen desempeño en un amplio conjunto de pacientes valorados por expertos. Según la regla SLICC para el diagnóstico de LES, el paciente debe presentar al menos 4 criterios, incluyendo tres criterios clínicos y un criterio inmunológico o el paciente debe presentar nefritis lúpica demostrada por biopsia con la presencia de anticuerpos antinucleares o anti-ADN nativo positivos. (Tabla N°3)

Los nuevos criterios clínicos revisados en varios aspectos importantes mejoran a los criterios de clasificación del ACR. El eritema malar y la fotosensibilidad no son dos elementos separados, debido a que son en gran medida de solapamiento. Uno de los criterios para el lupus cutáneo incluye al lupus cutáneo agudo y subagudo. Mientras que un criterio separado ahora incluye erupción discoide y los diferentes tipos de lupus cutáneo crónico no incluido en los actuales criterios de clasificación del ACR.

Tabla N° 3. Criterios SLICC del 2012 para el diagnóstico de LES

Criterios clínicos
1. Lupus cutáneo agudo: rash malar, lupus ampolloso, rash lúpico fotosensible (en ausencia de dermatomiositis) o necrosis toxica epidérmica variante de LES o lupus cutáneo subagudo.
2. Lupus cutáneo crónico: Lupus discoide clásico: localizado (por encima del cuello), Generalizado (por encima y debajo del cuello), lupus hipertrófico (verrugoso).
3. Úlceras orales o nasales: Oral: paladar, bucal, lengua Úlceras nasales En ausencia de otras causas, tales como vasculitis, enfermedad de Behcet, infección (herpes virus), enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reactiva y alimentos ácidos
4. Alopecia no cicatricial: Disminución difusa o fragilidad del cabello con pelos rotos visibles, en ausencia de otras causas tales como alopecia, fármacos, deficiencia de hierro y alopecia androgénica
5. Sinovitis con 2 o más articulaciones: Caracterizado por hinchazón o derrame O sensibilidad en 2 o más articulaciones y por lo menos 30 minutos de rigidez matutina
6. Serositis: Pleuresía (derrames pleurales) dolor pericárdico típico (dolor al recostarse que mejora al sentarse hacia adelante) durante más de 1 día. En ausencia de otras causas, como la infección, la uremia y la pericarditis de Dressler
7. Afección renal: Relación proteinuria/ creatinina que representa 500 mg de proteína / 24 horas o los glóbulos rojos
8. Alteraciones neurológicas: Convulsiones, psicosis, mononeuritis múltiple (en ausencia de otras causas conocidas como vasculitis primaria), mielitis, neuropatía periférica o craneal (ausencia de otras causas conocidas como vasculitis primaria, infección y diabetes mellitus), estado de confusión agudo en ausencia de otras causas, incluyendo tóxicas / metabólicas, uremia, fármacos)
9. Anemia hemolítica
10. Leucopenia (<4000 / mm³) O Linfopenia (<1000 / mm³) Leucopenia al menos una vez: En ausencia de otras causas conocidas como síndrome de Felty, fármacos e hipertensión portal. Linfopenia al menos una vez: en ausencia de otras causas conocidas como cortico esteroides, fármacos e infección
11. Trombocitopenia (< 100.000/mm³): Al menos una vez en ausencia de otras causas conocidas como fármacos, hipertensión portal y púrpura trombocitopénica trombótica.

Fuente: (Calvo Alen, 2012)

Tabla N°3. Criterios SLICC del 2012 para el diagnóstico de LES (Continuación)

Criterios inmunológicos
1. ANA positivo: en valores por encima del nivel de referencia del laboratorio.
2. Anti-ADN positivo: por encima del rango de referencia del laboratorio (o 2 veces el rango de referencia si se prueba por ELISA)
3. Anti Sm positivo
4. Anticuerpos Antifosfolípidos: Prueba positiva para el anticoagulante lúpico Resultado de prueba falso positivo para reacina plasmática rápida Nivel de anticuerpos anticardiolipina de titulación media o alta (IgA, IgG o IgM) Resultado positivo de la prueba para la anti-2-glicoproteína I (IgA, IgG o IgM)
5. Complemento bajo: C3, C4, CH50 o CH100 bajos
6. Coombs directo positivo en ausencia de anemia hemolítica

Fuente: (Calvo Alen, 2012)

5. AUTOANTICUERPOS EN LES

Los autoanticuerpos son inmunoglobulinas que reaccionan contra una gran variedad de componentes propios. La presencia de autoanticuerpos es una de las señas de identidad del LES. A lo largo de los años se han descrito hasta 180 especificidades diferentes, probablemente la cifra más alta dentro de las enfermedades autoinmunes, aunque solo algunas son comunes. Los autoanticuerpos más importantes se dirigen frente a antígenos nucleares. La mayoría de pacientes presenta ANA en algún momento de la evolución. Su ausencia en pacientes que son diagnosticados de LES (lupus seronegativo) es muy infrecuente (Aringer, Dörner, Leuchten, & Johnson, 2016)

La tabla N°4 muestra los principales autoanticuerpos que se determinan con un paciente con LES

Tabla N° 4. Autoanticuerpos en el criterio y diagnóstico del LES

Autoanticuerpos	Sensibilidad en el LES	Especificidad en el LES	Otras enfermedades
ANA (HEp-2, IFI)	98	No	Muchas
Anti-dsADN	50	Si (95%)	-
Anti-histona	50	No	LIF, SSc, Artritis juvenil
Anti-C1q	30	No	Vasculitis por IC
Anti-Sm	10	Si (99%)	-
Anti-Ro60	40	No	Sjögren, LE cutáneo
Anti-La/SSB	20	No	Sjögren,
Anti-U1 RNP	20	No	EMTC
Factores Reumatoides	20	No	AR, Sjögren
Anti-cardiolipina G	20	No	SAP primario
Anti-cardiolipina M	10	No	SAP primario
Anticoagulante lúpico	10	No	SAP primario

Fuente: (Aringer, Dorner, Leuchten, & Johnson, 2016)

IFI: Inmunofluorescencia indirecta. LIF: Lupus inducido por fármacos. SSc: Esclerosis sistémica. EMTC: Enfermedad mixta de tejido conectivo. AR: Artritis reumatoide. SAP: Síndrome antifosfolípido.

En muestras de pacientes con LES extraídas años antes del inicio de síntomas se detecta la presencia de autoanticuerpos, lo que demuestra que su síntesis comienza mucho antes de la aparición de la clínica o del diagnóstico de la enfermedad. Se ha visto cierta “jerarquía temporal”, con aparición primero de ANA, anticuerpos anti-Ro, anti-La y anti fosfolípidos, en ocasiones años antes de los síntomas. Posteriormente aparecen los anti-Sm y los anti-RNP, a veces unos meses antes del diagnóstico o coincidiendo con el inicio de los síntomas. Los anti-dsADN aparecen en un punto intermedio entre ambos grupos. (Wallace & Hannahs Hahn, 2012). Poco antes del diagnóstico se produce una acumulación progresiva de nuevas especificidades de autoanticuerpos. Con estos resultados, se ha propuesto la existencia de una fase inicial de autoinmunidad sin síntomas, pero con resultados de laboratorio positivos, y otra posterior o de autoinmunidad patogénica, caracterizada por la presencia de anticuerpos patogénicos y síntomas clínicos, que conducen al diagnóstico. No se conoce el riesgo de transición de una fase a otra,

es decir, la probabilidad de que una persona con resultados analíticos positivos desarrolle la enfermedad. (Arbuckle, y otros, 2003)

a. Anticuerpos antinucleares

Los anticuerpos antinucleares (ANA) se dirigen contra componentes nucleares. El término puede ser inexacto, ya que con las técnicas utilizadas en su determinación se detectan también anticuerpos contra otros componentes celulares (cubierta nuclear, membrana celular, aparato mitótico e incluso citoplasma) (Agmon-Levin, y otros, 2014)

Un test de ANA positivo no tiene un valor absoluto, sino que debe ser correlacionado con los datos clínicos y otros laboratorios. Cada laboratorio establece sus rangos de referencia. Puede haber ANA positivo en individuos sanos, más frecuentemente al incrementarse la edad. En personas mayores de 65 años se detecta ANA en el 10-35% de los casos (Wallace & Hannahs Hahn, 2012). Cuanto mayor es el título mayor es la probabilidad de que exista una enfermedad autoinmune. El punto de corte para definir un título significativo suele situarse en 1/80, con una sensibilidad del 98.1%. Un título de 1/160 posee una sensibilidad de 95.4%. Los ANA se detectan también en otras enfermedades de origen autoinmune, como la esclerodermia, polimiositis, dermatomiositis, artritis reumatoide (AR), síndrome de Sjögren, enfermedad mixta del tejido conectivo, tiroiditis autoinmune, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, etc. (Egner, 2000)

b. Anticuerpos anti-ADN

La existencia de anticuerpos anti-ADN fue demostrada por primera vez en los años 30 en pacientes con infecciones bacterianas. En 1957 se describieron en pacientes con LES. Los anti-ADN pueden dirigirse contra ADN monocatenario (anti-ssADN), bicatenario (anti-dsADN), o sus formas estructurales ADN-A, ADN-B, ADN-Z, complejos ADN-RNA, etc. En el LES se producen de forma espontánea anticuerpos frente a dsADN helicoidal B (ADN-B), que inicialmente es no inmunogénico (Rekvig, 2015). En una proporción importante de pacientes se encuentran tanto anti-ssADN como anti-dsADN. Los anti-dsADN son los más importantes por su especificidad y su posible papel patogénico. Se piensa que los anti-dsADN forman complejos con fragmentos de nucleosomas, que se

originan en procesos de eliminación celular. (Cozzani, Drosera, Gasparini, & Parodi, 2014)

Los anti-ADN son claves en el diagnóstico y el seguimiento del LES. Están presentes en el 70% (60-83%) de pacientes. Su especificidad alcanza el 95%-97%. Si un test de ANA es negativo, no se suele indicar la realización de un examen de anti-ADN, excepto si la sospecha clínica es elevada (Aringer M., Dörner, Leuchten, & Johnson, 2016). Los anti-dsADN poseen una especial utilidad para la confirmación del diagnóstico en pacientes con presentaciones que sugieren una probabilidad pretest razonable. Existe un subgrupo de pacientes con LES con niveles altos de anti-dsADN, pero sin actividad clínica significativa, es decir, serológicamente activos, pero clínicamente quiescentes. (Wallace & Hannahs Hahn, 2012).

La positividad para anti-ADN es un criterio de clasificación en varios sistemas (ACR, SLICC). Sin embargo, no son moléculas homogéneas, ya que su origen y estructura pueden ser variados. Se detectan diversos isotipos (IgG, IgM, IgA) y diferentes grados de afinidad. El isotipo IgG y los anticuerpos de alta afinidad son los más específicos en el LES, además de su posible relevancia patogénica, mientras que los IgM y de baja afinidad poseen una importancia menor. Pueden ser negativos al comienzo de la enfermedad, tras el tratamiento o durante las remisiones. Su elevación puede asociarse a fases de la actividad y al empeoramiento de manifestaciones como nefritis lúpica. (Egner, 2000) (Wallace & Hannahs Hahn, 2012).

c. Anticuerpos anti-histona y anti Nucleosoma

Los anticuerpos anti-histona IgG o IgM se encuentra en el 50-80% de los pacientes con LES. Se identifican anticuerpos contra histonas totales o contra algún subtipo (H1, H2a, H3, H4). En algún estudio los títulos se relacionan con la actividad de la enfermedad. Sin embargo, no son específicos de LES. SE encuentran también en el 96-100% de pacientes con LES inducidos por fármacos (Egner, 2000).

Los anticuerpos anti-nucleosoma, se dirigen contra los nucleosomas, estructuras formadas por pares de histonas y ADN. Estos anticuerpos reaccionan exclusivamente

contra nucleosomas y no contra histonas individuales o contra ADN nativo. Los nucleosomas actúan como un autoantígeno esencial en la patogenia del LES. Aunque no se utilizan de forma generalizada, los anticuerpos anti-nucleosoma se encuentran entre los marcadores más sensibles del LES, sobre todo en pacientes anti-dsADN negativo (Cozzani, Drosera, Gasparini, & Parodi, 2014). Se correlacionan con la nefritis y con la probabilidad de brotes, aunque no de forma tan estrecha como el anti-dsADN. Su detección está presente también en otras enfermedades de origen autoinmune como esclerosis sistémica, EMTC y síndrome de Sjögren. (Lloyd, Doaty, & Hahn, 2016).

d. Anticuerpos anti-Ro/ssA y anti-La/ssB

Los anticuerpos anti-Ro/ssA y anti-La/ssB se dirigen contra las proteínas Ro y La asociadas a ARN. El antígeno Ro/ssA es una ribonucleoproteína (RNP) que contiene ácidos nucleicos pequeños ricos en uridina, con varios subtipos, las más importantes son Ro52 y Ro60. El antígeno La/ssB es una fosfoproteína que fija ciertos ARN pequeños, incluyendo ARN celular 5S, ARN transfer, ARN 7S. Es vehiculizado entre el núcleo y el citoplasma (Cozzani, Drosera, Gasparini, & Parodi, 2014).

Ambos anticuerpos se encuentran sobre todo en el LES y en el síndrome de Sjögren. En el LES se encuentran anticuerpos anti-Ro en un 25-60% y anti-La en el 10-20%. En el síndrome de Sjögren la frecuencia es más elevada. No son específicos de LES, pero pueden ser útiles cuando los anti-dsADN son negativos, los IgG anti-Ro60 son más relevantes y predominantes en el LES. Los anti-Ro se relacionan con el lupus cutáneo subagudo, fotosensibilidad, neumonitis, trombocitopenia, enfermedad renal, vasculitis (Egner, 2000) (Lloyd, Doaty, & Hahn, 2016).

e. Anticuerpos anti-Smith (anti-Sm) y anti-RNP

Los anticuerpos anti-Sm reaccionan frente a proteínas Sm que forman complejos ARN nucleares ricos en uridina a nivel del citoplasma. Son altamente específicos, prácticamente patognomónicos, del LES. Su presencia es casi diagnóstica y han sido incluidos como criterio de clasificación en el conjunto de SLICC. Sin embargo, su sensibilidad es baja, ya que aparecen en el 30-40% de pacientes de raza negra y en el 5-20% de pacientes de raza caucásica (Lloyd, Doaty, & Hahn, 2016). Se mantienen durante

la evolución de la enfermedad, incluso durante las remisiones. El título no se correlaciona con el grado de actividad. Se asocia a mayor riesgo de mortalidad, serositis, nefritis, lupus neuropsiquiátrico, fibrosis pulmonar, leucopenia, artritis, rash malar, vasculitis, neuropatía periférica e hipertensión pulmonar. Se han detectado también en lupus asociado a infección por parvovirus y en la infección por VIH y virus de Epstein Barr. (Ippolito, y otros, 2011).

Los anti-Sm suelen asociarse a la positividad de anticuerpos frente a ribonucleoproteínas (anti-RNP), los cuales son menos frecuentes y su especificidad es moderada. Se dirigen contra pequeñas partículas de ribonucleoproteínas nucleares (U1- A, U1-C, U1 70K) presentes en el complejo U1 RNP. Se detectan en el 25% de los pacientes con LES (Ortega H & Shoenfeld, 2012). Se asocian a la nefritis y a la enfermedad del sistema nervioso central (SNC), así como a una edad de inicio más avanzada. No parecen tener una clara relación con el grado de actividad (Egner, 2000).

f. Sistema del complemento

Un hallazgo característico del LES es el descenso de los niveles de los componentes del complemento, incluido como criterio de clasificación y como índice de actividad. Los hallazgos más frecuentes y reproducibles son la disminución de C3 y C4. Puede haber niveles bajos de C4 de forma permanente, pero también fases activas sin cambios en los niveles de C3 y C4. Sin embargo, existe tendencia a que los niveles más bajos se asocien a los brotes. También se detecta disminución de la actividad hemolítica de la vía clásica (CH100/CH50). En la enfermedad renal crónica puede haber niveles persistentes bajos de C3. También se detecta elevación de productos de la activación del sistema (C2a, C3a, C5a) en periodos de agravamiento, pero su uso no es habitual (Sturfelt & Truedsson, 2005).

Se producen descensos de C3 y C4 en la nefritis activa o en pacientes con manifestaciones hematológicas, debido al incremento del catabolismo. También desciende en infecciones. El descenso del complemento como criterio de clasificación muestra una sensibilidad y especificidad del 64 y 91% para C3, y del 64 y 65% para C4, respectivamente. Los niveles

bajos de C1q se asocian a glomerulonefritis proliferativa y desciende antes de los brotes. En una proporción de casos con C1q bajo se detectan anticuerpos anti-C1q que se considera que su desaparición es un factor pronóstico favorable (Sturfelt & Truedsson, 2005) (Biesen, Rose, Hoyer, Alexander, & Hiepe, 2016).

6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La presentación inicial del LES es impredecible, con sintomatología inespecífica, la presentación puede incluir cualquier órgano o sistema, los más frecuentes son la piel y el sistema articular y las mucosas. El malestar general, el dolor y la fatiga son habituales.

a. Manifestaciones mococutáneas

La afección cutánea en el LES es prácticamente universal, denominándose “lupus eritematoso cutáneo”, las lesiones se encuentran en un 72-85%. Las lesiones pueden clasificarse en específicas y no específicas.

Las lesiones específicas se dividen en cuatro sub tipos: Lupus eritematoso cutáneo agudo, subagudo, crónico que incluye las variantes discoide y profundo e intermitente. Además, existen otros subtipos que no encajan en las categorías anteriores.

b. Manifestaciones renales

La afectación renal es una de las formas de daño visceral más frecuentes e importantes. Se detecta afectación renal en el 30-70% de pacientes. Constituye una causa mayor de morbilidad y de ingreso hospitalario (Egner, 2000).

La nefritis lúpica es el prototipo de enfermedad por complejos inmunes. Células B autoreactivas producen IgG anti-ADN que muestra reactividad cruzada frente a componentes de la membrana basal glomerular o de la matriz mesangial. Los inmunocomplejos producen activación del complemento, infiltración por linfocitos, reclutamiento de células del sistema del inmunológico, producción de citoquinas e inflamación tisular destructiva. Los nucleosomas son probablemente los autoantígenos que inician el proceso. La exposición de antígenos posiblemente se relaciona con defectos

en la apoptosis y el aclaramiento de restos celulares. Además, es posible que las propias células renales expresen antígenos y secreten citosinas inflamatorias (Tsokos G. 2011).

c. Manifestaciones musculo esqueléticas

Las manifestaciones musculo esqueléticas se encuentran entre las más frecuentes. Aparecen en el 53-95% de los pacientes, tanto al inicio como durante a evolución. El dolor articular y la rigidez matutina son síntomas iniciales en la mitad de los pacientes. Puede haber signos inflamatorios y artritis franca en el 76%. Suele ser no erosiva y no deformante, afectando a pequeñas articulaciones de manos y muñecas, como la AR. También se afectan codos y rodillas. En el 10% hay nódulos subcutáneos en pequeñas articulaciones y cara extensora de las manos, la tendinitis es frecuente. Un subgrupo de pacientes puede presentar un cuadro de sinovitis grave, denominado rupus o *rhupus* los cuales son rasgos muy parecidos a la AR. (Boumpas, y otros, 1995)

d. Manifestaciones hematológicas

En un 75% de los pacientes, suele presentarse anemia, particularmente en su forma crónica. En ocasiones (5% de los casos), anemia es de tipo hemolítica autoinmune. También puede presentarse trombocitopenia en alrededor de un 15 a 25% de los casos. Con cierta frecuencia puede observarse granulocitopenia, linfopenia o ambas. Se han postulado algunas hipótesis relativas a la granulocitopenia, como mayor destrucción periférica de granulocitos, autoanticuerpos dirigidos contra los mismos y supresión en la médula ósea. (Kölliker Frers, 2016).

e. Manifestaciones vasculares

La vasculitis puede ser una de las características en la fase activa del LES y presentan su correlación clínica en diferentes sistemas: hemorragias, pancreatitis y colecistitis en las manifestaciones gastrointestinales. La inflamación de las arterias puede ocasionar accidentes cerebrovasculares. Las vasculitis necrotizantes pueden desencadenarse en cualquier tejido, pero se observa más frecuentemente en piel y músculo. La lesión de los vasos se produce sobre todo por un mecanismo de hipersensibilidad tipo III y conduce a una importante fibrosis perivascular. (Kölliker Frers, 2016).

7. FISIOPATOLOGÍA

Uno de los aspectos que contribuyen a la fisiopatología del lupus es la acumulación de cantidades anormalmente elevadas de células apoptóticas en los tejidos, lo cual indicaría una alteración a nivel de los fagocitos para eliminar los cuerpos apoptóticos. Se ha observado, además, que los cuerpos apoptóticos que no son fagocitados en los tiempos oportunos pueden entrar en un estado de necrosis secundaria, desintegrándose y liberando su contenido citoplasmático que se caracteriza por portar sustancias altamente inflamatorias. (Enriquez-Mejia, 2013)

En condiciones normales los cuerpos apoptóticos son captados y procesados por las células presentadoras de antígeno (CPA). Éstas son, entre otras, células dendríticas (DC), macrófagos y linfocitos B, cuya función es presentar los antígenos a los linfocitos T. Es probable que en el LES exista también una activación aberrante de monocitos y neutrófilos, incluyendo la función de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) que contienen proteínas derivadas de ADN y neutrófilos, ya que son capaces de desencadenar la liberación de IFN- α y daño tisular. (Costa-Reis & Sullivan, 2013) En el LES, las DCs presentan estos autoantígenos (cuerpos apoptóticos no depurados) a linfocitos T inmaduros, promoviendo los estímulos necesarios para favorecer su activación. Las células B presentan autoantígenos a linfocitos T colaboradores (Th), en los que inducen la producción de citocinas, las cuales a su vez, estimulan la proliferación exagerada de las células B activadas que dan lugar a la producción de un gran espectro de autoanticuerpos frente a los autoantígenos nucleares, citoplasmáticos y de superficie celular provenientes de los cuerpos apoptóticos, favoreciendo de esta manera la producción de autoanticuerpos característicos del LES, como ser anticuerpos anti-ADN de doble hebra (dsADN) y contra otros antígenos nucleares (anticuerpos anti-nucleares). Las células T y B activadas se infiltrarían en los tejidos y junto con los autoanticuerpos y depósitos de complejos inmunes, serían las responsables de desencadenar procesos inflamatorios provocando daño tisular. (Carmen Luz Navarrete S, 2008)

La respuesta de los linfocitos T al antígeno es desencadenada cuando el receptor de la célula T (TCR) reconoce el complejo formado por el péptido antigénico y el isotipo de la molécula HLA en la superficie de la CPA. El genotipo del HLA determina cuáles moléculas peptídicas estarán disponibles para el reconocimiento antigénico vía TCR, estos péptidos antigénicos en algunos casos podrían corresponder a autoantígenos. Por tal motivo, determinados alelos HLA se asocian con un mayor riesgo de desencadenar la respuesta inmune contra antígenos propios y padecer enfermedades como lupus. (Enriquez-Mejia, 2013)

Como se observa en la Figura 1 la fisiopatología del LES está dada de la siguiente manera

- a.** Aunque las células T normales expuestas a autoantígenos en la periferia se convierten en tolerantes, las células T susceptibles en lupus son sensibles a umbrales más bajo de activación por agonistas o péptidos agonistas débiles.
- b.** Una vez activadas, las células T pueden promover una estimulación de las células B genéticamente más respondedoras.
- c.** Estas células B estimuladas por autoantígenos sufren una hipermutación somática y maduración de la afinidad.
- d.** Durante la síntesis de autoanticuerpos patogénicos, el daño tisular genera mayor liberación de autoantígenos,
- ef.** que también son reconocidos y presentados por células B presentadoras de antígenos específicas, en una segunda fase de activación de las células T,
- g.** llevando así a un ciclo de retroalimentación positiva.
- h.** Las respuestas autoinmunes B y T son diversificadas resultando en una propagación del antígeno. Esta interacción entre células B y T conducen al proceso autoinmune.
- i.** Las células T activadas de manera indirecta también pueden causar daño debido a la migración al órgano blanco, a la liberación de citoquinas y por citotoxicidad directa.

(Anaya, Tobón, Pineda-Tamayo, Fond, & Cervera, 2005)

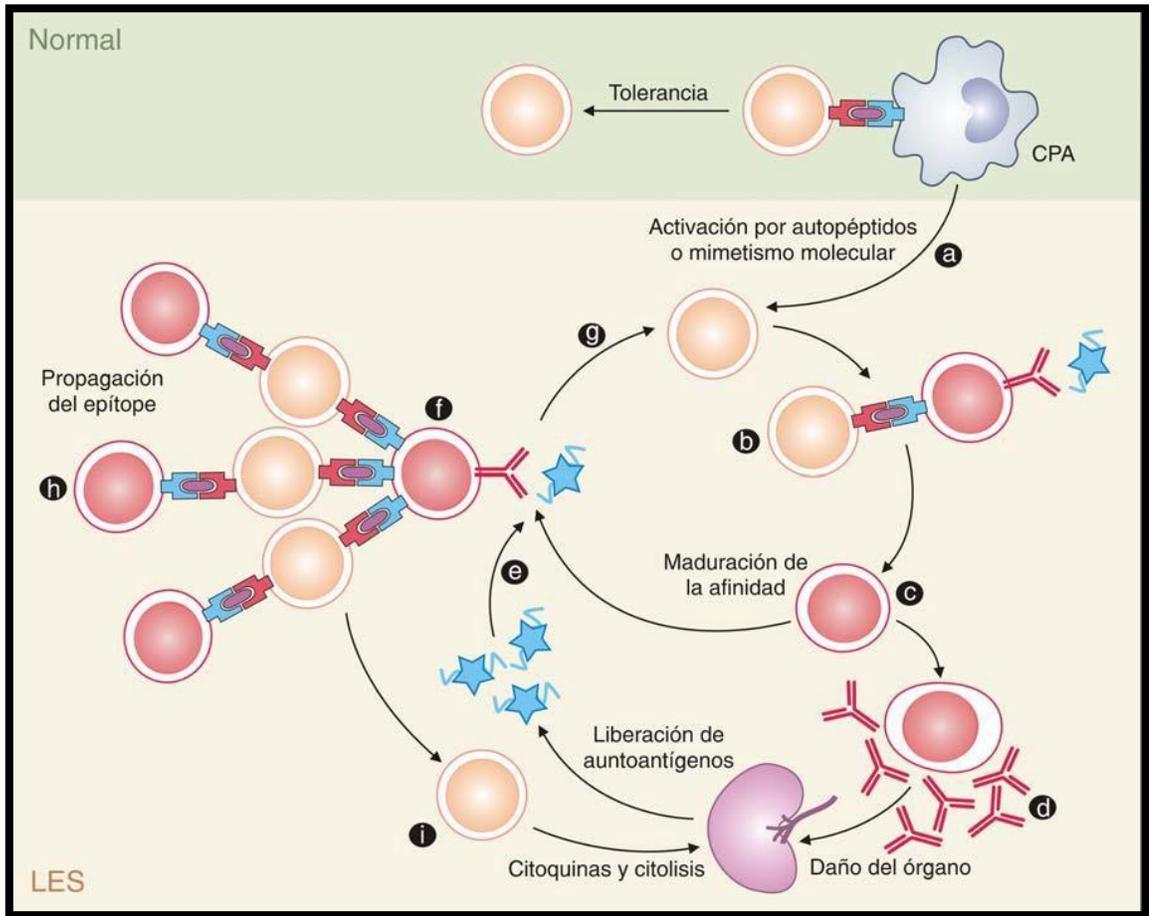


Figura N° 1. Mecanismos para la inducción y amplificación de la autoinmunidad en LES Fuente: (Anaya, JM y Col., 2008)

7.1 Factores desencadenantes

La fisiopatología del LES se inicia con las interacciones entre los genes de susceptibilidad y factores medioambientales, lo cual resultan en una respuesta inmune anormal.

7.1.1 Factores genéticos: Los casos de lupus se agrupan dentro de las familias de tal manera que un pariente de primer grado de una mujer con lupus puede llevar un riesgo aumentado hasta 6 veces de desarrollar la enfermedad por sí misma. Las encuestas entre gemelos han demostrado una alta concordancia para el diagnóstico de lupus entre gemelos monozigóticos (24 al 69%) en comparación con el 10% de concordancia entre gemelos dicigóticos. Además, un estudio mostro una concordancia sorprendente para las manifestaciones clínicas e inmunológicas del lupus entre gemelos monozigóticos en comparación con los pares de hermanos no gemelos. Los autores, sin embargo, reflejaron que “el comportamiento tanto como la biología” podían explicar el corto intervalo en el diagnóstico entre pares de gemelos, el 50% de los pares concordantes habían visto importancia o cuidado debido al reciente diagnóstico en su gemelo.

Se ha demostrado asociación de lupus con antígenos HLA clase II (HLA-DR2 y DR3) tanto en raza blanca como negra; así como con enfermedades hereditarias por deficiencia de componentes del sistema del complemento: C1r, C1s, C1, C4, C5 principalmente con deficiencia de C2. La deficiencia parcial de C2 en heterocigotos es también más frecuente, del 6% en lupus vs 1% en personas sanas. Esta anomalía congénita se asocia con la presencia de los antígenos HLA- A10 y HLA-B18. (LUPUS UK, s.f.)

Genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) particularmente HLA- A1, B8 y DR3 se han ligado a lupus. Se sabe que alelos sin aparente rol de actividad pueden causar deficiencias de uno de los componentes iniciales del sistema del complemento C1q, C2 o C4 y son un importante factor de riesgo para lupus. Estudios familiares han identificado genes fuertemente ligados a la presencia de lupus, muchos de estos genes contribuyen también a deficiencias del sistema inmune, como por ejemplo la identificación de la relación entre lupus y polimorfismos de nucleótidos individuales en 2 genes relacionados al interferón (factor 5 regulado de interferón y tirocin cinasa 2). (Enriquez-Mejia, 2013)

7.1.2 Factores hormonales: Existe una evidente interrelación entre el sistema

endocrino y el sistema inmunológico. Un ejemplo de esto es el efecto que las hormonas sexuales ejercen sobre las distintas poblaciones de leucocitos (Linfocitos T y B, células NK, granulocitos y macrófagos), así como sobre la producción y liberación de citoquinas y proteínas inmunoregulatoras. (Figura N° 2) (Barañaño, 2009)

En las mujeres los estrógenos y la progesterona harían que primase una respuesta inmune humoral, lo cual resultaría beneficioso para la gestación, pero al mismo tiempo favorecería la aparición de ciertas enfermedades autoinmunes. Contrariamente, la testosterona haría que en los hombres predominase la respuesta inmune celular.

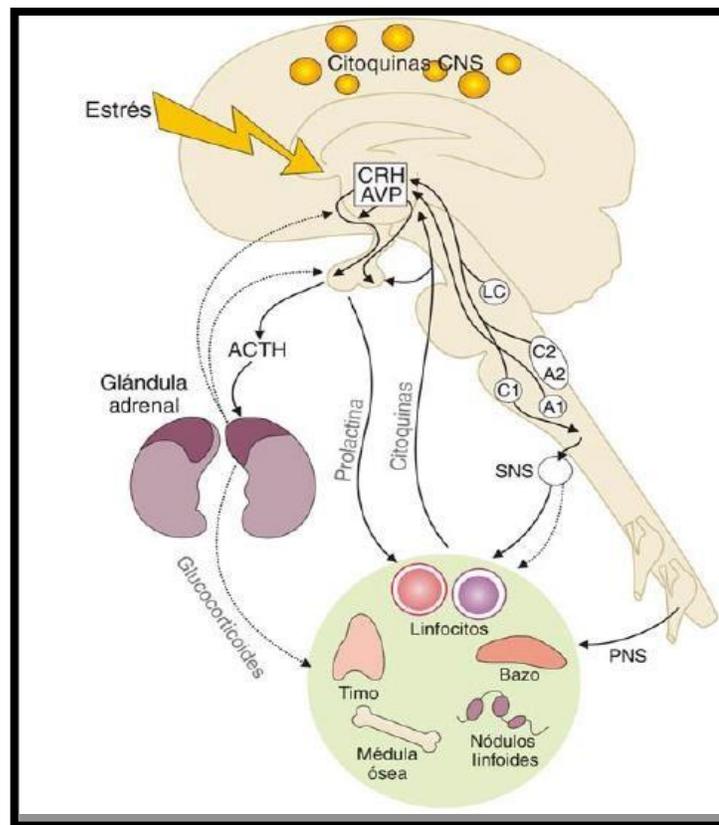


Figura N° 2. Comunicación bidireccional entre el sistema neuroendocrino y el sistema inmune Fuente: (Anaya, JM y Col., 2008)

Los investigadores han explorado el papel de los factores hormonales endógenos y exógenos. La menarca puede ser un factor de exposición a los estrógenos y ha sido examinado como un factor de riesgo en varios estudios. Aunque los resultados son en algunos casos contradictorios, estos estudios proporcionan alguna evidencia de un mayor riesgo de lupus, de tal manera que las mujeres con una menarquia a los 10 años tienen aproximadamente el doble de riesgo de padecer lupus. La irregularidad menstrual (ciclos largos o cortos) se asoció con el lupus en dos estudios, pero esta asociación no se tomó en cuenta para su etiología, al igual que la edad en la primera relación sexual no se encuentra asociada. La historia de aborto espontáneo se asoció con lupus, pero esto puede reflejar el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos. (LUPUS UK, s.f.)

a. Efectos de las hormonas sexuales sobre los Linfocitos T:

En cuanto a las hormonas femeninas, Stimson ha postulado que los linfocitos T reguladores (LTreg) y citotóxicos (LTc) activados expresarían receptores para progesterona (P). Más recientemente, Prieto y Rosenstein han observado que el Estradiol (E) potencia la función supresora de los LTreg (CD4+, CD25+) aumentando su proliferación. (Baraño, 2009)

Las alteraciones hormonales a corto plazo, como las que se producen durante el embarazo, no provocan cambios en la población total de LT ni en las distintas subpoblaciones. Sin embargo, la marcada disminución de progesterona y estradiol por tiempos prolongados, como ocurre en la menopausia, afecta la población linfocitaria ya que en la post menopausia se observa una disminución de los linfocitos totales debida fundamentalmente a la disminución de LTh y de linfocitos B. (Baraño, 2009)

b. Efectos de las hormonas sexuales sobre los Linfocitos B

Los linfocitos B (LB) en hombres y mujeres expresan receptores para estrógenos, los que “*in vitro*” inducen su activación. Además, poseen receptores intracelulares para linfocitos T, pero no hay evidencia de receptores para progesterona.

Algunos investigadores como Kamada y col, han observado que después de la

menopausia el número de LB1 permanece invariable, sin embargo, los LB2 disminuyen.

Además, estos autores postulan que la terapia de reemplazo hormonal restablece la cantidad normal de LB periféricos. Asimismo, se ha comprobado que los estrógenos aumentan el número de progenitores de LB en la medula ósea y en ratones protegen a estos progenitores de la apoptosis, aumentando también la supervivencia de células B esplénicas. (Barañao, 2009)

c. Efectos de las hormonas sexuales sobre la producción de citoquinas:

Girón Gonzales y col han observado que entre hombres y mujeres no existen diferencias entre los niveles de citoquinas de tipo Th1, ni citoquinas de tipo Th2, ni tampoco en las distintas fases del ciclo menstrual. No obstante, la relación entre las citoquinas INF γ /IL-4 es significativamente mayor en los hombres, duplicando los valores hallados en mujeres tanto en la fase folicular como en la fase lútea. (Barañao, 2009). Estos autores concluyen que las mujeres presentan un perfil de citoquinas Th2, lo que implica una mayor respuesta de LB y la consiguiente producción de anticuerpos. (Barañao, 2009)

7.1.3 Factores ambientales: La radiación solar es la principal fuente de radiación ultravioleta, las radiaciones solares tipo UVB y UVA son las que dañan el ADN celular, es el factor ambiental que desencadena manifestaciones cutáneas, provocando lesiones y quemaduras de piel asociándose de esta forma al lupus, provoca el 70% de las recaídas de los pacientes al incrementar la apoptosis de los queratinocitos y otras células, o al alterar el ADN y las proteínas intracelulares de manera que se tornen antigénicas. La fotosensibilidad es un criterio del Colegio Americano de Reumatología para la clasificación de la enfermedad, demostrando con esto la importancia de este factor ambiental. (Enriquez-Mejia, 2013)

7.1.4 Infecciones virales: A pesar de varias investigaciones realizadas durante varias décadas, no se ha visto relación consistente entre cualquier virus o grupo de virus y la aparición de lupus. Algunas investigaciones sobre el Virus Epstein Barr (EBV) demostraron una relación estructural inmunológica entre Epstein-Barr antígeno nuclear y el antígeno Ro, lo que sugiere que la infección por VEB puede ser necesaria antes de que

algunos pacientes puedan desarrollar lupus. Aunque consistente con una asociación, estos estudios no implican específicamente EBV en la etiología o el desarrollo de lupus. Otros estudios han explorado el papel de citomegalovirus (CMV), Herpes Zoster y Retrovirus Humano (VIH y HTLV-1) y han demostrado algunos resultados para implicar a estos agentes virales en la etiología, pero los resultados son actualmente inconcluyentes. Puede ser que la infección con uno o más agentes virales sea necesaria, pero tal vez no suficiente para causar lupus y que es la respuesta del huésped o la variación de cepas virales contribuyan al riesgo de la enfermedad. (LUPUS UK, s.f.)

La evidencia más directa de que los agentes infecciosos pueden inducir la enfermedad autoinmune es el desarrollo de la enfermedad en animales de experimentación después de la inoculación con antígenos propios en combinación con adyuvante que contiene antígenos microbianos no infecciosos. El hecho de que diversos tipos de microorganismos, se asocian con una sola enfermedad autoinmune sugiere que los agentes infecciosos inducen enfermedad autoinmune a través de mecanismos comunes.

7.1.5 Drogas: El fenómeno de lupus inducido por fármacos ha sido reconocido como una enfermedad similar al lupus inducido por las condiciones ambientales. Se ha reconocido en asociación con más de 80 fármacos (por ejemplo, minociclina, hidralazina, procainamida, isoniazida, quinidina, clorpromazina, metildopa, etc.). Suele presentarse en personas mayores, tanto en el sexo masculino como en el femenino, y la raza blanca es la más afectada a comparación de otras etnias. Los factores de riesgo han sido identificados para el desarrollo de lupus inducido por fármacos: el estado de acetilación lenta, en el cual el individuo posee una mutación en el gen que codifica para la enzima N-acetiltransferasa (NAT), que juega un papel fundamental en el metabolismo de las aminas aromáticas, que al no ser metabolizadas suelen desarrollar ANA en un periodo de tiempo más breve, con el riesgo de padecer LES, este proceso ocurre más frecuentemente en el sexo femenino. (Pretel, Marquez, & España, 2012)

7.1.6 Factores socioeconómicos: El problema socioeconómico en diferentes partes del mundo podría llegar a tener un impacto importante en las manifestaciones del LES y su

mortalidad ya que esta es una enfermedad de propagación rápida, independiente de su origen étnico. El acceso a la salud, la calidad de la atención y el cumplimiento de la atención se ven afectados por estos factores. Pocos estudios han examinado el estado socioeconómico con el suficiente detalle para comprender verdaderamente su papel en el desarrollo de la enfermedad o de la causalidad y esta es un área que requiere más investigación. (LUPUS UK, s.f.)

La mortalidad asociada por el padecimiento de LES es un problema de importancia menguante. Las tendencias en la mortalidad vienen siendo más y más favorables, y se ha pasado de una supervivencia a los 5 años del 50-77% en la década de los sesenta al 64-87% a 10 años en los ochenta y hasta el 68-78% a los 20 años en la última década del pasado siglo. Es posible que esto no sea cierto en países menos desarrollados, como sugiere un estudio de tendencias realizado en la India, y que tampoco lo sea en determinadas minorías étnicas, como demuestra el estudio de Walsh, basado en datos del National Center for Health Statistics estadounidense, en el que se constató que la mortalidad directamente atribuible al LES había aumentado un 30% en mujeres afroamericanas en los últimos años. (Rúa-Figueroa & Erausquin, 2010)

7.1.7 Factores dietéticos: En cuanto a los factores nutricionales no se tienen muchos estudios, sin embargo, la dieta de los pacientes es estrictamente controlada a la hora del control de la enfermedad. Se cree que los ácidos grasos omega-3 proporcionan un efecto beneficioso con algunos antiinflamatorios. Anti-oxidantes (vitaminas A, C, E y beta-caroteno) también puede tener un efecto positivo sobre la actividad de la enfermedad. (LUPUS UK, s.f.)

El déficit de vitamina D es un riesgo potencial en pacientes con LES. La vitamina D participa en funciones de modulación inmunológica. Existe relación entre el déficit de vitamina D y una mayor actividad de LES. La valoración de la relación con la ingesta es difícil, ya que el aporte dietético de la vitamina supone solo una proporción de la vitamina circulante. (Kamen, 2015)

Dentro de los alimentos no recomendados para los pacientes lúpicos están las **grasas trans**: las cuales pueden aumentar el riesgo de enfermedades cardiovasculares, lo cual hace que el lupus sea aún más peligroso; la **alfalfa**: la cual contiene un aminoácido llamado L-canavanina que estimula el sistema inmune, lo cual puede ocasionar más ataques; **Sal**: disminuir el consumo de sal puede ayudar a reducir la presión sanguínea alta y proteger los riñones de un posible mayor daño; **Alcohol**: beber alcohol mientras se toma medicamentos podría ser dañino para los pacientes.

Los AINEs en conjunto con el alcohol pueden causar úlceras estomacales; **Café**: beber café (y otras bebidas con cafeína) puede empeorar los síntomas en el estómago, especialmente si el lupus afecta esa área. (Mercola: Tome control de su salud, s.f.)

7.1.8 Factores químicos (cigarrillo): El hábito de fumar ha establecido una relación causal con el desarrollo de varias enfermedades autoinmunes, como el lupus. Ha habido una serie de estudios heterogéneos que han buscado establecer asociaciones entre el hábito de fumar y el riesgo a lupus que sugieren que el riesgo se incrementa notablemente entre los fumadores actuales de cigarrillos, en comparación con los pacientes que nunca han fumado. En un estudio, el tabaquismo se asoció con un riesgo mayor de cuatro veces de anticuerpos dsADN positivos en los pacientes con lupus. El fumar puede causar daños en el ADN, la formación de anticuerpos anti- dsADN, con el riesgo de que reduce después de la cesación del hábito de fumar. (Tsokos, S, & Costa Reis, 2016)

Las células presentadoras de antígeno, en particular las células dendríticas, pueden ser activadas por señales de daño/alarma producidas por células propias que resultaron dañadas producto de la actividad del sistema inmune frente a patógenos, toxinas, daño mecánico y humo de cigarro, etc. Se han descubierto señales de alarma endógenas como ADN metilados y RNA alterado, proteínas de choque térmico, interferón- γ , interleucina-1B (IL-1b), CD40-L. Después de esto, las células dendríticas viajan a los nódulos linfáticos con señales de alarma, producidas por las células de barrera del epitelio pulmonar (LEBC), y presentan antígenos a los linfocitos T vírgenes, induciendo proliferación de linfocitos T CD8+ citotóxicos.

Las células CD8⁺ migran a los sitios del daño inicial y por la liberación de perforinas y granzimas atacan las LEBC. Las perforinas forman poros en las membranas de las células blanco, mientras que las granzimas y serinproteasas, entran al citoplasma de las células, alterando su función y/o activando apoptosis. (Reséndiz-Hernández, Camarena, Pérez-Rubio, & Farfán-Valencia, 2011)

7.2 Mecanismos epigenéticos

Los loci genéticos de susceptibilidad en el LES justifican una magnitud de riesgo modesta, en torno al 15-20%, pero no explican de forma satisfactoria la mayor parte de la heredabilidad (Ghodke-Puranik & Niewold, 2015). Por lo tanto, debe haber otros factores que participan en la patogenia, como las interacciones entre los propios genes, así como factores ambientales o dependientes del propio paciente (Cui, Sheng, & Zhang, 2013).

Se ha considerado la posibilidad de que procesos epigenéticos influyan sobre el riesgo genético en enfermedades autoinmunes como el LES. La epigenética define modificaciones estables potencialmente heredables en la expresión de los genes o de fenotipos celulares, resultado de cambios en el ADN o en la cromatina o en los mecanismos post-transcripcionales, sin que ocasionen cambios en la secuencia codificante del ADN. Es decir, define cambios en la expresión de genes que no implica alteraciones en la secuencia de ADN. Los fenotipos epigenéticos determinan que genes se expresan o inhiben, influyendo en el desarrollo y en las funciones celulares (Liu & La Cava, 2014) (Wu, Zhao, Chang, & Lu, 2015). Un aspecto importante de los cambios epigenéticos es que pueden ser sensibles a factores externos (físicos, químicos, etc.) (Gatto, y otros, 2013). Pueden explicar en parte la concordancia incompleta entre gemelos monocigotos y la influencia de factores ambientales en la expresión de la enfermedad. (Liu, Kao, Manzi, & Ahearn, 2013)

Los ejemplos más comunes de estos fenómenos en el LES son: Hipometilación de ADN, modificación de histonas y disregulación de ARN (microARN o ARN no codificantes) (Gatto, y otros, 2013) (Deng & Tsao, 2014). Los dos primeros modifican la estructura de

la cromatina que determina el acceso de los procesos de transcripción al ADN, mientras que el tercero modifica la expresión de genes actuando sobre el RNA mensajero. Además, puede haber interacciones entre los tres mecanismos (Costa-Reis & Sullivan, 2013).

7.2.1 Hipometilación del ADN

La metilación de ADN es un regulador negativo de la expresión de genes, ya que impide la fijación de factores de transcripción. Es llevada a cabo por metiltransferasas. Constituye una marca que indica la represión de la expresión de un gen. Una deficiente metilación puede conducir a su sobreexpresión, sobre todo en genes sensibles. Existen alteraciones de la metilación en el LES inducido por fármacos y en el LES idiopático (Tsokos, Lo, Reis, & Sullivan, 2016) (Liu, Kao, Manzi, & Ahearn, 2013). La hipometilación puede afectar a regiones reguladoras de genes que participan en el funcionamiento de células B y, sobre todo, T CD4+ (Liu, Kao, Manzi, & Ahearn, 2013). Muchos de ellos se relacionan con la familia IFN tipo I. Se ha demostrado hipometilación en genes reguladores de la producción de IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13, con repercusión sobre el funcionamiento de células T. Se produce un aumento de la actividad de células T. Los cambios pueden guardar relación con una hiperrespuesta del IFN tipo I conocida en la enfermedad. La hipometilación puede explicar en parte el predominio femenino de la enfermedad, ya que puede producir la reactivación preferente de genes incluidos en el cromosoma X, como el gen del CD40L. Además, podría conducir a la activación de genes del cromosoma X inactivo. (Tsokos, Lo, Reis, & Sullivan, 2016)

Ciertos factores externos, como fármacos o la luz ultravioleta, pueden inhibir la metilación de ADN. La procainamida y la hidralazina, relacionados con el lupus inducido por fármacos, ejercen un efecto inhibitorio sobre la actividad ADN metiltransferasas, enzimas que participan en la metilación del ADN (Liu & La Cava, 2014).

7.2.2 Modificación de histonas

Las histonas son proteínas que forman complejos con el ADN en el núcleo celular.

Constituyen el componente principal de estructuras denominadas nucleosomas, subunidad básica de la cromatina, con cantidades específicas de ADN y de cuatro tipos de histonas (H2A, H2B, H3 y H4). Participan en la determinación de qué parte de la cromatina está accesible para la transcripción activa (Liu & La Cava, 2014) (Wu, Zhao, Chang, & Lu, 2015). Modificaciones en las histonas, como la acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación y citrulinación pueden alterar la estructura de la cromatina y la expresión de genes, sin cambiar la secuencia de ADN. Se sabe que cambios de este tipo ocurren en células T. La hiperacetilación H4 en monocitos se relaciona con un incremento de la expresión de genes implicados en las vías del IFN tipo I y la vía NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) (Liu, Kao, Manzi, & Ahearn, 2013) (Deng & Tsao, 2014).

7.2.3 Disregulación de ARN: microARN o ARN no codificante

Los microARN (o miARN) son una clase de ARN no codificantes que regulan la expresión de genes, actuando sobre ARN mensajeros (mARN). Tienen capacidad para silenciar secuencias genéticas a nivel post-transcripcional. Son esenciales en procesos inmunológicos. Ejercen funciones complejas, ya que un solo microARN es capaz de regular cientos de mARN, y cada mARN puede ser regulado por múltiples microARN (Liu & La Cava, 2014). Se han visto tipos específicos de microARN en el LES, y se han correlacionado con el grado de actividad y con manifestaciones específicas. La expresión reducida del microARN 146a se relaciona con la activación de la vía del IFN tipo I, mientras que la de miARN 125a se relaciona con hiperproducción de citocinas. También influyen en la metilación de ADN a través de modificaciones en la actividad de ADN metiltransferasas (Deng & Tsao, 2014). Algunos autores consideran que la reducción del miARN 146a constituye un marcador de la enfermedad. Otros miARN asociados al LES son el 155, que regula respuestas inmunes innatas y adaptativas, y el 182, que reduce la producción de IL-2. Además, la represión de ciertos miARNs pueden revertir manifestaciones de la enfermedad. Se investiga también el papel de miARN como biomarcador de la enfermedad e incluso como diana terapéutica (Tsokos, Lo, Reis, &

Sullivan, 2016). El descubrimiento de cambios epigenéticos en las enfermedades autoinmunes ha llevado a la investigación de posibles terapias que puedan influir en dichos fenómenos, como la modificación de la metiltransferasa, la modulación de la acetilación de histonas o la utilización de microARNs específicos (Deng & Tsao, 2014) (Liu, Kao, Manzi, & Ahearn, 2013).

8. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), es un sistema de genes ubicados en el brazo corto del cromosoma 6, (Figura 3) cuya existencia y función se ha conservado durante la evolución, lo que demuestra su importante papel. Se caracteriza por ser altamente polimórfico y poligénico y su patrón de herencia es mendeliano. El MHC codifica para proteínas asociadas con la inmunidad adquirida y participa directa o indirectamente en el procesamiento de péptidos y en la presentación antigénica. Este sistema es estrictamente regulado a nivel genético y sus componentes principales son las moléculas HLA clase I y clase II, las cuales participan en la presentación de péptidos tanto intracelulares como extracelulares, respectivamente. (Vega Robledo, 2009)

a) Tipos de moléculas HLA

Los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad en el hombre son muy polimórficos, es decir, existen muchas variantes alélicas en una población que difieren en sus distintas capacidades para unirse y presentar los diferentes determinantes antigénicos de las proteínas. Según su estructura, las moléculas de histocompatibilidad se dividen en dos grandes grupos: *moléculas de clase I* y *moléculas de clase II*, que se encuentran codificadas por regiones distintas dentro de la región genética del HLA y desempeñan diferentes funciones inmunológicas. (Vega Robledo, 2009)

Un haplotipo HLA es una región genética de un cromosoma que contiene todos los genes HLA (excepto los que codifican la $\beta 2$ microglobulina que se codifica en el cromosoma 15). Incluye los genes clase I "clásicos" o clase Ia: HLA-A, HLA-B y HLA-C; los genes clase I no clásicos o Ib: HLA-E, HLA-F y HLA-G, y los genes clase II: HLA-DR,

HLADQ y HLA-DP. Su herencia es codominante, por lo que el gen del padre y de la madre se expresa en el fenotipo del hijo, y se expresan los dos alelos de cada locus. (López-Martínez, Chávez-Muñoz, & Granados, 2005)

El gen HLA-G está localizado en el cromosoma 6, cerca del gen que codifica el locus del gen HLA-A. El HLA-E está localizado entre el HLA-C y el HLA-A, mientras que el HLA-F está situado cerca del HLA-G y el HLA-A. La estructura de los genes HLA de clase I no clásico es muy similar a los genes de clase I clásicos. Sin embargo, existen diferencias en relación con el extremo 3' (cola citoplasmática). La cola citoplasmática corta del HLA-G es importante para disminuir la endocitosis de la misma. (López-Martínez, Chávez-Muñoz, & Granados, 2005)

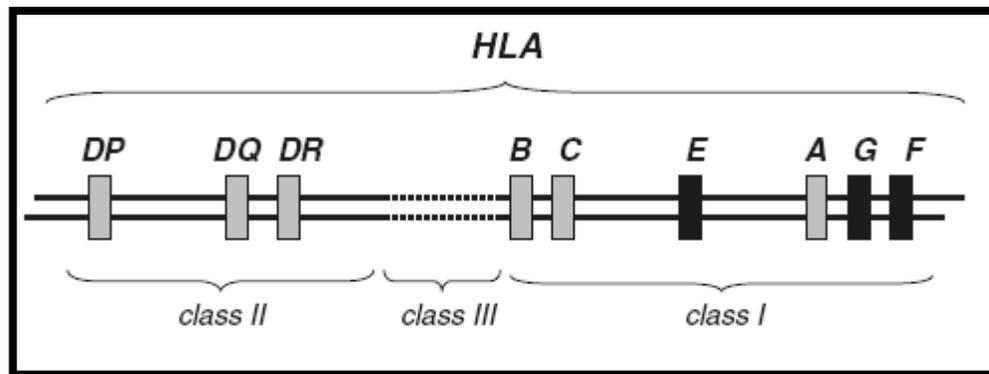


Figura N^a 3. Ubicación de los genes HLA clase I, II y III en el brazo corto del cromosoma 6 Fuente: (Torres Odio & Martínez Córdova, 2011)

b) Moléculas HLA clase I

Las moléculas de los *antígenos de histocompatibilidad de clase I* están constituidas por 2 cadenas polipeptídicas: una cadena pesada, glicosilada, de mayor tamaño, con un peso molecular de 45 kD, asociada, mediante interacciones no covalentes a una cadena ligera, la $\beta 2$ *microglobulina* con un peso molecular de 12.5 Kd (Figura 5).

La $\beta 2$ *microglobulina* es idéntica en todos los individuos de la misma especie, y los genes

que la codifican no se encuentran en el Complejo Principal de Histocompatibilidad. Su análisis estructural revela que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, con una notoria homología con el tercer dominio constante de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. (López-Martínez, Chávez-Muñoz, & Granados, 2005)

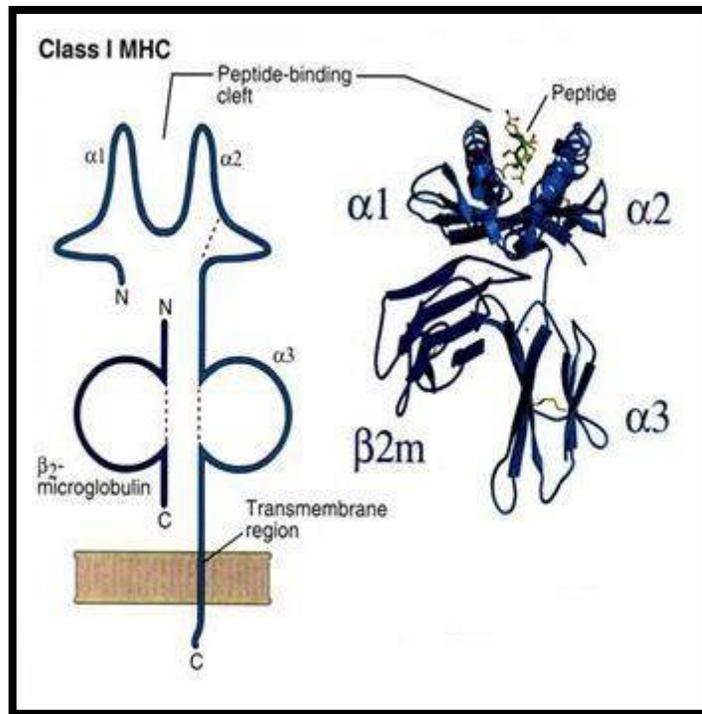


Figura N° 4. Molécula HLA clase I Fuente: (Foroni, Couto, & Bettencourt, 2014)

La cadena pesada, por el contrario, es altamente variable entre individuos de la misma especie, siendo responsable del polimorfismo antigénico de las moléculas de histocompatibilidad clase I. Se distinguen 3 zonas bien definidas: una zona extracelular de mayor tamaño en la que se encuentran los determinantes antigénicos de la molécula, una pequeña región transmembrana, hidrófoba, y finalmente una región intracitoplasmática de 35 aminoácidos. (López-Martínez, Chávez-Muñoz, & Granados, 2005)

La zona extracelular se halla organizada en tres dominios de 90 residuos cada uno, denominados $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, mantenidos por la existencia de puentes de sulfuro intracatenarios. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ constituyen regiones de contenido variable de

aminoácidos, es decir, son zonas donde radica la variabilidad de la molécula. El dominio $\alpha 3$ es constante, pertenece a la familia de las inmunoglobulinas y tiene notable homología con la región constante de la $\beta 2$ microglobulina (Figura N° 5)

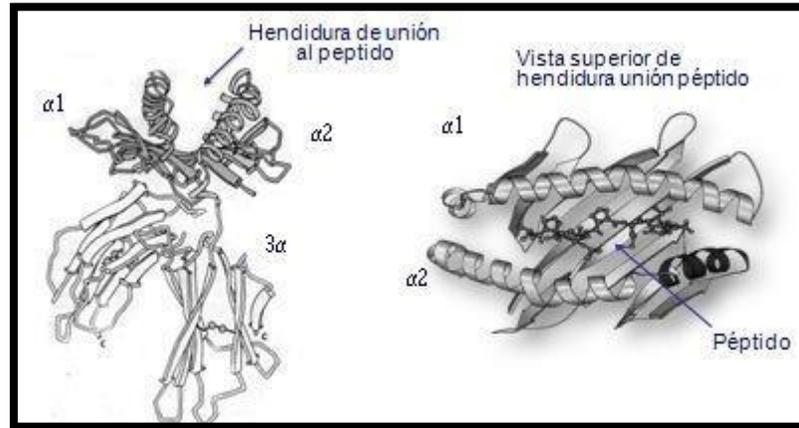


Figura N° 5. Estructura tridimensional HLA clase I. Fuente: (López-Martínez, Chávez-Muñoz, & Granados, 2005)

La región que codifica las moléculas de clase I está dividida en 3 loci conocidos como A, B y C que codifican tres tipos de cadenas pesadas para las distintas moléculas de clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-Cw). Son los genes clase I “clásicos” que codifican para glicoproteínas de membrana y están implicadas en la restricción del reconocimiento antigénico mediada por linfocitos T citotóxicos. (López-Martínez, Chávez-Muñoz, & Granados, 2005)

Las moléculas HLA de clase I se expresan en la mayoría de las células nucleadas del organismo. En algunas localizaciones, su expresión es mínima o nula, como en las células musculares, neuronas del SNC y fibroblastos. El $INF\alpha$, $INF\beta$ e $INF\gamma$ aumenta la expresión del HLA tipo I. (López-Martínez, Chávez-Muñoz, & Granados, 2005)

c) Moléculas HLA clase II

Las moléculas de clase II son glicoproteínas que se encuentran en la superficie celular. Están formadas por 2 cadenas, denominadas cadena alfa o pesada y cadena beta o ligera, asociadas entre sí mediante interacciones de naturaleza no covalente. Tanto la cadena

En las moléculas clase II se encuentran los pares de genes que codifican las cadenas α y β de los antígenos HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP.

Las moléculas de HLA de clase II se expresan en la estirpe monocito, macrófagos, linfocitos B activados, linfocitos T CD4+ activados y el endotelio vascular. También se expresa en alta densidad, en células que actúan como presentadoras de antígenos, como las dendríticas del bazo, las epidérmicas de Langerhans y el endotelio. El INF γ aumenta la expresividad de HLA clase II en células que ya lo tienen (excepto linfocitos B) y células que no lo tenían previamente. (Vega Robledo, 2009)

d) Expresión del HLA en enfermedades autoinmunes

El estudio del polimorfismo del HLA nos ayuda a comprender la susceptibilidad a patologías autoinmunes. Se sabe que determinadas enfermedades se asocian con el incremento de la frecuencia de un determinado alelo HLA y son de etiología desconocida, crónicas y con agrupamiento familiar. El HLA es un factor de susceptibilidad o marcador de riesgo identificado a pesar del polimorfismo de los alelos de clase I y II. (Anaya, JM y Col., 2008)

Varias hipótesis explican los mecanismos de asociación entre HLA y enfermedad:

- ✓ **Mimetismo molecular entre HLA y agentes infecciosos:** existen determinantes antigénicos cruzados entre *Klebsiella sp.*, el HLA-B27 y la espondilitis anquilosante. Las células T se activan por mimetismo molecular, ya que un determinante inmunogénico de un antígeno exógeno es estructuralmente similar a un determinante propio
- ✓ **Modificación de la estructura del HLA:** por agentes infecciosos o agentes químicos.
- ✓ **Antígenos HLA como receptores:** la presencia del HLA sobre la célula

blanco es un requisito para que penetre el patógeno a la célula y se desarrolle la enfermedad.

- ✓ ***Déficit en la respuesta inmune:*** cualquier trastorno implica a antígenos HLA y su participación genética en la enfermedad.
- ✓ ***Déficit de factores del complemento:*** solo o en desequilibrio génico con una molécula HLA, se asocia a susceptibilidad de algunas enfermedades. El déficit del factor C2 del complemento se asocia con DR3 en LES, y el defecto en el gen CYP21 de la 21-hidroxilasa se asocia con HLA-B47 en la hiperplasia adrenal congénita.
- ✓ ***Fallo en la selección, llamado también "agujero en el repertorio":*** la selección positiva o negativa de linfocitos T autoreactivos o moléculas deficientes en la presentación de péptidos antigénicos contribuyen a la patogénesis de la enfermedad.

9. EXPRESIÓN DEL HLA-G, POLIMORFISMO Y FUNCIÓN

El gen HLA- G pertenece a la familia de moléculas de histocompatibilidad no clásicas y se caracteriza por un limitado polimorfismo y una distribución celular y tisular restringida, presenta una secuencia y estructura bastante homologa con la de los genes HLA clase I que presentan 3 dominios (α_1 , α_2 y α_3) que están asociados covalentemente con la β_2 -microglobulina. De igual forma el gen cuenta con 8 exones, 7 intrones y la región 3'UTR, pero, a diferencia de los genes anteriores, presenta un codón de parada en el exón 6. (Feroni, Couto, & Bettencourt, 2014). El gen del HLA-G adopta siete formas proteicas o isoformas, que son el resultado del empalme alternativo de un mismo RNA precursor, cuatro de estas proteínas están ligadas a la membrana (HLA-G1, G2, G3 y G4) y las otras tres son isoformas solubles (HLA-G5, G6 y G7).

Los transcritos HLA-G2, -G3 y -G4 no incluyen el exón 3, exón 3 y 4 o el exón 4 respectivamente generando las isoformas truncadas. La isoforma -G3 solo presenta el dominio α_1 , -G2 el dominio α_1 y α_3 y -G4 el dominio α_1 y α_2 , tienen en común la región transmembrana, el cual les permite expresarse en la superficie celular e inhibir las

actividades citotóxicas de las células T y NK. (Feroni, Couto, & Bettencourt, 2014)

Los mecanismos inusuales para generar las proteínas solubles alternas del HLA-G incluyen el codón de parada en el intrón 4 para las isoformas –G5 y –G6, mientras que –G7 presenta un codón de parada en el intrón 2. La molécula soluble completa HLA-G5 contiene el péptido líder, los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y excluye el dominio transmembranal. La isoforma truncada HLA-G6 no tiene el dominio $\alpha 2$ y excluye el dominio transmembranal, mientras que –G7 solo contiene el dominio $\alpha 1$. (Rincón & Manrique, 2014).

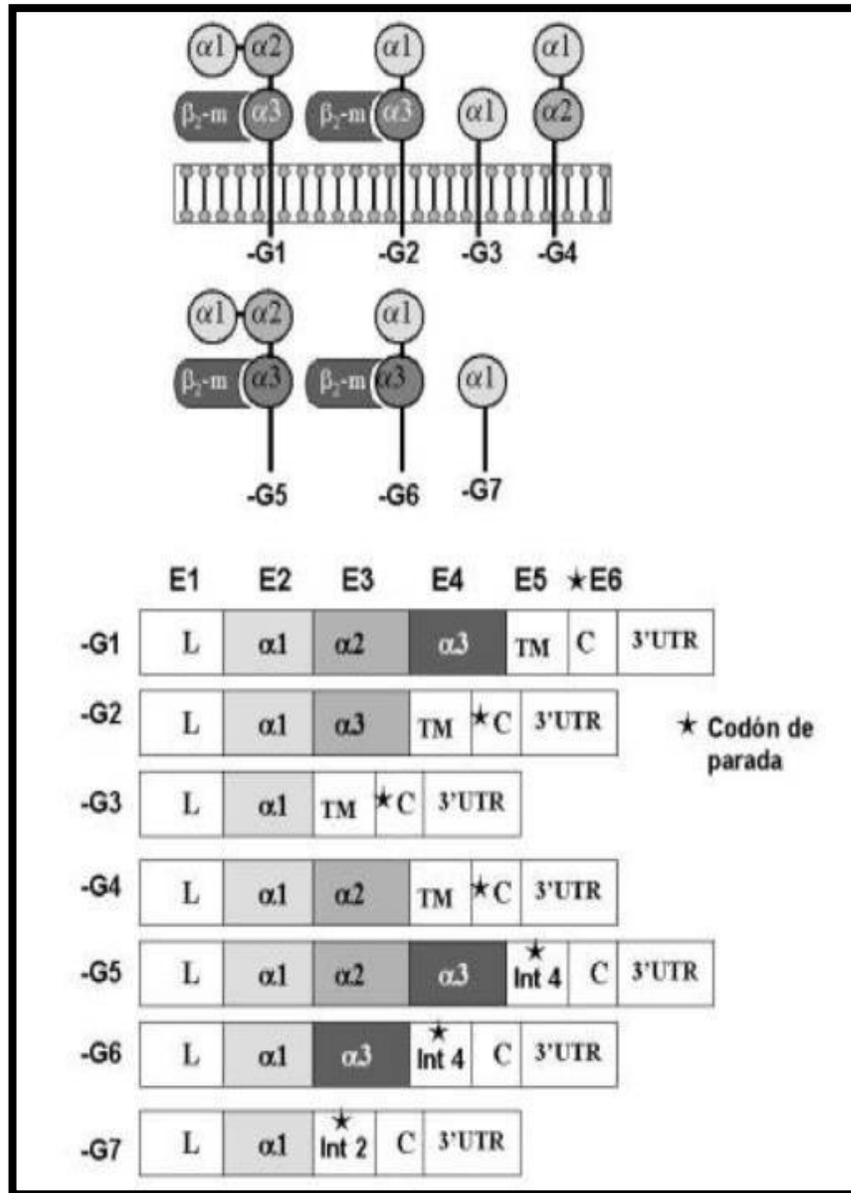


Figura N°7. Representación de las isoformas del HLA-G. L: secuencia líder; α1, α2, α3: dominios externos, DM: dominio transmembranal; C: dominio citoplasmático; 3'UTR: Región 3' no traducida; Int 4: intrón 4; la estrella indica los codones de parada

Otra característica notable del promotor de HLA-G es su variabilidad relativamente alta. Hasta la fecha, se han identificado más de 29 SNP en esta región, muchos presentan elementos regulatorios casi conocidos.

a) Distribución del HLA-G

La proteína HLA-G unida a membrana se expresa selectivamente en las células del trofoblasto extraveloso de la placenta, las células endoteliales fetales, los macrófagos de la mesénquima de las vellosidades coriónicas y las células epiteliales de la médula del timo. Sin embargo, se han detectado niveles bajos de transcripción de los genes HLA-G en algunas células de tejidos adultos, como linfocitos T y B. Por otra parte, se ha observado expresión de ARN mensajero del HLA-G en sitios como la región anterior del ojo, la piel, los pulmones y en células renales, de ovario, colon e intestino. (Alfonso, 2009)

Las formas solubles del HLA-G se encuentran en el líquido amniótico, en la sangre periférica materna y en la de cordón. También expresan HLA-G unido con la membrana las células del trofoblasto endovascular. El trofoblasto solo expresa HLA-G soluble. Las moléculas HLA-G pueden expresarse ocasionalmente en fibras musculares y en células epiteliales del hígado y los túbulos renales.

Se ha detectado expresión HLA-G en células de estroma durante condiciones de inflamación, en biopsias de tumores y en suero de pacientes trasplantados. Estas 2 últimas localizaciones han provocado que varios investigadores consideren que estas moléculas participan en la producción de tolerancia inmune a tumores y trasplantes. (Alfonso, 2009)

b) Polimorfismo de HLA-G

Con respecto a su polimorfismo, el HLA-G presenta un bajo grado de polimorfismo presentando una limitada heterogeneidad de secuencias y pocos alelos descritos, en la actualidad se conocen solo 58 alelos. (HLA Nomenclature @ hla.alleles.org, 2018) De los 58 alelos reportados, 15 se asignaron por la nomenclatura de HLA.

El primer alelo descrito por *Geraghty*, el G*01011 (salvaje), se encuentra presente en casi todas las poblaciones, aunque con una frecuencia variable del 32 % en poblaciones

alemanas/croatas en contraste con el 83 % en poblaciones de Ghana. El alelo HLA-G*01011 no involucra sustituciones en las secuencias de aminoácidos en comparación con otros alelos: como el alelo G*0103 (Thr31Ser), G*0102 (Gln54Arg), G*01013 (Phe241Ser) y G*01043 (Leu110Iso). (Barrios, y otros, 2012).

El G*0105N es el primer alelo nulo del HLA-G descrito, presenta una delección de una citosina (1597 del C) en la tercera base del codón 129 o en la primera base del codón 130, esto causa un cambio estructural que altera la secuencia de aminoácidos en el exón 3 (dominio $\alpha 2$) y genera un codón de parada prematuro en el exón 4. El HLA-G*0105N se encontró en una variedad de grupos étnicos con una frecuencia de 11,1% en poblaciones africanas a un 0,6% en poblaciones danesas. No ha sido encontrado en poblaciones caucásicas americanas o japonesas. La descripción de individuos sanos homocigotos para el alelo G*0105N indica que el HLA-G1 no es necesario para la supervivencia fetal. (Rincón & Manrique, 2014)

Sin embargo, Van der Ven y Ober en 1997 demostraron por análisis de secuencias en el exón 2 y 3 un excesivo polimorfismo del locus HLA-G en mujeres africanas no emparentadas. Mediante SSP-PCR y secuenciación, se observó un alto polimorfismo en la región codificante en 18 individuos no relacionados CEPH (Centro de Estudios de los Polimorfismos Humanos - Francia) y tres familias de referencia de CEPH, encontrándose segregación de los alelos HLA-G en la descendencia en heterocigotos. Esta segregación fue igual a la que se presenta para el haplotipo HLA clase I, aun en la descendencia de HLA-B/C recombinante. (Rincón & Manrique, 2014)

Matte y colaboradores en el 2000 reportaron en 108 mujeres africanas no relacionadas que participaron del proyecto del Instituto de Investigación de Salud Materna e Infantil (ZVITAMBO) una frecuencia de un 39,3% para el alelo HLA-G*01011 el más predominante en la población de estudio, seguido por el alelo G*01041 (20,4%), con una frecuencia similar a la reportada en Japoneses (38%) y poblaciones Hutterite (20%) y se encontró el alelo nulo G*0105N con una frecuencia relativamente alta de

11,1% en esta población que históricamente posee una gran cantidad de patógenos, lo que hace especular que la reducción en la expresión del HLA-G podría estar asociada con un aumento en el número de células T uterinas maternas, siendo benéfico en infecciones intrauterinas. (Rincón & Manrique, 2014)

En base a la fase gamética (haplotipos) 72 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) se observaron entre el exón 1 y el intrón 6, se definieron 44 alelos de codificación HLA-G (IMGT, base de datos 2.28.0, enero de 2010). Teniendo en cuenta la región entre el exón 1 y el exón 6, que codifica la porción externa y la región transmembranal de la molécula HLA-G, todos estos segmentos presentan varias variaciones de nucleótidos. La región de codificación de la cadena pesada exhibe 33 SNP; sin embargo, solo se observan 13 variaciones de aminoácidos, 4 de ellas en $\alpha 1$, 6 en $\alpha 2$ y 3 en el dominio $\alpha 3$. (Donadi, y otros, 2011)

Por otro lado, los exones 1 y 5 presentan solo dos sustituciones sinónimas, por lo tanto, la péptida señal y la porción transmembranal de la molécula son invariables. A pesar de la variabilidad limitada de las proteínas, las sustituciones de aminoácidos pueden explicar la función biológica de HLA-G, incluida la unión de péptidos, la producción de isoformas y la capacidad de polimerizar y modular células del sistema inmunitario.

c) Polimerización

La presencia de un residuo de cisteína en la posición 42 en el dominio $\alpha 1$ de la cadena pesada es una característica única de la molécula HLA-G, que permite la formación de dímeros a través de un enlace disulfuro intermolecular Cyst42-Cyst42. Los dímeros pueden formarse por monómeros HLA-G recombinantes, moléculas unidas a la membrana y solubles en células transfectadas (Boyson, y otros, 2002), unidas a la membrana en la superficie de células que expresan HLA-G endógenamente, e incluso por HLA-G libre de $\beta 2$ -microglobulina (Gonen-Gross, y otros, 2005). Una vez formado el dímero, tiene una orientación oblicua, exponiendo los sitios de unión para CD8 y receptores similares a inmunoglobulina leucocitaria B1/B2 (LILRB1/LILRB2, también

conocida como LIR1/LIR2, ILT2/ILT4 y CD85j/CD85d), permitiendo tener un dímero de HLA-G que pueda interactuar con dos moléculas LILR o CD8. Además de proporcionar una mayor afinidad por los LILR en relación con los monómeros, los dímeros HLA-G exhiben un aumento de la señalización intracelular mediada por LILR. (Shiroishi, y otros, 2006)

Ninguno de los alelos HLA-G ya descritos presenta variación de nucleótidos en el codón 42 (TGT) que codifica el residuo de cisteína. Por lo tanto, aparentemente todos los alelos que codifican moléculas de HLA-G no truncadas pueden formar dímeros. Dado que la interfaz del dímero se puede estabilizar mediante interacciones electrostáticas y de enlaces de hidrógeno, es posible que los residuos polimórficos cercanos puedan influir en la estabilidad del dímero o alterar la flexibilidad del enlace disulfuro Cyst42-Cyst42. (Donadi, y otros, 2011)

d) Polimorfismos de la región HLA-G 3' no traducida (UTR)

Dado que el exón 7 siempre está ausente del mRNA maduro y, debido a que el codón de terminación está en el exón 6, el exón 8 no se traduce, se ha considerado que este segmento genético es el 3'UTR del ARN maduro.

El HLA-G 3'UTR contiene varios elementos reguladores, que incluyen señales de poliadenilación y elementos ricos en AU, así como señales que regulan la expresión espacial y temporal de un mRNA. Las transcripciones primarias deben ser procesadas y unidas por proteínas antes de ser exportadas al citoplasma (Aguilera, 2005). En este proceso, se agrega la proteína Cap, los intrones se eliminan mediante la reacción corte y empalme y los extremos 3' se escinden y se poliadenilan. El complejo Cap-binding (CBC) se une a las estructuras capilares monometiladas 5' y proteínas de unión poli (A) (PAB) a la cola 3' para exportar componentes partículas de ribonucleoproteínas mensajeras (mRNP) necesarias para el transporte y traducción de mRNA. Las proteínas que se unen a un mRNA pueden influir en su traducción, localización y degradación, y cualquier polimorfismo en 3'UTR de un gen determinado puede influir en las propiedades de unión. (Kuersten & Goodwin, 2003)

La disponibilidad del mARN para la traducción se equilibra constantemente por la fuerza opuesta de la retención y degradación del mARN, en la que los transcritos no funcionales y deletéreos pueden eliminarse antes de la traducción. Además, un 3'UTR de un gen dado puede ser un objetivo para microARN (miARN), que son pequeños ARN no codificantes con aproximadamente 22 nucleótidos procesados a partir de precursores más largos. Los miARN pueden regular negativamente la expresión genética por supresión de la traducción, degradación del ARN o ambos. El primer miARN se informó en 1993, y se han notificado más de 600 hasta la fecha. (Griffiths-Jones, Grocock, van Dongen, Bateman, & Enright, 2006).

El gen HLA-G exhibe un 3'UTR que presenta motivos ricos para AU, una señal polo A, y varios sitios polimórficos que pueden influir potencialmente en la transcripción de HLA-G, la traducción o ambos mediante varios mecanismos diferentes. Entre ellos vale la pena mencionar:

- La presencia (inserción) o ausencia (delección) de un fragmento de 14 pb (polimorfismo INDEL) que se ha asociado con la estabilidad del mARN.
- El SNP en la posición +3142, que puede ser un objetivo para ciertos miARNs, que pueden degradar el mARN de HLA-G.
- El SNP en la posición +3187, que está relacionado con la estabilidad y degradación del mARN

e) Funciones inmunológicas

Es de destacar que la forma soluble de HLA G, denominada sHLA-G es generada especialmente por la secreción de las formas solubles de HLA G5 y las no solubles HLA G1, la cual tiene la característica de ejercer propiedades inmunosupresoras como ser:

- La inhibición de la actividad citotóxica de linfocitos T citotóxicos (CTL) y NK células.

- La inducción de la apoptosis de las células T CD8 activadas y las células NK.
- Inhibición alogénica de proliferación las células T CD4 y la interferencia sin alteración de la secuencia de las células T CD4.
- La inducción de tolerancia de las células dendríticas asociadas con la inhibición de su maduración.

La inhibición mediada por HLA-G de las funciones de ambas células inmunes innatas y adaptativas depende de los tipos celulares y de los perfiles de los receptores HLA-G que expresaron. Al unirse a los receptores expresados en varias células, como a los receptores KIR en células NK, ILT4 y LIR-1/ILT2, HLA-G podría inhibir directamente las funciones de las células NK, linfocitos T citotóxicos (CTL), células B, neutrófilos y células dendríticas (DC). El HLA-G también tiene actividades inmunorreguladoras indirectas de larga duración induciendo células tolerogénicas que incluyen células reguladoras T (Treg) que expresan HLA-G, células T CD4 y CD8, células T reguladoras de tipo 1 (Tr1), supresor derivado de mieloides (MDSC) y DC-10. (Figura N° 10) (Aifen & Wei-Hua, 2015)

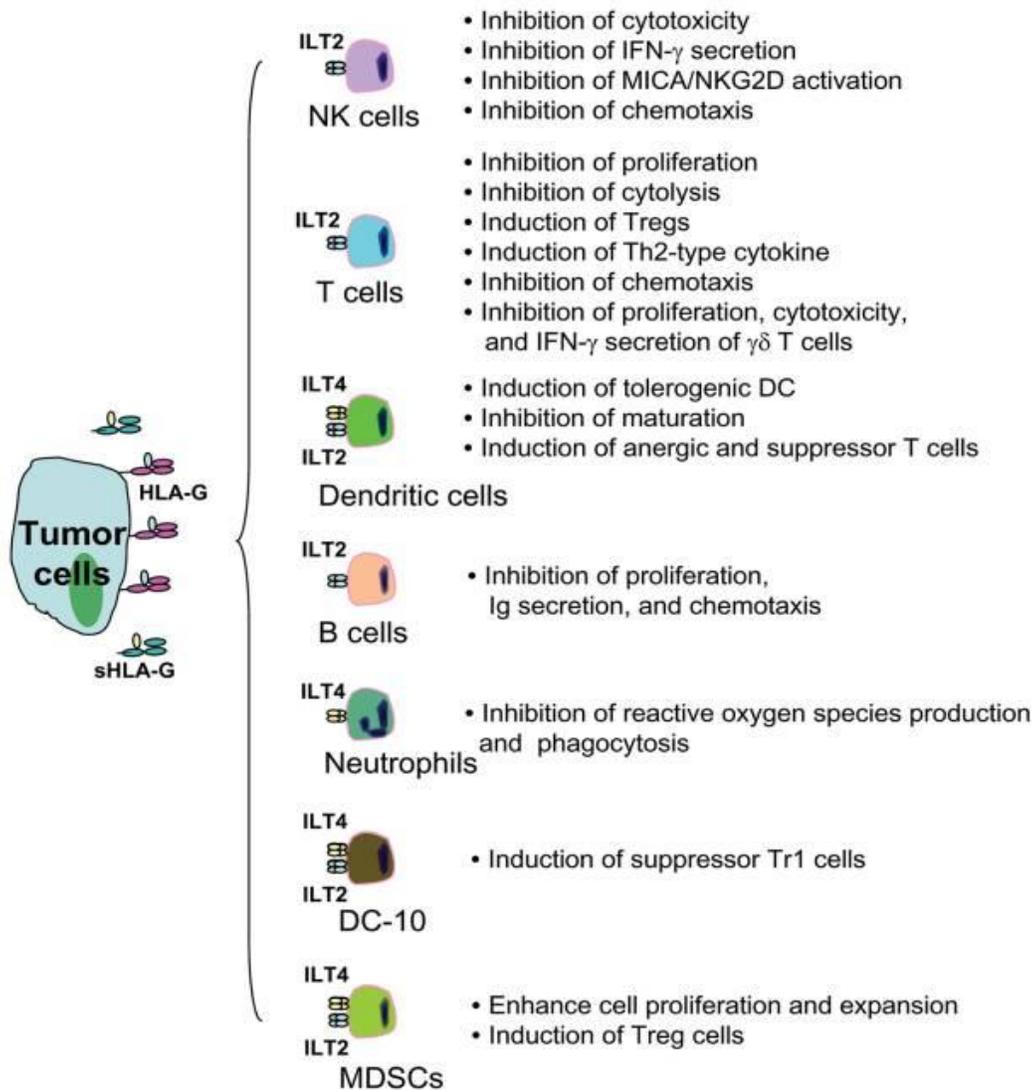


Figura N°9. Funciones tolerogénicas de HLA-G mediante la unión a receptores expresados en diferentes tipos de células inmunitarias Fuente: (Aifen & Wei-Hua, 2015)

La naturaleza de los receptores de HLA-G es de considerable interés, ya que estos, actúan en la inducción o inhibición de cierto tipo de células o citoquinas, favoreciendo de esta forma las funciones de HLA-G como la tolerancia inmune.

i. Interacción HLA-G con las NK

Moretta y colaboradores en 1994 demostraron que la actividad de la natural killer puede regularse por antígenos HLA clase I: algunos alelos HLA-C y -B presentes en células blanco actuando como moléculas protectoras contra la lisis de NK y constituyen ligandos específicos para los receptores de las células

El HLA-G inhibe la citólisis de las NK por dos vías, principalmente liberando señales inhibitorias a las NK. La primera, una vía directa, a través de la interacción con los receptores inhibitorios de las natural killer (KIRs), incluyendo ILT2/LIR1 (presentes en células NK, células mielomonocíticas, linfocitos T y B), ILT4/LIR2 (selectivamente expresado en monocitos, macrófagos y células dendríticas), p49 (presente en células NK deciduales) y KIR2DL4 (expresados en NK y linfocitos T) actuando directamente con el HLA-G. Sin embargo, ILT2, ILT4, p49 pueden interactuar con otras moléculas clase I del HLA.

El segundo mecanismo, una vía indirecta, consiste en la interacción con el receptor CD94/NKG2 (miembro de la superfamilia de las lectinas C) del HLA-E (expresado en la superficie de los NK) que contiene un péptido líder derivado del HLA-G inhibiendo así la actividad de las NK. El HLA-E está involucrado en la regulación positiva y negativa de citotoxicidad de las NK. (Alfonso, 2009)

Rouas-Freiss y colaboradores encontraron que la transfección de las isoformas truncadas HLA-G2, -G3 y -G4 pueden inhibir la actividad lítica de las NK, esto podría ser muy importante durante los procesos patológicos y fisiológicos en los cuales la expresión del HLA-G1 se encuentre alterada.

ii. Interacción de la HLA-G con las células T

Le Gal y colaboradores fueron los primeros que mostraron que el HLA-G inhibe los linfocitos T citotóxicos. Esta molécula inhibe la proliferación de la respuesta de las células T durante la reacción primaria alogénica. Además, la diferenciación de las células T pueden reconocer y unirse al HLA-G, de este modo, es posible que pueda servir como un factor de reconocimiento y activación por las células CD8+, actuando como supresor

citotóxico de las células T. (Alfonso, 2009)

Recientemente, se demostró que el HLA-G5 puede ser blanco en la apoptosis *in vitro* de las células CD8+ activas por interacción con la molécula CD95, además, se encontró un aumento de la expresión de CD95L en CD8+ CTL, por tanto, la apoptosis puede ser consecuencia de la interacción CD95/CD95L. El HLA-G5 es principalmente expresado en la placenta, y puede tener otras funciones como la de contribuir a la eliminación de CD8+ aloreactivos maternos de las células T in vivo en la interface materno fetal a través de la vía CD95/CD95L. La modulación de la respuesta de las células T por el HLA-G podría ser importante en el rechazo de trasplantes, debido a que es mediado principalmente por los linfocitos T. (Alfonso, 2009) (Rincón & Manrique, 2014)

iii. HLA-G en el embarazo

Las células de trofoblasto humano son únicas en comparación con otros tejidos somáticos, ya que, no expresan las moléculas clase HLA-A y HLA-B, sólo se expresa el HLA-G. Por tanto, el HLA-G cumple un papel crucial en la tolerancia inmunitaria feto-materna, dada que, se expresa desde los primeros días siguiente a la fecundación desde el momento en que el óvulo se implanta en la pared uterina.

La expresión del HLA-G en el trofoblasto durante el embarazo, sugiere un rol en la protección del feto semialogénico contra la lisis de las NK maternas y la respuesta de los linfocitos T alo-citotóxicos. (Rincón & Manrique, 2014)

La interface materno-fetal es un compartimiento inmune tolerado único en el que existe un gran número de células inmunes maternas tales como células asesinas naturales (dNK), células T y macrófagos, junto con los trofoblastos fetales extravulvosos (EVT) que además de expresar HLA-G también expresan HLA-C y un bajo nivel de HLA-E. De estos, HLA-C es el único antígeno polimórfico capaz de provocar una alo-respuesta específica del antígeno, y la incompatibilidad del HLA-C se ha asociado con la activación de las células T y la inducción de las células Treg en la interface materno-fetal. HLA-C que está representado por los grupos de alotipos C1 y C2 y moléculas no polimórficas HLA-E

también son potentes ligandos para los receptores inhibidores de NK.

Por lo tanto, el HLA-G puede no ser necesario para inhibir la citotoxicidad de NK contra EVT al nivel de una interacción individual o sinapsis inmune.

HLA-G interactúa con tres receptores, el receptor 2DL4 de tipo Ig de células asesinas (KIR2DL4 o CD158d) y los receptores B1 (LILRB1, ILT2 o CD85j) y B2 (LILRB2, ILT4 o CD85d) similares a Ig de leucocitos, que se expresan mediante Células NK y macrófagos. Todos estos contienen un motivo de activación, así como un motivo inhibitorio. Funcionalmente, se ha demostrado que la interacción de células que expresan HLA-G con NK disminuye la citotoxicidad y aumenta la producción de citoquinas tales como IL-6 e IL-8 (Tilburgs, Evans, Crespo, & Strominger, 2015)

Tanto el mRNA como sus isoformas se expresan en embarazos ectópicos. Este patrón de expresión del HLA-G en los trofoblastos no es afectado por la composición cromosómica del feto, y ello sugiere que la expresión del HLA-G es independiente del desarrollo embrionario. Además, HLA-G está asociado con algunas complicaciones en la gestación, tales como las infecciones intrauterinas, en pre-eclampsia y en aborto recurrente espontáneo. (Vázquez-Rodríguez, Bouchan-Valencia, & González-Jiménez, 2011)

Estudios de patologías gestacionales han presentado patrones de expresión alterados del HLA-G en el trofoblasto, con un déficit de la proteína en pacientes con pre-eclampsia, además se ha encontrado la ausencia o reducción de la expresión del HLA-G mediante hibridación in situ. (Vico Zúñiga, 2007)

HLA-G es un componente clave en los procesos de invasión del trofoblasto, en la pre-eclampsia presenta baja invasión del trofoblasto resultando en la inadecuada remodelación de los vasos sanguíneos uterinos y perfusión de la placenta. Brien en el 2001, analizó la expresión del HLA-G en 10 placentas normales, en una placenta con PIH (hipertensión inducida por el embarazo) y 6 placentas con pre-eclampsia leve realizando la comparación con líneas celulares de coriocarcinoma JEG-3 por RT-PCR y Southern. Cuando se realizó la amplificación de los exones 2, 5 y 6 se observaron 3 bandas bien

definidas que corresponden a las isoformas HLA- G5/HLA-G1, HLA-G2/HLA-G4 (misma longitud) y HLA-G3. La isoforma HLA-G3 se encontró ausente en casi todas las muestras de pre eclampsia leve, indicando mecanismos alterados en la transcripción del HLA-G asociados con la enfermedad. (Rincón & Manrique, 2014)

iv. Expresión del HLA-G en el cáncer

La expresión de HLA-G en el cáncer se demostró por primera vez en el contexto del melanoma. Desde entonces, se ha estudiado la expresión de HLA-G en más de 2.000 muestras malignas entre treinta tipos de tumores que incluyen tanto neoplasias malignas sólidas como hematológicas, en las cuales se observó la expresión de HLA-G sobre la superficie celular de estas células. Se evidencio que existe, una alta frecuencia de expresión de HLA-G de la superficie de las células tumorales con una ausencia en tejido sano, detectándose también niveles aumentados de sHLA-G en diversos fluidos corporales de diversos tipos de cáncer. Se observó que la expresión de HLA-G estaba correlacionada con parámetros clínicos tales como estadio de enfermedad avanzado, metástasis tumoral y/o con el peor pronóstico en pacientes, lo que indica que el HLA-G podría facilitar la evacuación inmune tumoral, la invasividad y la metástasis. (Porrás-Dorantes & García-Ortiz, 2014)

Las vesículas extracelulares (VEs) juegan un papel importante en el sistema inmune ya que pueden mejorar o suprimir el sistema inmunitario, actuando como agentes reguladores en la respuesta inmune. Las VEs derivadas de los tumores pueden actuar en conjunto con varios factores solubles tales como: PGE2,IDO y HLA-G.

Riteau et al., describieron por primea vez la presencia de HLA-G dentro de EVs (HLA-G-EVs) en el sobrenadante de la línea celular de melanoma (HLA-G positivo) y en microambiente tumoral.

En las células del carcinoma de células renales HLA-G-EVs perjudican el proceso de diferenciación de los monocitos en DC, inhibiendo la activación de las células T y la proliferación.

El aumento de HLA-G-EVs en sangre periférica se ha relacionado con las células tumorales de las células madre circulantes y con mal pronóstico. Además, altos niveles de HLA-G soluble en el flujo sanguíneo sugieren un mejor pronóstico, lo que demuestra el papel diferencial de las fracciones solubles de HLA-G dependiendo de la encapsulación o no dentro de EVs. (Grange & Camussi, 2017)

v. HLA-G y lupus eritematoso sistémico

Se ha descrito una función inducible por tolerancia de la molécula HLA-G en respuestas celulares innatas y adaptativas, lo que sugiere un papel en las enfermedades inflamatorias. Se ha asociado un polimorfismo de inserción o delección de un segmento de 14 pares de bases (14 pb) en el exón 8 en la región no traducida 3' (3 UTR) en el gen HLA-G lo que ha atraído recientemente la atención, ya que, en algunos estudios se demostró que dicho polimorfismo de HLA-G está asociado con la estabilidad del ARNm, impidiendo de esta manera una adecuada participación en la regulación post- transcripcional de la molécula HLA-G, lo que impide una inadecuada expresión de la molécula HLA-G. (Rizzo, 2008)

10. INMUNOGENÉTICA COMO INSTRUMENTO DE DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Debido a la importancia que tiene el Complejo Mayor de Histocompatibilidad en el control genético de la respuesta inmunitaria y por ende en la homeostasis de la inmunoregulación se emplean técnicas de biología molecular para la determinación de ciertos genotipos en pacientes con la finalidad de comparar si dicho genotipo se encuentra asociado con susceptibilidad a enfermedades autoinmunes como LES.

✓ PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces

típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés).

Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión

Desnaturalización. Para que pueda iniciarse la reacción es preciso que las moléculas de ADN molde se encuentren en forma de cadena simple. Esto se consigue aumentando la temperatura de 90 a 95°C para que produzca la rotura de los enlaces de los puentes de hidrogeno intercatenarios y la consecuente separación de la doble hebra. Para asegurar la completa separación de la doble cadena del ADN, esta temperatura debe mantenerse unos minutos. Si el ADN solo se desnaturaliza parcialmente éste tenderá a renaturalizarse muy rápidamente dificultando con esto el proceso de hibridación.

Hibridación: Una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura de la reacción hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60°C para que se pueda producir la hibridación específica de los cebadores a las secuencias flanqueantes del fragmento que se desea amplificar, la temperatura a la que se realiza esta etapa debe establecerse para cada reacción en función de la longitud de los cebadores y su secuencia (temperaturas inferiores a la óptima nos producirán hibridaciones inespecíficas de los cebadores y temperaturas superiores nos dificultarán la eficiencia de la misma.

Extensión: En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador.

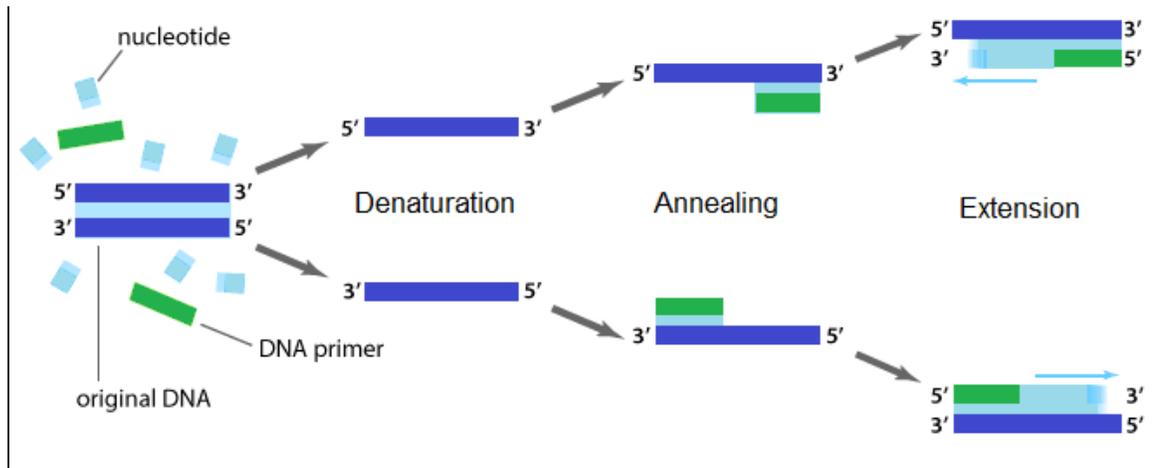


Figura N° 10. Proceso de la Reacción en Cadena Polimerasa Fuente: (Biotechnologies, 2017)

VI. OBJETIVOS

a) OBJETIVO GENERAL

- I. Evaluar la posible asociación entre el polimorfismo genético del HLA-G, con la susceptibilidad a Lupus Eritematoso Sistémico y sus manifestaciones clínicas en pacientes que asistieron al Instituto SELADIS durante los años 2015 y 2016.

b) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Optimizar la prueba de PCR para la identificación de la inserción o delección de un fragmento genético de 14 pb en la región 3'UTR del gen que codifica la proteína sHLA-G.
- II. Identificar los signos y síntomas que reportan con mayor frecuencia los pacientes en el transcurso de su enfermedad.
- III. Establecer las características demográficas de los pacientes involucrados en el estudio.
- IV. Comparar las frecuencias genotípicas y alélicas del locus HLA-G en pacientes con lupus eritematoso sistémico frente a un grupo de pacientes control.
- V. Determinar la relación entre las características clínicas y serológicas con el polimorfismo del gen HLA-G en pacientes lúpicos.

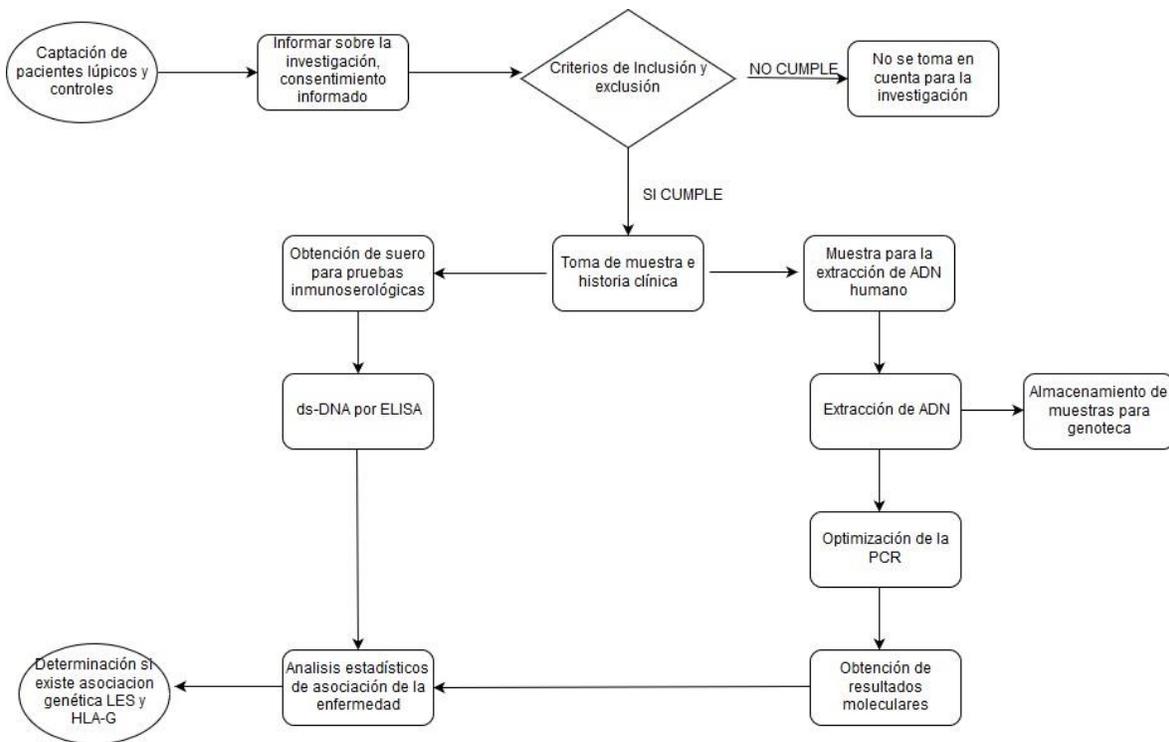
VII. DISEÑO METODOLOGICO

a) Diseño del estudio

i. Tipo de diseño

El presente trabajo corresponde a un estudio caso y control

ii. Flujograma de la investigación



b) Población en estudio

La población en estudio con la que se trabajó, fue admitida mediante criterios de inclusión y exclusión que fueron definidos bajo los parámetros que se describen más adelante, los cuales ayudaron a captar tanto pacientes lúpicos como los pacientes (sin la enfermedad) control. El 95% de la población total proviene de la ciudad de La Paz y el restante del interior del país, los cuales asistieron al Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación

en Salud (SELADIS) durante los meses de enero del 2015 hasta abril del 2016.

c) Descripción de la población

i. Grupo caso

i) Criterios de inclusión

- Personas de cualquier género, mayores de edad que cumplan al menos con cuatro de los once criterios para el diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistémico establecidos por el Colegio Americano de Reumatología y que tengan confirmada la enfermedad mediante clínica y laboratorio.
- En caso de pacientes menores de edad se solicitó el consentimiento de su padre, madre, tutor o apoderado para incorporarlo al estudio.

ii) Criterios de exclusión

- Se excluyó del estudio a aquellos pacientes que presentaron otras patologías de tipo autoinmune además de LES.
- Se excluyó del estudio a todas las personas cuyos médicos tratantes no estuvieron de acuerdo que sus pacientes participen del estudio.
- Se excluyó del estudio a todos los familiares de los pacientes lúpicos debido a que este no es un estudio de análisis de ligamiento genético mediante la segregación familiar.

iii) Criterios de eliminación

- Se excluyó del estudio a los pacientes que después de haber sido involucrados en el estudio decidan no formar parte del mismo, los datos obtenidos tampoco fueron tomados en cuenta en el análisis final de los resultados.
- Pacientes que después de haber aceptado su participación no asistieron a la toma de muestra.

ii. Grupo control

i) Criterios de inclusión

- Pacientes de cualquier edad y sexo a quienes se descartó la presencia de LES u otras enfermedades autoinmunes y quienes firmaron el consentimiento informado.

iii. Criterios de exclusión

- Se excluyeron a las personas que presentaron antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes.

d) Tamaño de la muestra

El tamaño muestral fue definido mediante la fórmula de estimación de la proporción poblacional infinita, con un intervalo de confianza del 95%, y haciendo énfasis en los criterios de inclusión y exclusión del estudio y en la capacidad de financiamiento del mismo. El tamaño de muestra calculado para el presente estudio fue de 94 pacientes, siendo que en el mismo fueron incorporaron 120 pacientes lúpicos (casos) y 112 pacientes sin la enfermedad (controles).

e) Lugar

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS dependiente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés.

f) Financiamiento

El presente estudio fue financiado con recursos provenientes del Impuesto Directo a los Hidrocarburos (IDH) gestiones 2010 – 2011 de la Universidad Mayor de San Andrés, como parte del proyecto concursable “Determinación de la asociación genética de los polimorfismos de gen que codifica la enzima convertidora de angiotensina, los loci HLA-DR y HLA-DQ con la susceptibilidad a Lupus Eritematoso Sistémico”

VIII. MATERIAL Y METODOS

a) Toma de muestra

Antes de la toma de muestra se realizó una historia clínica (anexo N° 3) a cada paciente con el objeto de aplicar los criterios de inclusión y exclusión y otra información relevante para el trabajo. Luego se procedió a la toma de muestra en dos tubos diferentes, en uno de ellos se extrajo 6 mL de sangre periférica con anticoagulante EDTA-K₃ para la extracción del material genético y en el otro tubo se tomó 5 mL de sangre periférica sin anticoagulante para las pruebas serológicas.

b) Pretratamiento de la muestra

Las muestras sin anticoagulante se centrifugaron a 2000 rpm por 5 minutos, luego se procedió a separar el suero para poder realizar las pruebas serológicas. El suero se conservó a – 20°C hasta el momento de su procesamiento.

En el caso de las muestras con anticoagulante para la extracción del material genético, se procedió a centrifugarlas a 3000 rpm por 10 minutos y se las guardó a – 20°C hasta el momento de su procesamiento.

c) Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN se realizó según el protocolo propuesto por el kit FAVORGEN (Biotech Corp USA.) en el cual se centrifugó la muestra de sangre periférica con EDTA a 3000 rpm por 10 minutos, luego se desechó el plasma y se homogenizó la muestra para luego tomar 200 µL y traspasarlos a un tubo Eppendorf nuevo, al mismo, se le agregó 20 µL de Proteínasa K (0,001 %) y 200 µL de Buffer FABG (formula de reactivo protegida por el fabricante, FAVORGEN, USA) el cual contiene altas concentraciones de sales caotrópicas, y aplicando la fuerza mecánica e incubando 15 minutos a 60°C se obtuvo los núcleos con el ADN libre y laxo para poder extraerlo. Luego se añadió 200 uL de etanol absoluto para poder precipitar la muestra, aplicando fuerza mecánica por medio del vortex. Se trasvaso el contenido del tubo a la columna FABG que contiene la membrana de sílica, y mediante centrifugación a 14000 rpm por 1 minuto con 30 segundos se separó el ADN de otros contaminantes. Posteriormente se realizaron dos lavados, uno con 500

μL de la solución W1 que tiene pequeñas cantidades de sales caotrópicas y etanol absoluto, esto para poder concentrar la muestra de ADN en la membrana de sílica y por ultimo con 750 μL de buffer de lavado, esto para poder eliminar cualquier tipo de impureza que se haya quedado atrapada en la membrana. Finalmente se trasvaso la membrana de sílica a un tubo Eppendorf nuevo para añadir 200 μL de Buffer de elución, al cual se lo deja actuar por 3 minutos para que la muestra de ADN atrapada en la membrana se hidrate y sea liberada al tubo. El pellet obtenido se lo conservó a 4 °C hasta el momento de su uso.

Se realizó la cuantificación del ADN obtenido por medio de espectrometría UV, obteniendo una concentración de ADN en un rango de 50 a 200 ng/μL y una pureza de ADN entre 1.5 y 1.8, determinando de esta forma la buena calidad del ADN. Para dicho procedimiento se tomó 20 muestras a las cuales se les realizó una dilución de 1:50, para ser leídas a una relación de D.O. (densidad óptica) de 260/280 nm.

d) Primers empleados para la hibridación la secuencia de 14 pb de la región 3' UTR del gen HLA-G

La secuencia de cebadores “forward” y “reverse” empleados en el presente trabajo corresponde a las empleadas por los estudios de C.R Consiglio et. al (2011), Wu *et al*, (2008), Rizzo y col, (2008), entre otros, quienes validaron el empleo del uso de estos cebadores para amplificar la secuencia de 14 pb de la región 3' UTR del gen HLA-G. Independientemente a los estudios realizados por estos autores se realizó la confirmación de la especificidad de los cebadores por la secuencia a estudiar y descartando así la posible hibridación en otras regiones del genoma humano u otras especies. El programa BLAST mostro un 100% de especificidad tanto en el cebador “forward” como del “reverse” hacia la región estudiada en el presente trabajo. Los cebadores fueron diseñados por la empresa *Invitrogen (USA)*, estando constituidos por las siguientes secuencias:

Forward 5'-GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC-3'

Reverse 5'-GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA-3'

e) Optimización de la PCR

La optimización de la PCR se realizó a partir de las condiciones propuestas por *C. R. Consiglio et al (2011)*: precalentamiento a 94°C por 2 minutos; desnaturalización en 35 ciclos a 34°C por 30 segundos; 64°C por 60 segundos y 72°C por 60 segundos; extensión final de 72°C por 10 minutos.

La preparación de master Mix fue realizada en 25 uL: Buffer 1X, dNTP 0.2 mM, MgCl₂ 1.5 mM, Taq ADN polimerasa 0.75 U y 10 pmol de cada primers (forward 5'-GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC-3' y reverse 5'-GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA-3')

Para realizar la preparación del master mix de la PCR, primero se realizó los cálculos para establecer la concentración final a la que cada uno de los constituyentes del mix debían ser empleados. Una vez sembradas las muestras y el control negativo (agua libre de nucleasas), se colocó a cada tubo de PCR una gota de aceite mineral pesado. En el presente estudio se empleó la polimerasa: *Platinum Taq ADN polimerasa (Invitrogen, USA)*.

Tabla N° 5. Cálculos realizados para obtención de concentraciones ideales de los reactivos para la elaboración del Master MIX de la PCR

	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por tubo	Volumen por 11
Buffer	10 X	1 X	2 µL	22 µL
DNTPs	5 mM	0,2 mM	0,8 µL	8,8 µL
Forward	10 µM	0,5 µM	1 µL	11 µL
Reverse	10 µM	0,5 µM	1 µL	11 µL
MgCl₂	25 mM	1,5 mM	1,2 µL	13,2 µL
TAQ	5 U/µL	0,08 U/µL	0,3 µL	3,3 µL
H₂O			8,7 µL	95,7 µL
Total			15 µL	75 µL

- **Condiciones de la temperatura de hibridación la PCR**

Para obtener la temperatura óptima para el paso de hibridación de la PCR se realizó un gradiente de temperatura desde 55°C hasta 65°C, con una temperatura de desnaturalización de 94°C, donde se pudo apreciar que la temperatura ideal de alineamiento en la PCR optimizada es a 57.5 °C. Todos los procesos de termociclado del presente trabajo se realizaron en un termociclador *Nexus GSX1 (Eppendorf, Alemania)*.

f) Revelado de los productos de PCR amplificados

Para el revelado de los amplicones obtenidos se utilizó el método de electroforesis en gel de agarosa al 5% utilizando como diluyente el tampón TBE al 1X (Tris, Ácido Bórico y EDTA) para 150 mL y el intercalante de ácidos nucleicos SYBR Green 7uL al 10.000X.

En el gel de agarosa preparado, se sembró 7 uL de las muestras correspondientes según el orden establecido y se procedió a la programación de la fuente de poder: 150 voltios, 350 miliamperios por 30 minutos.

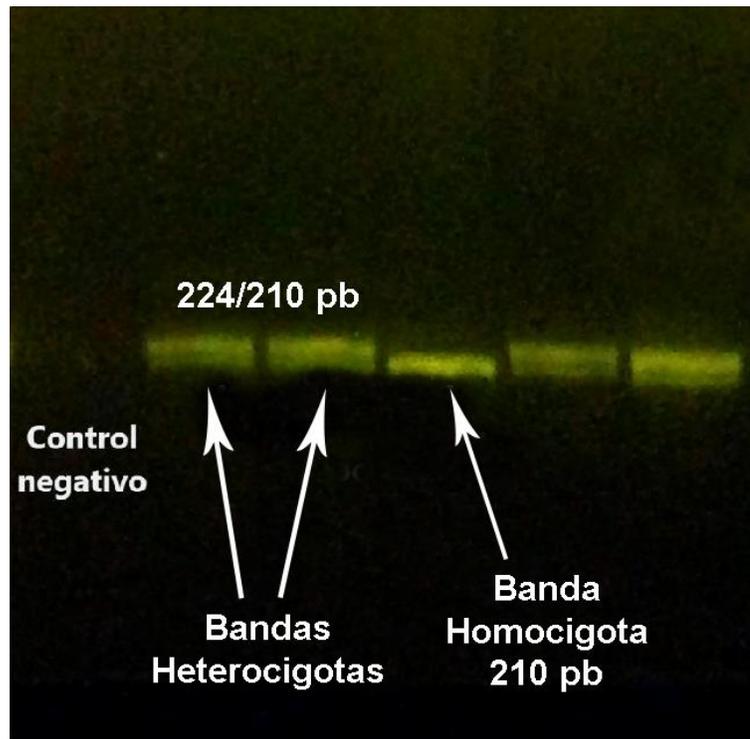
Una vez finalizado el tiempo de corrida electroforética se realizó el revelado de los geles con la ayuda de un transiluminador de luz azul *SafeImager™ 2.0 (Invitrogen, USA)* y se observó los productos amplificados, a los mismos se le sacaron fotografías para el archivo correspondiente.

g) Interpretación de resultados

Según los productos amplificados se obtuvieron 3 posibles formas de amplificación de los amplicones:

- Heterocigoto I/D (inserción/delección) con 210/224 pb
- Homocigoto D/D (delección/delección) con 220 pb
- Homocigoto I/I (inserción/inserción) con 224 pb

Según el tipo de amplificación obtenida se puede indicar si el paciente o los casos poseen o no la inserción o delección de los 14 pb buscados en esta investigación (Fotografía N°1).



Fotografía N°1. Gel de agarosa al 5% con la presencia de los productos amplificados de los casos y controles y control negativo.

h) Evaluación inmunoserológica

Para el análisis de los niveles de autoanticuerpos de los pacientes lúpicos, se utilizó la técnica de ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima) indirecto tipo sándwich, por el cual se midió niveles de anticuerpos IgG e IgM Anti-dsADN por el kit Trinity Biotech, USA.

El procedimiento se realizó siguiendo el protocolo del inserto del kit comercial empleado, se utilizó como material biológico suero de los pacientes lúpicos, en los cuales se encuentran los anticuerpos en estudio, que entran en contacto con los antígenos purificados que se encuentran unidos en la fase sólida de los micropozos. Se dejó en incubación por 30 minutos para luego realizar 3 lavados con solución de lavado, con la finalidad de eliminar el exceso de anticuerpos. Posteriormente, se añadió el conjugado

compuesto por IgG e IgM antihumanas junto con la peroxidasa de rábano picante, estos tienen la capacidad de unión a los complejos antígeno-anticuerpo, se dejó incubar por un lapso de 30 minutos y se realizó 3 lavados para eliminar el exceso de conjugado sobrante. Por último, se añadió el sustrato/cromógeno (H_2O_2 /tetrametilbenzidina) el cual se dejó incubar por 15 minutos, y finalmente parar la reacción enzimática con la solución stop (ácido sulfúrico 1N) que le da una coloración amarilla a la reacción. Se determinó la positividad de las reacciones utilizando un lector de microplacas de ELISA (Bio-TekELX-800NB serie, USA) a 450 nm, utilizando un filtro de referencia de 630 nm.

Posteriormente, con los datos obtenidos se realizaron los cálculos respectivos para evaluar la posible existencia de asociación de los datos con los marcadores genéticos presentes en las muestras estudiadas.

i) Análisis estadísticos

Para el análisis de los datos estadísticos se utilizó el paquete estadístico SSPS 22.0 Versión de prueba, en el cual se pudo obtener todas las frecuencias alélicas y genotípicas.

Para obtener el grado de asociación se utilizó el Odds Ratio (O.R.) y el Chi- cuadrado, utilizando un intervalo de confianza del 95 %.

j) Aspectos éticos

Todos los individuos que se involucraron en el estudio fueron informados de forma verbal y escrita acerca de los fines, objetivos, beneficios y posibles riesgos que implicaba participar en el estudio, para dicho efecto se realizaron exposiciones y/o reuniones con los mismos, donde además de explicarles los procedimientos a realizar en el estudio se aclararon todas las dudas que fueron surgiendo; asimismo, se entregó a cada participante un original de la hoja informativa y como constancia de su aceptación y conformidad se obtuvo de los participantes su consentimiento por escrito y debidamente firmado (anexo N° 1).

En caso de los dos menores de edad incorporados en el estudio, se solicitó la autorización de sus padres o tutores, los cuales mediante firma autorizaron la participación de los menores de edad en el estudio.

IX. RESULTADOS.

En el presente estudio de caso-control se incluyeron 120 pacientes lúpicos, de los cuales 113 eran mujeres (94.1%) y 7 varones (5.8%), con un rango de edad de 11 a 75 años y una media de 37,51 años. Por otra parte, el grupo control estaba conformado por 78 mujeres y 42 varones, siendo un total de 112 controles, con respecto la edad, se encontraban dentro del rango de 20 a 36 años con una media de 28,31.

En cuanto a la procedencia, la mayoría de los individuos involucrados en el estudio eran del departamento de La Paz (95.80%), y un grupo minoritario de los departamentos de Oruro (2.1%) y Potosí (1%), ver tabla N°6.

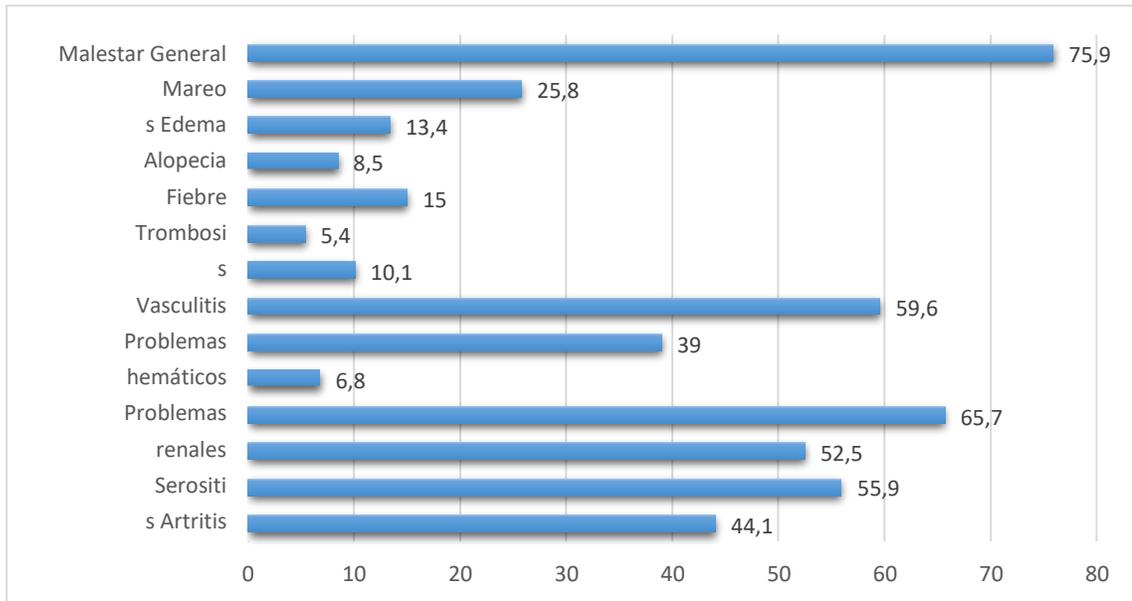
Tabla N° 6 . Datos descriptivos y demográficos de pacientes lúpicos y controles

PARAMETROS CLINICOS	PACIENTES LUPICOS	PACIENTES CONTROLES
Edad (años)	*37 (11-75)	*28 (20-36)
Relación (varón – mujer)	16:1	7:2
DATOS DE PROCEDENCIA		
La Paz	112	107
Oruro	4	3
Potosí	2	1
Santa Cruz	1	1
Extranjero	1	0
Valores		
Anti dsADN (UI/mL)	*105,3	*30.89

* Valor promedio de los datos

Al momento de incorporar a los pacientes al estudio, se les realizó una encuesta clínica, con el fin de conocer los signos y síntomas más relevantes que se presentaron en el transcurso de su enfermedad, obteniendo de esta forma una historia clínica de cada uno de los pacientes (ver anexo N° 3). En la gráfica N° 1 se puede observar con más detalle todos los signos y síntomas que se presentaron de manera más frecuente durante el transcurso de la enfermedad

Grafica N° 1. Signos y síntomas más frecuentes reportados por los pacientes en el transcurso de su enfermedad.



Optimización de las temperaturas óptimas del termociclaje y del Master MIX de preparación de muestras para la PCR que evidencia el polimorfismo de 14 pb del HLA-G.

En la Tabla N° 7 se puede observar las condiciones de la PCR especificadas por C.R. Consiglio (2011) y las modificaciones que se realizaron durante el proceso de optimización de la prueba. Se puede apreciar que, con las condiciones de trabajo propias del laboratorio, al modificar la temperatura de alineamiento se obtuvo productos electroforéticos bien definidos.

Tabla N° 7. Comparación entre las condiciones de temperatura y ciclaje de la PCR propuesta por C.R. Consiglio et al. (2011) y las condiciones de temperatura y ciclaje de la PCR optimizada en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética.

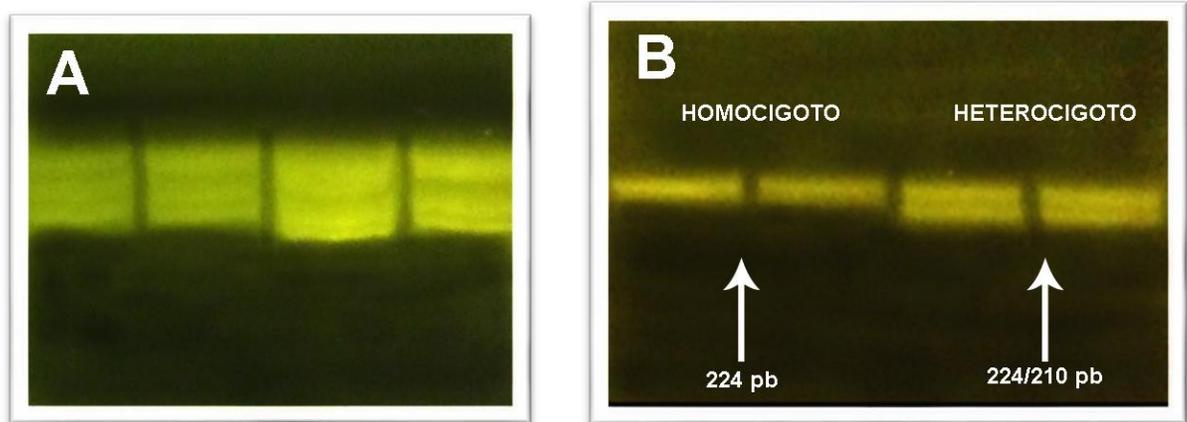
Fases	Condiciones C.R. Consiglio			Condiciones modificadas		
	Temperatur	Tiempo	N° de ciclos	Temperatura	Tiempo	N° de ciclos
Pre calentamiento	94 °C	10 minutos		94 °C	10 minutos	
Desnaturalización	94 °C	30 s	35	94 °C	30 s	35
Alineamiento	64 °C	60 s	35	57.5 °C	60 s	35
Elongación	72 °C	60 s	35	72 °C	60 s	35
Elongación	72 °C	10 minutos		72 °C	10 minutos	

Para poder obtener la temperatura ideal en la fase de alineamiento y obtener los resultados deseados, se realizó un gradiente de temperaturas, con el fin de evaluar a que temperatura se obtenía mejor calidad de productos amplificados, ya que, al emplear las condiciones de termociclado descritas por Consiglio *et al.* (2011) se apreciaba más productos de ADN amplificados que los esperados teóricamente. El gradiente de temperatura que se utilizó estaba en el rango de 50.0 °C a 65 °C con incrementos de temperatura cada 0.3 °C, determinándose que la temperatura ideal era de 57.5 °C y no así la de 64 °C propuesta por C.R. Consiglio *et al.* (2011), ver Fotografía N°2.

Para la preparación de los reactivos utilizados en el Master MIX de la PCR también requirió algunos cambios en el protocolo propuesto por C.R. Consiglio *et al.* (2011), estos cambios incluyeron la modificación de concentraciones y cantidades de la Taq Polimerasa y de los cebadores. Los cambios se observan en la Tabla N° 8.

Tabla N° 8. Comparación entre las concentraciones de preparación del Master MIX propuestas por C.R. Consiglio et al. (2011) y las condiciones del Master Mix optimizadas en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética.

	Condiciones C.R. Consiglio (2011)	Condiciones modificadas
Concentración de ADN	100 ng	100 ng
Reacción de amplificación	25 mL	25 uL
Cebadores	10 pmol	0.5 uM
DNTPs	0.2 mM	0.2 mM
MgCl ₂	1.5 Mm	1.5 mM
Taq polimerasa	0.75 U	0.50 U
Buffer	1 X	1X

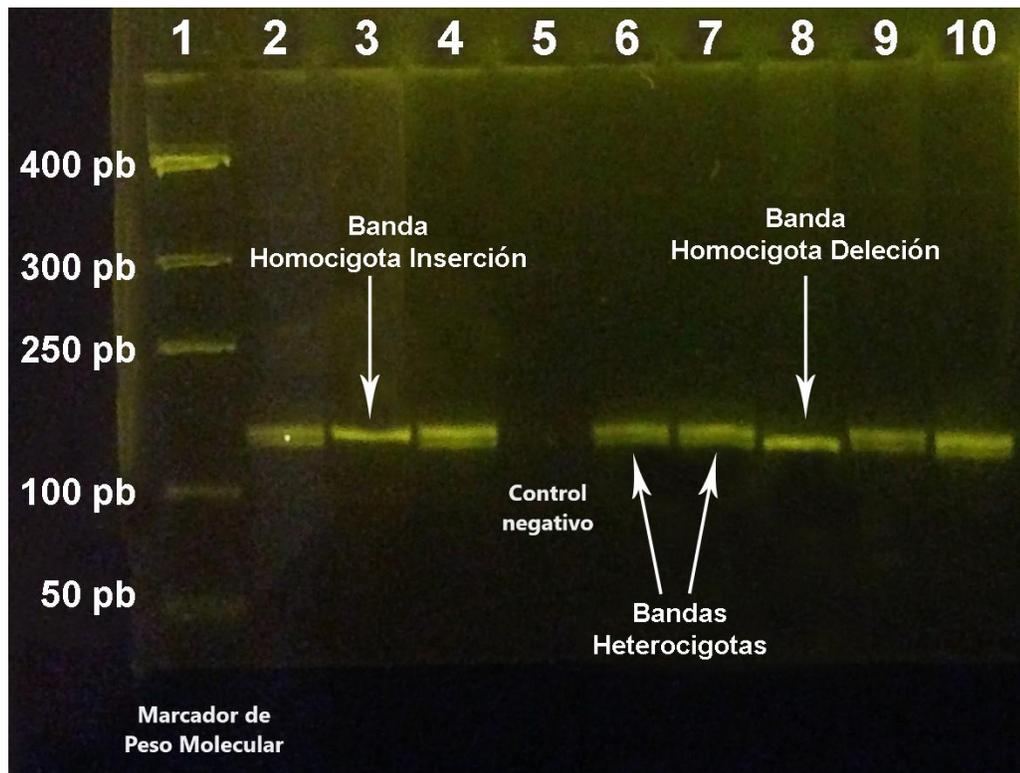


Fotografía N°2. Comparación de corridas electroforéticas de los productos amplificados bajo las condiciones de PCR propuestas en el protocolo de C.R. Consiglio et al. (2011) “A” y el protocolo optimizado en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS “B”.

En la **Imagen A**: Se observa las bandas de ADN obtenidas bajo las condiciones propuestas por *C.R. Consiglio et al. (2011)*, donde se puede apreciar múltiples bandas de ADN, lo que no nos permite diferenciar la presencia de bandas homocigotas y/o heterocigotas a diferencia de la **Imagen B**: en la cual se trabajó con las condiciones

modificadas en el laboratorio, obteniendo de esta forma las bandas homocigotas (con 224 pb) y las bandas heterocigotas (con 210 pb).

Luego de realizar las optimizaciones pertinentes para la PCR, como resultado final se obtiene la electroforesis de ADN en el gel de agarosa al 5% donde se observan los productos amplificados del gen en estudio tanto de los pacientes lúpicos como del grupo control. En la **Fotografía N°3** en el carril 1 de la corrida electroforética el marcador de peso molecular (con un rango de 50 pb a 400 pb), en el pozo número 5 se sembró el control negativo (agua destilada libre de nucleasas), en el cual no se observa ningún producto amplificado, en los pozos 2, 4, 6, 7, 9 y 10 se aprecia las bandas heterocigotas (210 pb- 224 pb), el pozo número 3 muestra una banda homocigota para Inserción (224 pb) y en el pozo 8 se observa una banda homocigota para delección (210 pb).



Fotografía N°3 Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 5% con los productos amplificados del grupo control y pacientes lúpicos bajo las condiciones de PCR optimizadas en el laboratorio de Histocompatibilidad e inmunogenética.

Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo de 14 pb del HLA-G en los grupos control y pacientes lúpicos realizados en el presente estudio

A partir de los datos obtenidos de la PCR se pudo realizar la asignación de los alelos y genotipos del gen HLA-G que presentaron los dos grupos de pacientes estudiados.

En la tabla 8 se comparan las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Ins/Del de un fragmento de 14 pb en el locus HLA-G entre los grupos pacientes o control. Se observa que los pacientes lúpicos tienen mayor frecuencia de expresión del genotipo Ins/Del (50,8%); mientras que, la presencia del genotipo homocigoto Ins/Ins es más frecuente en el grupo control (31,2%). Se observó también que entre pacientes y controles no existe diferencia significativa en la frecuencia de presentación del genotipo Del/Del en homocigosis.

En la tabla N° 9 también se destaca que existen datos significativos con respecto al **polimorfismo heterocigoto Ins/Del** que presenta una asociación significativa de riesgo a LES con un valor de razón de probabilidades (OR) de 1.32 ($p=0,04$), a diferencia del **polimorfismo homocigoto Ins/Ins** que presenta una asociación significativa de protección a LES con un OR de 0.29 ($p=0,00026$)

En cuanto a las frecuencias alélicas, se puede evidenciar que el alelo de Delección es más frecuente en el grupo de los pacientes lúpicos (62,9%), a comparación del grupo control en el que ambos alelos se presentaron en el mismo porcentaje (50%). Se puede observar también, que en el grupo control el alelo Ins es más frecuente que en el grupo de casos. Por lo que respecta al **alelo Delección**, este presenta una asociación significativa de riesgo a LES con un **OR de 1.70 ($p=0,005$)**, a diferencia del **alelo Inserción** que presenta una asociación significativa de protección a LES con un OR de 0.59 ($p=0,005$)

Tabla N° 9. Frecuencias genotípicas, alélicas, Odds Ratio (OR) y Chi cuadrado (X²) obtenidos para la asociación del polimorfismo del Locus HLAG entre pacientes - controles y la posible susceptibilidad a LES

Polimorfismo genotípico y alélico HLA-G	Pacientes		Controles		OR(IC)*	Chi-cuadrado	
	N=120	%	N=112	%		Valor	Valor-p
Del/Del	45	37,5	35	31,2	1,32 (0,77 – 2,27)	1,00	0,31691
Ins/Del	61	50,8	42	37,5	1,72 (1,02 – 2,91)	4,17	0,04110
Ins/Ins	14	11,7	35	31,2	0,29 (0,15 – 0,58)	13,34	0,00026
Alelo Del	151	62,9	112	50,0	1,70 (1,17 – 2,46)	7,87	0,00502
Alelo Ins	89	37,1	112	50,0	0,59 (0,41 – 0,85)	7,87	0,00502

*OR(IC)= Odds ratio (Intervalo de Confianza)

Por otra parte, en el presente estudio se buscó establecer la existencia una posible asociación entre las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo del HLA-G con las manifestaciones clínicas reportadas por los pacientes lúpicos, los resultados de este análisis se pueden observar en la tabla N° 10.

En la tabla N° 10 se resalta al **polimorfismo Ins/Del** como un factor de riesgo para las **manifestaciones dermatológicas**, ya que este presenta un OR de 8,64 (p= 0,001), contrariamente se observa que los **polimorfismos Del/Del e Ins/Ins** son factores de protección para los pacientes lúpicos por el valor de sus OR de 0.25 y 0.30 respectivamente.

Las **manifestaciones hematológicas** asocian al **polimorfismo Del/Del** como factor de riesgo, ya que presenta un valor de OR de 2,75 y el **polimorfismo Del/Ins** vendría a ser un factor de protección con un OR de 0,43.

En lo que respecta a las demás manifestaciones clínicas frecuentemente reportadas por los pacientes, no se encontraron datos de asociación o protección estadísticamente significativos.

Tabla N° 10. Asociación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo HLA-G de pacientes lúpicos con las manifestaciones clínicas reportadas en el transcurso de su enfermedad.

Polimorfismo		Alelo Presente			Chi-cuadrado			
Manifestaciones clínicas	HLA-G	Clínica presente	Clínica ausente	Odds Ratio	I.C. bajo 95%	I.C. alto 95%	Valor	Valor-p
Renales	Del/Del	12	30	2,22	0,88	5,61	2,91	0,0880
	Ins/Del	8	48	0,48	0,18	1,24	2,37	0,1236
	Ins/Ins	3	23	0,90	0,23	3,47	0,02	0,8782
Dermatológicas	Del/Del	8	38	0,25	0,10	0,60	10,1	0,0014
	Ins/Del	29	16	8,64	3,68	20,3	24,4	0,0000
	Ins/Ins	5	24	0,30	0,11	0,87	5,30	0,0213
Hematológicas	Del/Del	18	25	2,75	1,21	6,22	6,04	0,0140
	Ins/Del	12	46	0,43	0,19	0,98	4,38	0,0364
	Ins/Ins	4	15	0,63	0,19	2,06	0,59	0,4427
Cardiopulmonares	Del/Del	5	47	0,93	0,28	3,11	0,02	0,9023
	Ins/Del	4	36	1,00	0,28	3,54	0,00	1,0000
	Ins/Ins	3	28	0,99	0,25	3,91	0,00	0,9862

X. DISCUSION

El lupus eritematoso sistémico es considerado una enfermedad de alta complejidad, su etiología varía según la interacción de múltiples factores sean estos ambientales y genéticos u hormonales, lo que condiciona su amplio espectro de manifestaciones clínicas e inmunológicas.

Como en todas las enfermedades multifactoriales, para poder realizar la identificación de los genes involucrados como factores de riesgo o susceptibilidad en LES, se han utilizado principalmente los estudios de: ligamiento, asociación y expresión, que involucran la identificación de polimorfismos genéticos que asocian un determinado gen con la fisiopatología de la enfermedad. Hasta el año 2012, los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS), habían identificado más de 60 loci genéticos como potenciales factores de susceptibilidad a LES, pero una gran proporción de la contribución genética a la susceptibilidad a LES aún permanece desconocida (Velázquez-Cruz, y otros, 2012). Dentro de los cuales se encuentran los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad, particularmente los antígenos HLA DR3, DR4 y B8 han sido los más relacionados con la susceptibilidad a LES. (Acosta ColmánI, y otros, 2016)

Usando la información colectiva de muchos polimorfismos de nucleótido único (SNP) ha sido posible identificar nuevos genes asociados a la enfermedad, un estudio realizado en Suecia, estudio 134.523 SNPs ubicados en 12.500 genes relacionados con el sistema inmunitario en 1.160 pacientes lúpicos y 2.711 casos control, donde obtuvieron como resultados 40 genes que confieren riesgo para LES y 12 de estos genes estaban asociados con otras enfermedades autoinmunes (Carlsson Almlöf, y otros, 2017)

1. Datos descriptivos y demográficos

a) Predominio según el género

Mediante el análisis de los datos descriptivos de la población estudiada en el presente trabajo, se pudo evidenciar que existe un predominio del sexo femenino en los casos con

LES, lo cual tiene una gran similitud con datos reportados por diferentes estudios, disponibles en la bibliografía internacional, la cual en general indica que hasta el 90% de los casos de LES corresponde a mujeres en edad fértil (Enríquez- Mejía, 2013), en el presente estudio el 94,1% de los pacientes estudiados eran mujeres siendo la relación mujer: varón de 16:1. Sin embargo, existen estudios que indican que si bien la enfermedad es menos frecuente en varones, el LES podría ser mucho más severo en el hombre, y que se aprecia que a partir de los 50 años la proporción de hombres y mujeres con lupus cambia, pasando a ser un 75% de mujeres con lupus y un 25% en hombres (frente al 10% de varones antes de los 50 años). (Molly's fund fighting LUPUS, 2012).

b) Edad de inicio

Se pudo observar que la edad promedio de incidencia de la enfermedad en la muestra estudiada es de 37 años (11 – 75 años). Esto difiere de la media de edad reportada en otras poblaciones, en España y en el Reino Unido se han reportado que las edades medias de aparición de la enfermedad son 46.1 ± 19.6 años 47.3 ± 16.4 años respectivamente.

Varios estudios han mostrado que los patrones de incidencia de LES en mujeres europeas son diferentes en los observados en afroamericanas. El pico de incidencia de un estudio realizado en Grecia reflejó que el grupo de pacientes con la enfermedad se encontraba entre los 30 y 49 años, mientras que en otro estudio realizado en el Reino Unido basado en el “*General Practice Research Database*” muestra que la tasa de incidencia más alta asociada a la edad fue observada en individuos mayores de 40 años con picos de incidencia a los 50-54 años para mujeres y 70-74 años para hombres. (Somers EC, Smeeth L, & AJ, 2007).

Estudios realizados en Paraguay reflejaron que la edad promedio del inicio de la enfermedad es de 38.8 años (Melgarejo Paniagua, Denis Doldán, Ferreira Gaona, & Díaz Reissner, 2015). Comparando los resultados mostrados en población argentina, donde mostraron que la edad promedio es de 26 ± 5 años (Bellomio, y otros, 2010)

Como se puede apreciar en los párrafos precedentes tanto los datos del presente estudio como los de estudios realizados en otros grupos poblacionales, se confirma que la enfermedad se presenta preferentemente en mujeres en edad fértil.

2. Datos clínicos

Con respecto a los datos clínicos y de laboratorio realizados en los pacientes que participaron del presente estudio se pudo realizar una comparación de las manifestaciones clínicas y serológicas características de la muestra de pacientes estudiados en comparación a otros estudios.

a) Anticuerpos anti-ADN

Los anti-ADN son claves en el diagnóstico y el seguimiento del LES. Están presentes en el 70% de los pacientes, siendo la positividad de este anticuerpo un criterio de clasificación (ACR, SLICC) para el diagnóstico de LES. Su especificidad y sensibilidad alcanza el 95%-97% respectivamente.

De todos los pacientes involucrados en el presente estudio el 85% (96 pacientes) presentaron niveles elevados de anticuerpos anti-ADN ($>$ a 46.2 UI/mL), comparando con un estudio realizado en Colombia donde el 79.1% de los pacientes (total de 115 pacientes) presentaron niveles elevados de dicho anticuerpo (Severiche Maury, Restrepo Escobar, González Naranjo, & Vanegas García, 2014), mientras que, en un estudio realizado en la Habana-Cuba se evidencia que los anti dsADN se presentaban en 84 de 180 pacientes (46.7%), y que se apreciaba que el anticuerpo anti-Nucleosoma se encontraba con mayor frecuencia (135/180, 75.0%) (Kokuina, y otros, 2015).

Estas diferencias en el porcentaje de anti-ADN pueden ser muy comunes, ya que el anti-ADN se va encontrar elevado cuando el paciente está cursando por una exacerbación en su etapa de la enfermedad, por lo que los niveles de anti-ADN pueden bajar cuando el paciente no cursa por dichas etapas, o pueden estar en función del tratamiento que recibe el paciente al momento de la toma de muestra.

b) Manifestaciones clínicas

El LES es una enfermedad crónica, caracterizada por fases de actividad o brotes, y periodos de quiescencia o de menor actividad. Debido a su gran variabilidad y heterogeneidad, no existe un patrón clínico definido, lo que ocasiona que el diagnóstico inicial de la enfermedad sea dificultoso.

Se puede describir, de forma un tanto simplista, un inicio característico con astenia, artralgias, eritema malar, síndrome febril variable, pérdida de peso, malestar general, cefalea y otras manifestaciones potenciales, como dolor pleurítico, dolor abdominal, nefritis lúpica, sobre todo en mujeres jóvenes. (Wallace & Hannahs Hahn, 2013).

En la gráfica N° 1 se observa que los signos y síntomas más frecuentemente reportados por los pacientes en el transcurso de su enfermedad fueron: malestar general (75.9%), artritis (65.7%), problemas hemáticos (59.6%), úlceras orales (52.5%), eritema malar (44.1%) y problemas renales (39%). En una mayoría de los casos la afección inicial fue multisistémica (más de un signo o síntoma clínico a la vez), lo que dificultó su diagnóstico inicial.

En un grupo de 1000 pacientes europeos las principales manifestaciones clínicas al inicio y durante la evolución de la enfermedad fueron: eritema malar, lesiones discoides, lesiones cutáneas subagudas, fotosensibilidad, aftas orales, artritis, serositis y problemas renales. (Gómez-Puerta & Cervera, 2008)

Realizando una comparación con los datos presentados en las diferentes poblaciones, se puede indicar de manera estadísticamente significativa que la población con la que se trabajó en el presente estudio, comparte un porcentaje de características clínicas similares (85%) a las poblaciones colombianas, cubanas y europeas, siendo las más comunes los síntomas articulares (60.2%), mococutáneos (40.1%), renales (42.3%) y la serositis (10.1%).

3. Optimización de la PCR que evidencia el polimorfismo de 14 pb del gen HLA-G

En el proceso de optimización de la PCR, al tomar como base de trabajo las condiciones propuestas por *C.R. Consiglio (2011)* para realizar la asociación genética del polimorfismo de 14 pares de bases en el HLA-G con el LES, se observó que la electroforesis de los amplicones mostraba productos inespecíficos. Por tal motivo se hizo una serie de cambios al protocolo propuesto por Consiglio como ser: condiciones de termociclaje y preparación del Master MIX *para la PCR (Tabla N° 7)*.

a) Modificación del Master MIX

Los cambios realizados en el Master MIX fueron: cambio en la concentración de cebadores de 10pmol propuesta por Consiglio a 0.5 uM. Si bien Consiglio recomendaba utilizar una concentración de Taq ADN polimerasa de 0.75 U, en el presente estudio determinó que lo óptimo era utilizarla a una concentración de 0.5 U. Ver tabla 3. Estos cambios permitieron obtener bandas de los productos amplificadas bien definidas y se eliminó la presencia de otras bandas inespecíficas.

Para evaluar la concentración óptima de ADN se añadieron diferentes cantidades de ADN (20 ng, 10 ng y 5 ng) al MASTER Mix para un volumen final de 25 uL en el tubo de reacción. La concentración de ADN constituyó un factor crítico en la eficiencia de la amplificación, pues la obtención de resultados no reproducibles con mayor cantidad de ADN demostró que dicho exceso en el tubo de reacción puede dar lugar a las uniones inespecíficas de los cebadores y una fuerte fluorescencia en las bandas electroforéticas. Por lo que se utilizó un volumen final de 10 µL de ADN en el tubo de reacción con rangos de concentración promedio de 80 a 100 ng/µL.

b) Evaluación de las temperaturas de termociclaje

Durante el proceso de optimización de la PCR también se consideró establecer la

temperatura óptima de la fase de alineamiento (56.3 °C, 57.5 °C y 58.1 °C) observándose que a 57.5 °C y con las concentraciones ya mencionadas del Master Mix se obtenían las bandas de PCR bien definidas.

En la fase de alineamiento el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde, para lo cual es necesario una temperatura de 40 a 68 °C durante 20-40 segundos (según el caso) permitiendo así el alineamiento. Las temperaturas específicas de alineamiento en este rango van a depender de la secuencia de la cadena de ADN.

En PCRs muy específicos en los que se amplifica una o dos bandas es importante elegir una temperatura óptima de alineamiento que sea la correcta y asegure que el gen que se amplifica es realmente el correcto. Si la temperatura que se utiliza en esta fase no es tan específica podemos obtener poca reproducibilidad ya que el oligo se pegara en cualquier parte al azar y no solamente en los sitios que son complementarios lo que hará que se amplifiquen otras regiones genéticas además de la de interés. Si la temperatura de alineamiento es muy baja, obtendremos un PCR menos específico, y si es muy alta, la especificidad será mayor (aunque si es demasiado alta no se amplificara nada, pues la unión de los oligonucleótidos con sus sitios complementarios será poco estable y la polimerasa no podrá iniciar la síntesis). (Espinosa Asuar, 2009)

4. Asociación de los alelos y genotipos HLA-G con lupus eritematoso sistémico.

La susceptibilidad individual en autoinmunidad puede estar determinada por una combinación de polimorfismos específicos de genes que codifican para múltiples citosinas, antígenos del complejo principal de histocompatibilidad, moléculas de adhesión, y proteínas celulares. Esta condición puede conducir a la expresión anormal de moléculas inmunoreguladoras y finalmente resultar en el desarrollo o exacerbación de la enfermedad autoinmune. (Valencia & Ramsés, 2004)

Los resultados del presente estudio reflejaron que los pacientes lúpicos tenían mayor expresión del *genotipo Ins/Del (heterocigosis) (50.8%)*, a diferencia del grupo control,

en la cual la presencia de los genotipos homocigotos Ins/Ins (31.25%) y Del/Del (31.25%) eran los más frecuentes. En cuanto al polimorfismo a nivel de alelo, se pudo destacar entre los pacientes lúpicos, que el **alelo delección** es más frecuente que el alelo de inserción, mientras que el grupo control, ambos alelos se expresaron en la misma frecuencia.

Demostrándose de esta forma que el **polimorfismo heterocigoto Ins/Del** presenta una asociación significativa de riesgo a LES en nuestra población estudiada con un **OR de 1.32**, al igual que el **alelo de delección**, que se muestra como alelo de riesgo con un **OR de 1.70**, a diferencia del **alelo Inserción** que presenta una asociación significativa de protección a LES con un **OR de 0.59**.

Según los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede determinar el alelo delección es el alelo asociado como factor de riesgo a LES, a diferencia de los demás estudios mencionados anteriormente, en los cuales el alelo asociado a susceptibilidad a LES es el alelo de Inserción.

Los estudios realizados por C.R. Consiglio en población brasileña estudiaron la posible susceptibilidad que existe con el polimorfismo de 14 pb de inserción/delección y LES. Donde se evaluó un grupo de 195 pacientes lúpicos frente a un grupo control compuesto por 122 individuos. Observándose que el grupo de pacientes lúpicos presentaba un exceso de heterocigosis (Ins/Del) de 59.3%, un 26% presento el genotipo Del/Del y un 15% el genotipo Ins/Ins. A diferencia del grupo control que presentó un 50% de heterocigosis, 33% del alelo Del/Del y un 17% del alelo Ins/Ins. Sin encontrar ningún resultado estadísticamente significativo con respecto a los genotipos, sin embargo, Consiglio y colaboradores, observaron un ligero aumento del alelo Inserción en pacientes lúpicos frente al grupo control.

Por otra parte, el estudio realizado por C.R. Consiglio, tuvo un impacto más grande, ya que se estudió, además, el polimorfismo de un solo nucleótido en la posición +3142 y su posible unión a sitios de microARN. Obteniendo de esta forma resultados más concretos

con polimorfismos de la región 3'UTR del HLA-G y la susceptibilidad a LES. Este último polimorfismo no se realizó en el presente estudio.

Así mismo se informaron resultados contradictorios con respecto al polimorfismo de 14 pb en la región 3'UTR del HLA-G ya que, un estudio realizado por Rizzo *et al* donde evaluó 200 pacientes lúpicos italianos frente a 451 controles, en el cual reportaron diferencias significativas en la distribución del polimorfismo de 14 pb en HLA-G entre pacientes lúpicos y el grupo control. Se observó un número significativamente mayor del genotipo Ins/Ins en el grupo de pacientes lúpicos con una frecuencia concurrente disminuida del genotipo Del/Del.

Sin embargo, Rizzo y colaboradores propusieron que debido a la presencia de la inserción de 14 pb en la región 3' UTR del gen HLA-G, parece ser responsable de la inestabilidad de los ARNm lo que dará lugar a la expresión del HLA-G específicos y la consecuente disminución de la producción de proteínas, por lo que especulan si la población de pacientes con LES se caracteriza por una mayor frecuencia de sujetos con una producción disminuida genéticamente determinada de la molécula anti inflamatoria e inmunoreguladora de HLA-G. (Rizzo, y otros, 2008)

Al igual que el trabajo realizado por Wu *et al* que describió una falta de asociación entre el polimorfismo Ins/Del de 14 pb en la región no traducida 3' del gen HLA-G en LES en pacientes chinos.

Un estudio piloto realizado en Brasil, analizó la expresión del polimorfismo de 14 pb Ins/Del del gen HLA-G en pacientes en el inicio de la infancia, se evaluó a 50 pacientes con LES y 144 casos control, obteniendo los siguientes resultados: el **58%** de los pacientes lúpicos presentó el **genotipo Ins/Del** al igual que el grupo control, donde en 71 individuos sanos (49.3%) de 144 presentaron este genotipo con mayor frecuencia, y la frecuencia de **genotipo Ins/Ins (6%)** y del **alelo Inserción (35%)** fue mucho menor tanto en pacientes como en el grupo control que presento un 17% del genotipo y un 42% del alelo.

Por lo que el estudio mostro que no existe ninguna asociación significativa con lo que respecta a las frecuencias de alelos y genotipos entre ambos grupos estudiados. (Cavalcanti, Donadi, Lucena-Silva, Almeida, & Mesquita, 2017), ellos concluyeron también que los resultados obtenidos pueden deberse al pequeño número de pacientes lúpicos involucrados en el estudio.

La transcripción del gen HLA-G que incorpora la secuencia de 14 pb (Inserción) puede someterse a una etapa de corte y empalme adicional que elimina 92 bases de la región en la que está localizada esta secuencia. Se cree que esta delección influye en la estabilidad del mRNA ya que, después de evaluar estos transcritos HLA-G que carecen de estas 92 bases mostraron ser más estables que los mRNA “completos” en células placentarias. (Rousseau, y otros, 2003)

Por otro lado, varios estudios han informado repetidamente sobre la asociación del alelo inserción con niveles más bajos de HLA-G soluble, e incluso la falta de expresión de HLA-G detectable en el plasma de individuos homocigotos para el alelo inserción. (Hviid, Hoeg, Kruse, & Christiansen, 2002) Curiosamente también se describió que el polimorfismo de 14 pb Ins/Del radica en una región que es un sitio de unión putativo para muchos microARN que contribuyen al control de la expresión de HLA-G. (Veit & Chies, 2009) Sin embargo, es evidente que el efecto neto de los microARNs en la expresión de HLA-G es muy difícil de determinar, ya que los perfiles de microARN pueden variar sustancialmente entre los tejidos y los estados biológicos (Rousseau, y otros, 2003).

Los resultados de estos estudios nos hacen pensar que los pacientes que en su genotipo portan el alelo Inserción tienen niveles bajos de HLA-G, lo cual afecta afectan a las funciones reguladoras de esta proteína sobre ciertas células del sistema inmune, como ser: la inhibición de la actividad citotóxica de los linfocitos T y NK, la inducción de la apoptosis de las células T CD8 activadas y NK, lo cual, al desencadenarse la enfermedad por medio de un factor ambiental y verse el sistema inmune comprometido este no puede ser regulado de forma adecuada. De esta manera podría explicarse la asociación entre la presencia del alelo Ins/Del.

5. Asociación de las frecuencias genotípicas HLA-G del grupo de pacientes lúpicos con manifestaciones clínicas que presentaron

Después de evaluar el papel del polimorfismo en la región 3'UTR del HLA-G con susceptibilidad a LES, se evaluó, si alguno de los genotipos y/o alelos se asocia como factor de riesgo a manifestaciones clínicas observadas en los pacientes que participaron en el estudio. Los pacientes se estratificaron según presentaron o no un determinado parámetro clínico, esto con el fin de encontrar alguna asociación genética que nos brinden información acerca de las complicaciones clínicas que puedan presentarse en los pacientes.

Los resultados del presente estudio mostraron que los principales factores de riesgo a padecer manifestaciones hematológicas en los pacientes lúpicos son el genotipo Del/Del. Haciendo una comparación con bibliografía internacional, los datos se correlacionan con los hallazgos hechos por Rizzo et. quien también reportó que los pacientes homocigotos para el alelo delección reportaron de manera frecuente afección hematológica y presentaron niveles plasmáticos más bajos de sHLA-G en comparación con los pacientes que no presentaron afección hematológica.

Dado que las principales manifestaciones hematológicas se deben a anticuerpos anti-plaquetarios y anti-eritrocitarios, y que el HLA-G muestra un efecto inhibitor sobre los linfocitos B, se cree que la baja concentración de sHLA-G en pacientes con síntomas hematológicos favorece la producción de los autoanticuerpos mencionados anteriormente, lo cual predispone a sufrir manifestaciones hematológicas en pacientes con LES. (Rizzo, y otros, 2008).

Con respecto a las manifestaciones dermatológicas se demostró en nuestro estudio, que el genotipo heterocigoto Ins/Del representa un factor de riesgo, en general este grupo de pacientes reportaron presentar signos de eritema malar y fotosensibilidad al inicio del estudio.

En el estudio realizado por Cavalcanti, Donadi, Lucena-Silva, Almeida, & Mesquita

(2017) en pacientes brasileños a los cuales se les diagnosticó LES en la infancia, se evidenció que el alelo de delección y el genotipo Del/Del muestra asociación con nefritis lúpica. Afirman también que no existía ningún estudio que evalúe la expresión de sHLA-G en tejidos de biopsia renal en pacientes con LES para poder explicar si existe un aumento de producción de HLA-G para suprimir la actividad del sistema inmune local. Por lo que se necesitan estudios que además de medir los polimorfismos de este gen midan sus niveles de expresión en pacientes lúpicos con y sin actividad de la enfermedad.

En nuestro caso, lo que se evidenció en los resultados, fue que el alelo Inserción se presenta como factor de protección para asociación con manifestaciones renales.

De los tres estudios (dos en adultos y uno en niños y adolescentes) llevados a cabo en el Noreste de Brasil, se obtuvieron hallazgos diversos independientemente de la asociación de los alelos y genotipos con la enfermedad y sus manifestaciones clínicas, estos hallazgos sugieren que HLA-G está poco involucrado en la predisposición a LES, confirmando una ligera asociación entre el alelo de inserción de 14 pb y la susceptibilidad a LES. Uno de los estudios especula que HLA-G ejerce una función mayor en la predisposición a LES en adultos que en niños y adolescentes. Recientemente se ha demostrado que algunos genes presentan una asociación con la edad de inicio de la enfermedad que podría ser el caso de HLA-G. (Cavalcanti, Donadi, Lucena-Silva, Almeida, & Mesquita, 2017).

XI. CONCLUSIONES

Se optimizó la prueba de PCR para la identificación de la inserción o delección de un fragmento genético de 14 pb en la región 3`UTR del gen que codifica la proteína HLA-G para la determinación de la posible asociación con LES.

Mediante el análisis minucioso de la información recabada de la encuesta clínica que se realizó a cada uno de las pacientes que participaron en el presente trabajo de investigación, se pudo conocer que los signos y síntomas más frecuentes que padecen los pacientes durante su enfermedad son: malestar general, artritis, problemas hematológicos, fotosensibilidad, úlceras orales y eritema malar, otros síntomas poco frecuentes como ser: mareos, edema, fiebre, trombosis, vasculitis, serositis y alopecia.

Dentro de las características sociodemográficas de la población estudiada en la ciudad de La Paz, se determinó que el género femenino es el más afectado en una relación 16:1 con respecto a varones y que en el 94.1% de los casos se presentaba en una edad reproductiva.

Al realizar la comparación de la frecuencia de genotipos y alelos del HLA-G de los pacientes lúpicos frente al grupo se concluye lo siguiente:

- Los pacientes que porten el genotipo heterocigoto (Ins/Del) o el alelo delección tienen mayor probabilidad de padecer LES que los pacientes que no presentan el genotipo y alelo antes mencionado.
- Los pacientes que porten el genotipo Ins/Ins tienen menos probabilidad de padecer LES ya que este alelo es un factor de protección a LES.

Con respecto al análisis entre de las manifestaciones clínicas y el polimorfismo de HLA-G se concluye lo siguiente:

- El genotipo heterocigoto (Ins/Del) es un factor que predispone 9 veces más al riesgo de padecer afecciones dermatológicas en los pacientes con LES. A diferencia de los genotipos homocigotos (Del/Del; Ins/Ins) que muestran ser un factor de

protección frente a esta manifestación clínica.

- El genotipo homocigoto (Del/Del) es un factor de riesgo que triplica el riesgo a sufrir manifestaciones hematológicas.
- En las manifestaciones renales y hematológicas el alelo inserción cumple una función protectora.
- En lo que respecta a las condiciones serológicas, se demostró que el 85% de los pacientes presentaban niveles elevados de anticuerpos anti-dsADN, siendo esta una característica frecuente de pacientes lúpicos que se encuentran en etapa de enfermedad activa. Se evidenció, además, que el 100% de pacientes con el genotipo heterocigoto Ins/Del tenían niveles elevados de anticuerpos anti-dsADN, (> 46,1 UI/mL).

Como conclusión general se establece que en población boliviana en general (dado el mestizaje) y en población paceña en particular el polimorfismo Ins/Del de un fragmento de 14 pb en la región 3'UTR del gen que codifica para la proteína HLA-G, es un factor de riesgo genético a padecer LES y a sufrir afecciones dermatológicas y hematológicas cuando el paciente presente los genotipos Ins/Del y Del/Del respectivamente.

XII. RECOMENDACIONES

Al momento de realizar el presente estudio se pudo evidenciar que nuestras instituciones de salud (dependientes de la alcaldía, gobernación y el estado) no cuentan con información sobre los factores de riesgo, prevalencia e incidencia, y métodos de diagnóstico tempranos para la detección del LES. Al no contar con datos epidemiológicos oficiales de la enfermedad, resulta difícil realizar estudios que nos aporten cifras específicas de la incidencia y/o prevalencia del LES en nuestro país.

Los datos del presente estudio brindan un aporte significativo a nivel estadístico y genético, los hallazgos reportados pueden servir para aplicar medicina predictiva en pacientes con riesgo a padecer la enfermedad o que ya padecen la enfermedad.

Por lo tanto, se recomienda seguir realizando estudios en el campo de la inmunogenética que permitan encontrar genes con elevados valores de factor predisponente de riesgo (Odds ratio, riesgo relativo, etc.) que permitan predecir el riesgo a padecer LES o que con un alto nivel de confianza predigan que órgano o sistema en el paciente va a ser afectado producto de la enfermedad.

XIII. BIBLIOGRAFIA

- Acosta Colmán I, I., Avila, G., Acosta, M. E., Aquino, A., Centurión, O., & Duarte, M. (2016). Manifestaciones clínicas y laboratoriales en el Lupus Eritematoso Sistémico-LES. Scielo.
- Agmon-Levin, N., Damoiseaux, J., Kallenberg, C., Sack, U., Witte, T., Herold, M., Wiik, A. (2014). International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis*, 17-23.
- Aguilera, A. (2005). Cotranscriptional mRNP assembly: from the ADN to the nuclear pore. *Curr Opin Cell Biol*, 242–250.
- Aifen, L., & Wei-Hua, Y. (2015). Expresión del antígeno leucocitario humano-G (HLA-G) en los cánceres: funciones en la evasión inmune, metástasis y objetivo para la terapia. *Molecular Medicine*.
- Alfonso, M. E. (2009). HLA-G: ¿molécula inductora de inmunotolerancia? Scielo.
- Anaya, J. M., Tobón, G. J., Pineda-Tamayo, R., Fond, J., & Cervera, R. (2005). Lupus Eritematoso Sistémico. En J.-M. Anaya, Y. Shoenfeld, P. A. Correa, M. García-Carrasco, & R. Cervera, *Autoinmunidad y Enfermedad Autoinmune* (págs. 255-274). Medellín: Corporación para investigaciones biológicas.
- Anaya, JM y Col. (2008). *Autoinmunidad y Enfermedad Autoinmune*. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas.
- Anthony Nolan Research Institute. (14 de enero de 2015). hla.org. Recuperado el 18 de enero de 2015, de hla.org: <http://www.hla.org>
- Arbuckle, M. R., McClain, M. T., Rubertone, M. V., Hal Scofield, R., Dennis, G. J., James, J. A., & Harley, J. B. (2003). Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. *The New England Journal of Medicine*, 1526-1533.
- Aringer, M., Dorner, T., Leuchten, N., & Johnson, S. (2016). Toward new criteria for systemic lupus erythematosus—a standpoint. *LUPUS*, 805-811.

- Barañao, R. I. (2009). Hormonas sexuales y respuesta inmunologica. Saegre.
- Barrios, L. L., Valdés, D. M., García, D. C., García, D. M., Hernández, L. A., & Díaz, D. R. (2012). Antígenos de histocompatibilidad HLA-G y embarazo. BVS-Salud.
- Bellomio, V., Berman, A., Lucero, E., Peñalba, A., Santana, M., Maldonado Cocco, J., Rivero, R. (2010). Ciclofosfamida (CIC) en lupus eritematoso sistémico (LES): dosis acumulada y eventos adversos. Estudio multicéntrico. Revista Argentina de Reumatología.
- Bermudez Marrero, M., Vizcaino Luna, Y., & Dermudez Marrero, W. (2017). Lupus Eritematoso Sistémico. Medigraphic, 1-14.
- Biesen, R., Rose, T., Hoyer, B., Alexander, T., & Hiepe, F. (2016). Autoantibodies, complement and type I interferon as biomarkers for personalized medicine in SLE. *Lupus*, 823-829.
- Blotzer, J. (1983). Systemic lupus erythematosus I: historical aspects. NCBI.
- Boletín epidemiológico. (21 al 27 de Julio de 2013). Obtenido de www.epidemiologia.salud.gob.mx:
- Boumpas, D., Fessler, B., Austin, H., Balow, J., Klippel, J., & Lockshin, M. (1995). Systemic lupus erythematosus: emerging concepts. Part 2: Dermatologic and joint disease, the antiphospholipid antibody syndrome, pregnancy and hormonal therapy, morbidity and mortality, and pathogenesis. *Ann Internal Medical*, 42-53.
- Boyson, J. E., Erskine, R., Whitman, M. C., Chiu, M., Lau, J. M., & Koopman, L. A. (2002). Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface. *PNAS*, 16180–16185.
- Calvo Alen, J. (2012). LES, criterios SLICC: que aportan y cuales los diferentes previstos. Hospital Universitario Sierrallana.
- Carlsson Almlöf, J., Alexsson, A., Imgenberg-Kreuz, J., Sylwan, L., Bäcklin, C., Dag, L., Jönsen, A. (2017). Novel risk genes for systemic lupus erythematosus predicted by random forest classification. *Nature Scientific Report*.
- Carmen Luz Navarrete S, C. I. (2008). Rol de la Apoptosis en la Fisiopatología del Lupus. *Revista Chilena de Reumatología*.

- Cavalcanti, A., Donadi, E., Lucena-Silva, N., Almeida, R., & Mesquita, Z. (2017). Gene polymorphism and HLA-G expression in patients with childhood-onset systemic lupus erythematosus: A pilot study. *HLA Immune Response Genetic*, 219-227.
- Chen, Y. A. (2008). The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. *Journal compilation*, 335 - 341.
- Chen, H., Moreau, P., & Donadi, E. (2015). The Role of HLA-G Molecule and HLA-G Gene Polymorphisms in Tumors, Viral Hepatitis, and Parasitic Diseases. *US National Library of Medicine*.
- Costa-Reis, P., & Sullivan, K. (2013). Genetics and epigenetics of systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep*, 369.
- Cozzani, E., Drosera, M., Gasparini, G., & Parodi, A. (2014). Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects. *Autoimmune Diseases*.
- Cui, Y., Sheng, Y., & Zhang, X. (2013). Genetic susceptibility to SLE: recent progress from GWAS. *J Autoimmun*, 25-33.
- Deng, Y., & Tsao, B. (2014). Advances in lupus genetics and epigenetics. *Curr Opin Rheumatol*, 482-492.
- Donadi, E. A., Castelli, E. C., Arnaiz-Villena, A., Roger, M., Rey, D., & Moreau, P. (2011). Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 369–395.
- Egner, W. (2000). The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *Journal of Clinical Pathology*, 424-432.
- Enriquez-Mejia, M. (2013). Fisiopatología del Lupus Eritematoso Sistémico. *Revista Médica e Investigación*, 8-16.
- Espinosa Asuar, L. (2009). Herramientas Moleculares. En L. E. Eguiarte, L. Espinosa Asuar, & V. Souza, *Ecología Molecular*. Mexico D.F: Comisión Nacional para el

conocimiento y uso de la Biodiversidad.

Foroni, I., Couto, A. R., & Bettencourt, B. F. (2014). HLA-E, HLA-F and HLA-G — The Non-Classical Side of the MHC Cluster. *INTECH*, 68 - 69.

Gatto, M., Zen, M., Ghirardello, A., Bettio, S., Bassi, N., Laccarino, L., Doria, A. (2013). Emerging and critical issues in the pathogenesis of lupus. *Autoimmun Rev*, 523-536.

Ghodke-Puranik, Y., & Niewold, T. (2015). Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun*, 125-136.

Gómez-Puerta, J. A. (2008). Lupus eritematoso sistémico. La clínica y el laboratorio.

Gómez-Puerta, J. A., & Cervera, R. (2009). Lupus eritematoso sistémico. *Medicina & Laboratorio*, 5-6.

Gonen-Gross, T., Achdout, H., Arnon, T., Gazit, R., Stern, N., Horejsi, V., Mandelboim, O. (2005). The CD85J/leukocyte inhibitory receptor-1 distinguishes between conformed and beta 2-microglobulin-free HLA-G molecules. *J Immunol*, 4866–4874.

Grange, C., & Camussi, G. (2017). Immunosuppressive role of extracellular vesicles: HLA-G, an important player. *Ann Transl Med* 2017.

Griffiths-Jones, S., Grocock, R., van Dongen, S., Bateman, A., & Enright, A. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*, D140–D144.

Hannahs Hahn, B. (2010). Systemic Lupus Erythematosus. En B. Hannahs Hahn, *Harrisons Rheumatology* (págs. 66-81). Mexico DF: McGraw-Hill.

HLA Nomenclature @ hla.alleles.org. (enero 2018). Obtenido de HLA Nomenclature @ hla.alleles.org: <http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>

Hviid, T. H., Hoeg, A., Kruse, C., & Christiansen, O. (2002). HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *HLA Inmune Response Genetcs*, 122-132.

- Instituto Nacional del Cáncer (NIH). (s.f.). Obtenido de Instituto Nacional del Cáncer (NIH): <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/infantil/tch-infantil-pro-pdq>
- Iñigo Rúa-Figueroa, F. J.-L.-A.-I.-R. (2014). Registro nacional de pacientes con lupus eritematoso sistémico de la Sociedad Española de Reumatología: objetivos y metodología. *Reumatología clínica*, 2.
- Ippolito, A., Wallace, D., Gladman, D., Frotin, P., Urowitz, M., Werth, V., Sturfelt, G. (2011). Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: comparison of historical and current assessment of seropositivity. *Lupus*, 250-255.
- Iturrieta, R. (19 de octubre de 2013). Chile Lúpico. Obtenido de Chile Lúpico: <https://chilelupico.wordpress.com/2012/01/19/cuantos-somos-con-lupus/>
- José A. Gómez-Puerta, R. C. (2008). Lupus Eritematoso Sistémico. *Medicina & Laboratorio*, 3.
- Kamen, D. L. (2015). Environmental Influences on Systemic Lupus Erythematosus Expression. *Rheum Dis Clin North Am*.
- Kokuina, E., Estévez del Toro, M., Gutiérrez, A., Ortiz, A., Sánchez, Y., & Pérez Campo, D. (2015). Anticuerpos antinucleares específicos y afectaciones orgánicas en 180 pacientes con lupus eritematoso sistémico. *Revista Cubana de Reumatología*, 104-111.
- Kölliker Frers, R. A. (2016). *Inmunología: Inmunopatogenia y fundamentos clínico-terapéuticos*. Buenos Aires: Corpus.
- Kuersten, S., & Goodwin, E. (2003). The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet*, 626-637.
- Liu, A., & La Cava, A. (2014). Epigenetic dysregulation in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, 215-219.
- Liu, C., Kao, A., Manzi, S., & Ahearn, J. (2013). Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 210-233.

- Lloyd, P., Doaty, S., & Hahn, B. H. (2016). Systemic lupus erythematosus. United Kingdom: For Gordon, C.; Iseberg, D.
- Lopez-Martinez, A., Chavez-Muñoz, C., & Granados, J. (2005). Función biológica del complejo mayor de histocompatibilidad. *scielo*, 132-141.
- Lucena-Silva, N., de Souza, V., Gomes, R., Fantinatti, A., Muniz, Y., de Albuquerque, R., Donadi, E. (2013). HLA-G 3' untranslated region polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in 2 Brazilian populations. *The Journal of Rheumatology*.
- LUPUS UK. (s.f.). Obtenido de LUPUS UK: <http://www.lupusuk.org.uk/medical/gp-guide/introduction-to-lupus/epidemiology-of-lupus/>
- Manzi, S. (2001). Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Am J Manag Care*, 474-479.
- Marrero, D. W. (2017). Lupus Eritematoso Sistémico. *Acta medica del centro*, 88. Mejia Salas, H., & Mendoza Amatler, A. (2004). Lupus Eritematoso Sistémico. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 1- 4.
- Melgarejo Paniagua, P. A., Denis Doldán, A. E., Ferreira Gaona, M. I., & Díaz Reissner, C. V. (2015). Complicaciones en pacientes con lupus eritematoso sistémico. *Revista Nacional de Itauguá*, 15-19.
- Mercola: Tome control de su salud. (s.f.). Obtenido de Mercola: Tome control de su salud: <http://articulos.mercola.com/lupus/dieta.aspx>
- Mina R, B. (2013). Update on differences between childhood-onset and adult-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res*.
- Molly's Fund Fighting Lupus. (septiembre de 2012). Obtenido Molly's Fund Fighting Lupus: <http://www.mollysfund.org/symptoms-of-lupus-in-men/Burgos>. (febrero de 2010). Obtenido de Burgos: <http://mtraburgos-inmunologia.blogspot.com/2010/02/complejo-mayor-de-histocompatibilidad.html>

- Ortega H, O.-D., & Shoenfeld, Y. (2012). Mixed connective tissue disease: An overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Best Practice Clinical Rheumatology*, 61-72.
- Página Siete. (03 de Mayo de 2015). Vivir con el lupus significa aprender a domesticar todo.
- Página Siete. (07 de Mayo de 2016). Se registraron 500 casos de lupus en La Paz en 5 años.
- Perez, W. (13 de Mayo de 2014). En La Paz se detectan cada año a 130 personas con lupus. *La Razón*.
- Pons-Estel, G; Catoggio, L; Cardiel, M; Bonfa, E., Caeiro; F; Sato, E; Pons- Estel, B. (2015). Lupus in Latin-American patients: lessons from the GLADEL cohort. *Lupus. GLADEL*, 536-545.
- Porras-Dorantes, Á., & García-Ortiz, J. E. (2014). Antígeno leucocitario humano G (HLA-G) como biomarcador en cáncer. *Gaceta Médica de México*.
- Pretel, M., Marquez, L., & España, A. (2012). Lupus Eritematoso inducido por fármacos. *ELSEVIER*.
- Red informativa de medicina avanzada (RIMA). (2012). Obtenido de Red informativa de medicina avanzada (RIMA): <https://www.rima.org/Noticia.aspx?IdNota=3369>
- Rekvig, O. (2015). Anti-dsADN antibodies as a classification criterion and a diagnostic marker for systemic lupus erythematosus: critical remarks. *Clinical & Experimental Immunology*, 5-10.
- Reséndiz-Hernández, J. M., Camarena, Á., Pérez-Rubio, G., & Falfán-Valencia, R. (2011). Mecanismos inmunológicos de la respuesta inflamatoria en EPOC. *Medigraphic*.
- Rincón, V., & Manrique, E. (2014). HLA-G: Su importancia inmunológica. *HLA-G: Su importancia inmunológica*.
- Rizro, R., Govoni, M., Padovan, M., Rubini., Melchiorri, L., Stignani, M; Fotinidi, M.

- (2008). HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*, 520-529.
- Rizzo, R. (2008). HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. *Journal compilation*.
- Rousseau, P., Discorde, M., Mouillot, G., Marcoua, C., Carosella, E. D., & Moreau, P. (2003). The 14 bp Deletion-Insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *ELSEVIER*, 1005-1010.
- Rua-Figueroa, I., & Erasquin, C. (2010). Factores asociados a la mortalidad del lupus eritematoso sistémico. *ELSEVIER*.
- Salud, O. P. (Mayo de 2005). © Pan American Health Organization. All rights reserved. Obtenido de © Pan American Health Organization. All rights reserved: <http://www.paho.org/hq/>
- Severiche Maury, D. M., Restrepo Escobar, M., González Naranjo, L. A., & Vanegas García, A. L. (2014). Ciento quince pacientes con lupus eritematoso sistémico: características clínicas e inmunológicas. *Revista Colombiana de Reumatología*.
- Shiroishi, M., Kuroki, K., Ose, T., Rasubala, L., Shiratori, I., Arase, H., Maenaka, K. (2006). Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer. *J Biol Chem*, 10439–10447.
- Somers EC, T. S., Smeeth L, S. W., & AJ, H. (2007). Incidence of systemic lupus erythematosus in the United Kingdom. *Arthritis Rheum*, 612-618.
- Sturfelt, G., & Truedsson, L. (2005). Complement and its breakdown products in SLE. *Rheumatology*, 1227–1232.
- TD Veit, EAA Cordero, OA Monticielo. (2009). Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *PubMed*.
- Tilburgs, T., Evans, J. H., Crespo, Â. C., & Strominger, J. L. (2015). The HLA-G cycle provides for both NK tolerance and immunity at the maternal-fetal interface.

PNAS.

- Torres Odio, S., & Martínez Córdova, C. Z. (2011). Factores genéticos, inmunológicos y ambientales asociados a la autoinmunidad. Genetic, immunologic and environmental factors associated with autoimmunity.
- Tsokos, C., Lo, M., Reis, P., & Sullivan, K. (2016). New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*, 716-730.
- Tsokos, G. (2011). Systemic lupus erythematosus. *New England Journal Medical*, 2110-2121.
- Valencia, F., & Rances. (2004). MHC: Polimorfismos genéticos en autoinmunidad. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 126-134.
- Vázquez-Rodríguez, S., Bouchan-Valencia, P., & González-Jiménez, M. A. (2011). Mecanismos de tolerancia inmunológica en el embarazo. *Perinatología y reproducción humana*.
- Vega Robledo, G. B. (2009). Complejo Mayor de Histocompatibilidad. *Medigraphic*.
- Veit, T., & Chies, J. (2009). Tolerance versus immune response — MicroRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. *ELSEVIER*, 229-231.
- Velázquez-Cruz, R., Jiménez-Morales, S., Ramírez-Bello, J., Aguilar-Delfín, I., Salas-Martínez, G., Baca Ruíz, V., & Orozco Orozco, L. (2012). Lupus eritematoso sistémico (LES): genómica de la enfermedad. *Gaceta Médica de México*, 371-380.
- Vico Zúñiga, I. (2007). Inmunología y embarazo. *Servicio de Obstetricia y Ginecología*.
- Wallace, D. J., & Hannahs Hahn, B. (2012). *Lupus Erythematosus and Related Syndromes*. Philadelphia, PA: ELSEVIER.
- Wallace, D. J., & Hannahs Hahn, B. (2013). *DUBOIS' Lupus Erythematosus and Related Syndromes*. Los Angeles California: ELSEVIER.

- Wu, FX; Wu, LJ; Luo, XY; Tang, Z; Yang, MH; Xie, CM; Liu, NT; Zhou, JG; Guan, JL; Yuan, GH. (2009). Lack of association between HLA-G 14-bp polymorphism and systemic lupus erythematosus in a Han Chinese population. *Revistas SAGEP*.
- Wu, H., Zhao, M., Chang, C., & Lu, Q. (2015). The real culprit in systemic lupus erythematosus: anormal epigenetic regulation. *Int J Mol Sci*, 1101

XIV. ANEXO

1. Consentimiento informado y hoja de información a los pacientes y controles

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo....., de años de edad y con C.I....., expedido en, manifiesto que he sido informado sobre los objetivos del Proyecto de Investigación « **Determinación de la asociación genética de los polimorfismos del gen que codifica la enzima convertidora de angiotensina, los loci HLA-DR y HLA-DQ con la susceptibilidad a Lupus Eritematoso Sistémico**», que tiene como fin diagnosticar o confirmar el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico y su relación con los antígenos de histocompatibilidad y con el gen regulador de la enzima convertidora de angiotensina. Esto me permitirá confirmar mi enfermedad y prevenir el riesgo familiar de desarrollar LES.

He sido informado de los posibles riesgos de la toma o extracción de sangre, así mismo que se me harán conocer los resultados de las pruebas realizadas con mi muestra sanguínea.

He sido también informado de que mis datos personales serán manejados confidencialmente y estarán protegidos según las normas vigentes de Bioética. Que mi participación en el proyecto es **VOLUNTARIA** y que, en cualquier momento, puedo retirar mi consentimiento a seguir participando del mismo, sin que mi tratamiento médico posterior se vea afectado.

Por lo tanto, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a participar en este proyecto.

NOMBRES Y APELLIDOS.....

C.I.

DIRECCIÓN:

FIRMA.....

FECHA:

NOMBRE DEL RESPONSABLE DE LA OBTENCION DEL CONSENTIMIENTO

INFORMADO:.....

C.I.....

FIRMA:.....

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE O PARTICIPANTE

Determinación de la asociación genética de los polimorfismos gen que codifica la enzima convertidora de angiotensina, los loci HLA-DR y HLA-DQ con la susceptibilidad a Lupus Eritematoso Sistémico

Estimado Señor(a), su médico le ha diagnosticado Lupus Eritematoso Sistémico. El Lupus Eritematoso Sistémico es una enfermedad bastante complicada, de causa aún desconocida, el 90% de los pacientes con lupus son mujeres, está probablemente relacionado con las hormonas femeninas, pero también es posible el efecto protector de las hormonas masculinas. Se sabe que existen algunas cosas a las que las personas pueden ser susceptibles como exponerse al sol, el uso de algunos medicamentos, problemas causados por una clase de virus como los que provocan las ampollas que aparecen en la boca y que conocemos como “beso de araña”, también se sabe que puede haber una transmisión por herencia (como sucede con el color de los ojos o el color de cabello) para que se produzca la enfermedad que usted tiene. En este proyecto y a través de exámenes de laboratorio, deseamos estudiar en una muestra de su sangre algunos elementos que nos permitan aclarar el origen del problema que usted tiene y saber si hay un factor de herencia para ayudar a sus hijos y a otros familiares, indicándoles lo que deban hacer para evitar complicaciones. Este tipo de estudios ya se han hecho en otros países y en personas de diferentes razas, en La Paz, será la primera vez que se hagan estos exámenes.

Si usted acepta participar en el estudio y su médico tratante está de acuerdo, un médico de nuestro grupo, le hará algunas preguntas sobre su estado de salud y lo examinará. Luego le tomaremos una muestra de sangre, en una cantidad parecida a 2 cucharillas de café. Para ello utilizaremos una jeringa y aguja nuevas para pinchar en su brazo y obtener la muestra de sangre, que será analizada en nuestros laboratorios. Esta prueba puede causarle algunas molestias como sentir un dolor muy pasajero en el momento en que le hagamos el pinchazo. 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 algún tratamiento que nosotros le daremos sin costo alguno. Usted podrá recoger los resultados de sus exámenes a los siete días de haberle tomado la muestra de sangre. El examen clínico y de laboratorio, tendrán una duración de aproximadamente 10 minutos. El sobrante de la sangre que usaremos para hacer las pruebas de laboratorio, será congelado y será utilizada dentro de unos años para hacer otros estudios que nos puedan ayudar a tener una mejor información sobre el lupus.

Beneficios y riesgos

Tiene como beneficio el realizar el diagnóstico de certeza de lupus. Los estudios a ser efectuados no tendrán ningún riesgo para usted.

Confidencialidad

Sólo su médico tratante, los investigadores y colaboradores del estudio, doctor y sus colaboradores sabrán que usted está participando. Los registros que se hagan se harán identificándolo sólo con un número y no con el nombre; sin embargo, los médicos y bioquímicos que forman parte esta investigación podrán revisar de vez en cuando sus registros como parte de su actividad en el proyecto. Si los resultados son publicados, usted no será identificado por su nombre.

Usted entiende que su participación en el estudio es **VOLUNTARIA**. En cualquier momento usted puede retirar su consentimiento a participar en el estudio, El médico responsable del presente proyecto, podrá detener el estudio por razones médicas u otras. El medico estará disponible para responder cualquier pregunta adicional.

Compensación

A usted no se le cobrarán las consultas ni exámenes de laboratorio necesarios para la realización del estudio.

2. Certificado de aval ético



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE LA UMSA
CEI - UMSA

CERTIFICADO DE AVAL ÉTICO

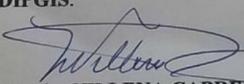
A quién corresponda:

El Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Mayor de San Andrés (CEI-UMSA) tiene a bien informar que fue presentado para su evaluación y aval ético, el Proyecto Concursable IDH 2011-2012 titulado: **“Determinación de la asociación genética de los polimorfismos gen que codifica la enzima convertidora de angiotensina, los loci HLA-DR y HLA-DQ con la susceptibilidad a Lupus Eritematoso Sistémico”** por el Instituto SELADIS de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA, cuyo Investigador Principal es el Dr. Luis Fernando Sosa Tordoya.

Dicho proyecto fue evaluado bajo la normativa internacional en ética de la investigación (Pautas CIOMS/OMS, Helsinki/AMM) en la que se incluyen los criterios éticos que se deben tomar en cuenta para investigaciones que involucran seres humanos:

1. Validez científica (proyecto que cumpla con todo el rigor de la metodología científica)
2. Selección equitativa de la muestra (tipo de individuos que entran al estudio, tomando en cuenta, principalmente, a grupos vulnerables)
3. Validez social (pertinencia, atingencia y relevancia del proyecto)
4. Relación Riesgo/Beneficio (donde el riesgo sea mínimo y mayor el beneficio para los sujetos del estudio)
5. La Hoja de Información y el Consentimiento Informado (documentos redactados de una manera clara, comprensible y lo suficiente informativos para el participante, que reflejen el respeto a la autonomía)

Una vez verificadas las correcciones hechas por el equipo investigador, en base a las observaciones del CEI-UMSA, es que se certifica que el mencionado proyecto cumple con todos los requisitos éticos arriba mencionados, por lo que se decide otorgar el **CERTIFICADO DE AVAL ÉTICO** al proyecto **“Determinación de la asociación genética de los polimorfismos gen que codifica la enzima convertidora de angiotensina, los loci HLA-DR y HLA-DQ con la susceptibilidad a Lupus Eritematoso Sistémico”** el mismo que puede proseguir con la evaluación determinada por el DIPGIS.


Dra. Mercedes **VILLENA CABRERA**
COORDINADORA a.i. CEI-UMSA


Ing. Carlos **ESPAÑA V.**
PRESIDENTE CEI-UMSA

La Paz, 8 de Septiembre de 2011



Av. Villazón N° 195, Monoblock, Piso 1 Telf. (591-2) 2440493
e-mail: cei@umsa.bo - La Paz - Bolivia

3. Historia clínica

SELADIS	FORMULARIO DE HISTORIA CLINICA LES	PACIENTES
---------	---------------------------------------	-----------

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. DATOS CRONOLOGICOS

Edad de aparición del primer síntoma ____ Edad de Dx de LES ____ Duración de LES ____

3. ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLOGICOS

Fuma: Nunca ____ En algún momento ____ En la actualidad ____
Alcohol: Nunca ____ En algún momento ____ En la actualidad ____
Anticonceptivos: Nunca ____ En algún momento ____ En la actualidad ____
Gesta: _____ Para: _____ 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 hemática _____ Alteración neural ____ Otros _____

6. MANIFESTACIONES ACUMULADAS DE LA ENFERMEDAD

Erupción Malar ____ Fotosensibilidad ____ Ulceras orales ____ Artritis ____ Serositis ____
Afectación renal _____
Alteración hemática _____ Alteración neural ____ Otros _____

7. MANIFESTACIONES EN LOS ULTIMOS 10 DIAS

Erupción Malar ____ Fotosensibilidad ____ Ulceras orales ____ Artritis ____ Serositis ____
Afectación renal _____

Alteración hemática _____ Alteración neural _____ Otros _____

8. LABORATORIOS INICIALES

Ds- DNA _____ ANA _____ anti – Sm _____

Anticardiolipinas _____

Otros _____

9. TRATAMIENTO ATUAL

10. PATOLOGIAS ASOCIADAS

Tiroidopatía autoinmune _____ Úlcera Duodenal _____ Hepatopatía _____ EPOC _____

Diabetes _____ Dislipidemia _____

HAS _____ Sd Sjogren _____ Sd. Antifosfolipídico _____ EMTC _____ Otros _____

Médico tratante: _____ Especialidad: _____

Observaciones: _____

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 ___

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

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

Gesta: _____ Para: _____ Ab: _____

3. ANTECEDENTES FAMILIARES

Familiar con LES _____ Familiar con otra patología

4. TRATAMIENTO ATUAL

5. PATOLOGIA ACTUAL

SI ___ NO ___ Cual _____

Observaciones:
