



**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y BIOQUÍMICAS**



LA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS DE LA UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES AUTORIZA EL USO DE LA INFORMACION CONTENIDA EN ESTE DOCUMENTO SI LOS PROPOSITOS SON ESTRICTAMENTE ACADEMICOS.

LICENCIA DE USO

El usuario está autorizado a:

- a) visualizar el documento mediante el uso de un ordenador o dispositivo móvil.
- b) copiar, almacenar o imprimir si ha de ser de uso exclusivamente personal y privado.
- c) copiar textualmente parte(s) de su contenido mencionando la fuente y/o haciendo la referencia correspondiente respetando normas de redacción e investigación.

El usuario no puede publicar, distribuir o realizar emisión o exhibición alguna de este material, sin la autorización correspondiente.

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS. EL USO NO AUTORIZADO DE LOS CONTENIDOS PUBLICADOS EN ESTE SITIO DERIVARA EN EL INICIO DE ACCIONES LEGALES CONTEMPLADOS EN LA LEY DE DERECHOS DE AUTOR.



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO
DE DIAGNOSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)



**EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO D/D, I/I, I/D DEL GEN
QUE CODIFICA LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA CON LA
SUSCEPTIBILIDAD A LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO Y SU RIESGO CON
NEFRITIS LÚPICA**

ELABORADO POR:

Univ. WENDY JACQUELINE CUTIPA CHOQUE

TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

LA PAZ - BOLIVIA

2014



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO
DE DIAGNOSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)



EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO D/D, I/I, I/D DEL GEN
QUE CODIFICA LA ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA CON LA
SUSCEPTIBILIDAD A LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO Y SU RIESGO CON
NEFRITIS LÚPICA

ELABORADO POR:

Univ. WENDY JACQUELINE CUTIPA CHOQUE

ASESORES:

Dr. LUIS FERNANDO SOSA TORDOYA

TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

LA PAZ - BOLIVIA

2014



Dedicado a:

Mis padres, Damaris, mi familia

y Luis.

Gracias

Gracias al Señor Jesucristo

El Rey y Señor de mi vida, quien me dio la sabiduría, las fuerzas y el amor incondicional para realizar este trabajo.

Gracias a mi familia

Que con su amor, cariño y apoyo, supieron siempre impulsarme en el camino para que cayera y llegue a la meta trazada.

Gracias al doctor Luis Fernando Sosa Tordoya

Que fue la fuente de inspiración y la columna principal para realizar este trabajo, que con paciencia, confianza y amistad pudo guiarme en todo momento durante la elaboración del mismo.

Gracias a los doctores Jose L. Choquehuanca y Sergio Cabrera

Por haberme proporcionado su colaboración, conocimiento y amistad desinteresadamente cuando se los pedí.

Gracias al Instituto SELADIS por acogerme y darme la oportunidad de concretar uno de mis sueños

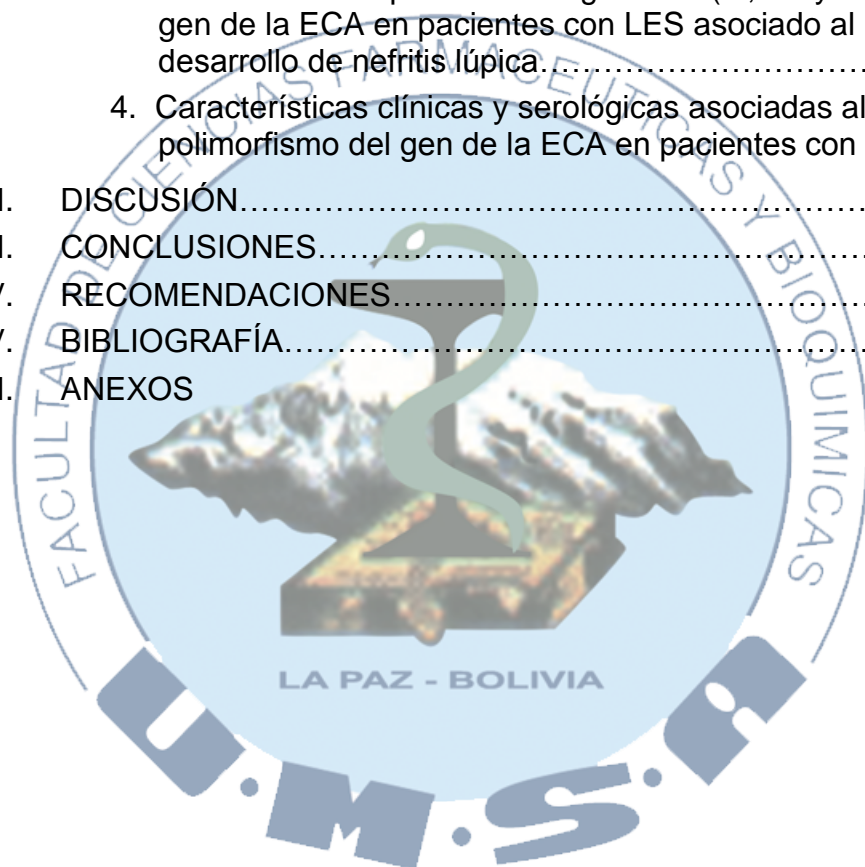
*Gracias a todos mis compañeros que siempre tuvieron una palabra de aliento para que siguiera adelante, gracias por no dejarme rendir
Luis Q. gracias por todo.*

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABLAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEORICO.....	3
A. LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO.....	3
1. Tipos de anticuerpos producidos por LES.....	4
a) Anticuerpos Antinucleares.....	4
b) Anticuerpos Anti DNA de doble cadena.....	5
c) Anticuerpos Anti Smith (Anti- Sm).....	6
d) Anticuerpos Anti DNA de simple cadena (Anti-ss).....	6
e) Otros anticuerpos.....	7
2. Historia.....	8
3. Epidemiología.....	9
4. Etiología.....	10
a) Factores endocrinos.....	10
b) Factores ambientales o físicos.....	12
c) Factores químicos.....	15
d) Factores genéticos.....	17
5. Patogénesis de la enfermedad.....	19
a) Daño renal producido por LES.....	20
b) Daño a SNC producido por LES.....	22
6. Características clínicas.....	23
B. RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO DEL GEN QUE CODIFICA LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA Y LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO.....	26
Enzima convertidora de angiotensina.....	26
1. Sistema renina-angiotensina aldosterona.....	27
2. Acción de la angiotensina II.....	28
III. ANTECEDENTES GENERALES SOBRE EL PROBLEMA.....	29

IV.	JUSTIFICACIÓN.....	31
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
VI.	HIPÓTESIS.....	32
VII.	OBJETIVOS.....	33
	A. OBJETIVO GENERAL.....	33
	B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
VIII.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	34
	A. TIPO DE ESTUDIO.....	34
	B. POBLACIÓN EN ESTUDIO.....	35
IX.	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA.....	35
	A. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	35
	B. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	35
	C. MATERIAL BIOLÓGICO.....	35
	D. TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	36
	E. ASPECTOS ÉTICOS.....	36
X.	CONTEXTO Y LUGAR.....	37
	A. MÉTODOS.....	37
	1. Optimización de la prueba de PCR para la identificación de inserción o delección de un fragmento de 287 pares de bases en el intrón 16 del gen ECA.....	37
	2. Obtención del material genético.....	39
	3. Revelado de los productos amplificados de la PCR ECA1 y ECA2.....	41
	4. Asociación de la frecuencia de los genotipos (I/I), (I/D) o (D/D) del gen de la ECA en pacientes con LES.....	41
	5. Asociación de la frecuencia de los genotipos (I/I), (I/D) o (D/D) con la presencia de nefropatía lúpica.....	41
	6. Realización de la técnica de ELISA indirecto para medir los niveles de Ds-DNA, Ss-DNA y Smith.....	42
	7. Realización de IFI para medir títulos de Anticuerpos anti nucleares de tipo IgG.....	42
	8. Asociación de las características clínicas y serológicas de los pacientes con LES y el polimorfismo del gen ECA.....	43

XI.	RESULTADOS.....	43
	1. Optimización de la prueba de PCR para la identificación de inserción o delección de ECA.....	43
	2. Frecuencias del polimorfismo genético (I/I, I/D y D/D) del gen de la ECA en pacientes con LES.....	48
	3. Frecuencias del polimorfismo genético (I/I, I/D y D/D) del gen de la ECA en pacientes con LES asociado al desarrollo de nefritis lúpica.....	50
	4. Características clínicas y serológicas asociadas al polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES....	52
XII.	DISCUSIÓN.....	60
XIII.	CONCLUSIONES.....	66
XIV.	RECOMENDACIONES.....	67
XV.	BIBLIOGRAFÍA.....	69
XVI.	ANEXOS	



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
FIGURA N°1. Fotografía del primer ensayo de PCR realizado para la optimización de la PCR del gen de la ECA.....	44
FIGURA N°2. Fotografía de la amplificación del gen ECA 2 luego de la adición de DMSO.....	45
FIGURA N°3. Fotografía de la corrida electroforética de la genotipificación del polimorfismo I/D del gen ECA1.....	46
FIGURA N°4. Fotografía de la corrida electroforética de la genotipificación del polimorfismo de ECA2.....	47

ÍNDICE TABLAS

	Pag.
TABLA N°1. Fármacos descritos como potencialmente implicados en casos de lupus eritematoso cutáneo subagudo inducido por fármacos..	17
TABLA N°2. Manifestaciones clínicas características de Lupus Eritematoso Sistémico.....	24
TABLA N°3. Comparación de la concentración de los reactivos propuestos por Chiang y Shanmugam y las concentraciones utilizadas en el presente estudio para la optimización de la PCR para ECA1 y ECA2.....	48
TABLA N°4. Tabla de frecuencias genotípicas del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES versus pacientes sanos.....	49

TABLA N°5. Comparación de frecuencias las alélicas del intrón 16 del gen de la ECA entre la población de pacientes con LES y la población de pacientes aparentemente sanos.....	50
TABLA N°6. Comparación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES con y sin nefropatía lúpica.....	51
TABLA N°7. Frecuencias alélicas del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES asociado a nefropatía lúpica.....	52
TABLA N°8. Tabla general de las características clínicas que presentaron los pacientes con LES.....	53
TABLA N°9. Tabla general de los resultados obtenidos de las pruebas serológicas realizadas a los pacientes con LES.....	54
TABLA N°10. Asociación del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES, respecto a dolores articulares o artritis y los títulos de ANA, anti Ds-DNA, anti-Smith y anti-Ss-DNA.....	57
TABLA N°11. Asociación del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES, respecto a la caída de cabello notable en forma localizada y los títulos de ANA, anti Ds-DNA, anti-Smith y anti-Ss-DNA.....	58
TABLA N°12. Asociación del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES, respecto a edema y los títulos de ANA, anti Ds-DNA, anti-Smith y anti-Ss-DNA.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN** = Acido desoxirribonucleico
- ARN** = Acido ribonucleico
- ANA** = Anticuerpos antinucleares
- Anti-DNAbs** = Anticuerpos contra el ADN de doble cadena
- Anti-RNP** = Anticuerpos anti ribonucleoproteínas
- Anti-Sm** = Anticuerpos anti-Smith
- Anti-Ss** = Anticuerpos contra ADN de simple cadena
- β 2-GP-1** = proteína plasmática la β 2 glicoproteína 1
- CD** = Célula dendrítica
- CMH** = Complejo mayor de Histocompatibilidad
- D** = Delesión
- ECA** = Enzima convertidora de angiotensina
- ELISA** = Ensayo inmunoabsorbente unido a una enzima
- GM-CSF** = factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos
- HLA** = Antígeno leucocitario humano
- IFI** = Inmunofluorescencia indirecta
- IgG** = Inmunoglobulina tipo G (proteína)
- IgM** = Inmunoglobulina tipo M (proteína)
- IL-1** = Interleucina-1
- IL-1- α** = Interleucina-1- alfa
- IL1- β** = Interleucina-1-beta

IL-6 = Interleucina-6

IL-8 = Interleucina-8

IFN- γ = Factor de transcripción regulador del interferón gama

I = Inserción

iNOS= Oxido nítrico inducible

IRF-1 = Factor de transcripción regulador del interferón 1

LAK = Actividad asesina inducida por linfocinas

LB = Linfocito B

LES = Lupus eritematoso sistémico

LESIF= Lupus Eritematoso sistémico inducido por fármacos

LT = Linfocito T

NET = Trampas extracelulares de neutrófilos

NK = Natural killer

NL = Nefritislúpica

OMS = Organización Mundial de la Salud

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa

R-UV = Radiación ultra violeta

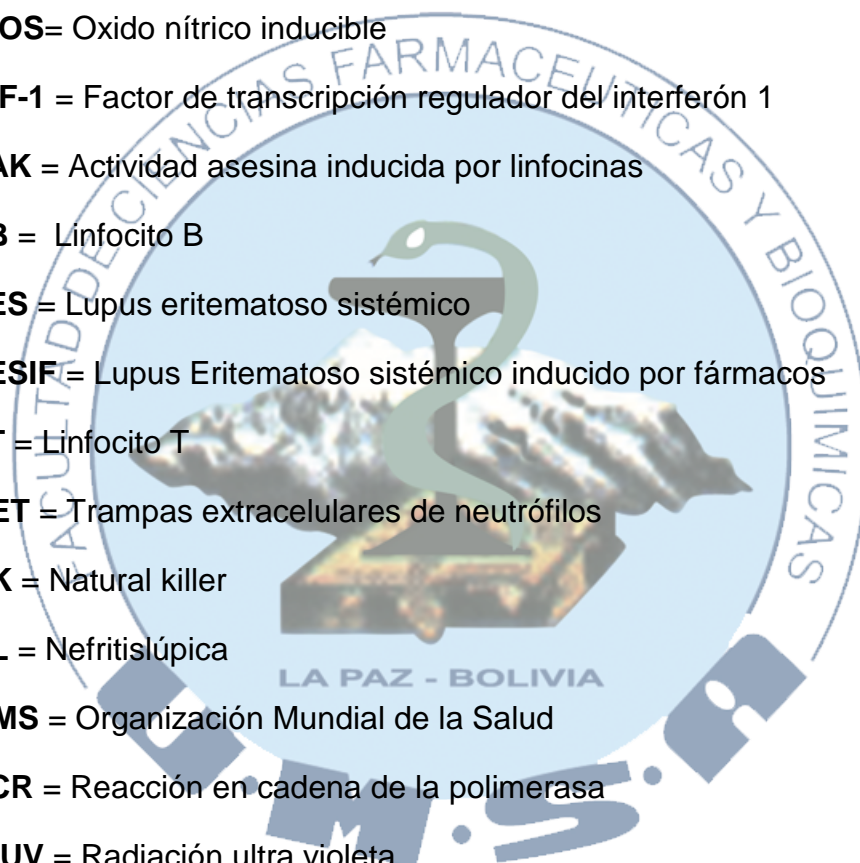
SI = Sistema inmune

SNC = Sistema nervioso central

TNF-a = Factor de necrosis tumoral alfa

TTP = Púrpura trombocitopénicatrombótica

VEB = Virus de Epstein-Barr



RESUMEN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad multisistémica inflamatoria de etiología desconocida. Varios estudios en diferentes grupos poblacionales han asociado el polimorfismo del gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) con la susceptibilidad a LES. El presente estudio pretende asociar el polimorfismo del intrón 16 del gen de la ECA con la susceptibilidad a LES y el riesgo de nefritis lúpica (NL). Se incluyeron 87 pacientes lúpicos con y sin NL y 85 controles sanos. Se determinaron los polimorfismos de ECA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se midieron los títulos de anticuerpos anti componentes nucleares mediante las técnicas de ELISA e IFI. Las frecuencias del polimorfismo ECA (I/I, I/D y D/D) en pacientes lúpicos son 47,1%, 48,3% y 4,6% y en controles 68,2%, 31,8 y 0%. Las frecuencias de los alelos inserción y delección en lúpicos son del 71,3%, 28,7% y en sanos 84,1% y 15,9% respectivamente. No se encontró asociación significativa ($p=0,534$) del polimorfismo de ECA y NL. Sin embargo, se observó que los genotipos I/D, D/D son más frecuentes en pacientes lúpicos sin NL que en los que la presentan. La asociación del polimorfismo de ECA con las manifestaciones clínicas y los marcadores laboratoriales no mostró resultados estadísticamente significativos, en el análisis se destaca que los pacientes lúpicos con el genotipo I/I poseen títulos elevados de ANA y ds-DNA.

En conclusión el alelo D del intrón 16 del gen ECA es dos veces más frecuente en pacientes lúpicos con respecto a la población sana. El genotipo I/I, I/D y D/D no es un factor predisponente a algún tipo de manifestación clínica o alguna elevación de anticuerpos en los pacientes lúpicos bolivianos estudiados.

Abstract

Lupus Erythematosus Systemic (SLE) is a multisystem inflammatory disease of unknown etiology. Several studies in different populations have associated the angiotensin converting enzyme (ACE) gene polymorphism with susceptibility to SLE. The aim of this study is to associate the polymorphism of intron 16 of the ACE gene with susceptibility to SLE and the risk of lupus nephritis (LN). 87 lupus patients with and without LN and 85 healthy controls were included. ACE polymorphisms were determined by the polymerase chain reaction (PCR) and the titles of anti-nuclear components were measured by the ELISA and IFI. The ACE (I/I, I/D and D/D) frequencies in lupus patients are 47.1 %, 48.3 % and 4.6 % and in controls are 68.2 %, 31.8% and 0%. The insertion and deletion allele frequencies in lupus patients are 71.3%, 28.7% and in healthy control are 84.1% and 15.9% respectively. No significant association ($p = 0.534$) in ACE polymorphism was found in LN patients. However, we noted that genotypes I/D, D/D are more common in lupus patients without LN than the LN group. The association of ACE polymorphism with clinical and laboratory markers showed no statistically significant results, the analysis highlights that lupus patients with I/I genotype have high titers of ANA and anti-ds-DNA antibodies.

In conclusion, the D allele of intron 16 of the ACE gene is twice as common in lupus patients compared to the healthy population. The genotype I/I, I/D and D/D are not a predisposing factor to some type of clinical manifestation or some elevation of antibodies titers in Bolivian lupus patients.

I. INTRODUCCIÓN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune compleja mediada por complejos inmunes, autoanticuerpos y células que dañan de manera sistémica a cualquier órgano o sistema del organismo, los órganos principalmente afectados son el riñón, pulmón y el sistema nervioso. No se conoce con exactitud los factores ambientales o genéticos que desencadenan la enfermedad, pero está demostrado que es una enfermedad que afecta entre el 80% a 90% de los casos a mujeres y que hay una mayor predisposición de afectación en individuos de raza negra y latina. (Lau CS, 2006; Chai HC, 2012)

El daño aparece en cualquier órgano del cuerpo y puede causar entre otros síntomas artritis con inflamación, fatiga, eritema en alas de mariposa en región malar, úlceras orales, fotosensibilidad, serositis (inflamación del tejido alrededor del corazón y pulmón), osteoporosis, desórdenes renales (proteinuria), desórdenes sanguíneos (leucopenia, linfopenia, trombocitopenia, anemia hemolítica), desórdenes inmunológicos con anticuerpos (anti-DNA y anti-Sm) y títulos de anticuerpos antinucleares anormales.

Utilizando técnicas de biología molecular, se han descubierto algunos factores que regulan el sistema inmune, así como mecanismos bioquímicos por los cuales en el lupus se presenta daño al tejido (Parsa A. 2002). También se han identificado algunos genes candidatos que parecen estar involucrados en el lupus.

Esta enfermedad produce graves consecuencias en los pacientes, por esta razón a nivel mundial se están aunando esfuerzos para mejorar las herramientas de diagnóstico y tratamiento, como también para identificar los posibles factores que predisponen a una persona a desarrollar la enfermedad.

El conocimiento de los factores ambientales desencadenantes y de los genes involucrados en la predisposición a la enfermedad permitirán a los equipos médicos en general implementar medidas de medicina preventiva para disminuir la incidencia de la enfermedad y para dar tratamiento e información oportuna a los pacientes que tengan susceptibilidad a LES.

El presente trabajo proponemos determinar la asociación genética entre el polimorfismo genético del gen codificante de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) con la susceptibilidad a LES. Mediante el uso de la prueba molecular Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se determinó el polimorfismo del gen de la ECA. Se realizó el diagnóstico por laboratorio de LES mediante las pruebas de ELISA e inmunofluorescencia indirecta (IFI), estos resultados fueron acompañados de pruebas de gabinete que permitieron hacer una buena correlación clínica de los resultados de laboratorio con la historia clínica del paciente.

Con los resultados del proyecto se pretende dotar de una herramienta de laboratorio que aporte en la toma de decisiones referidas al ámbito de la medicina preventiva y asistencial, que permita mejorar la sobrevida de los pacientes afectados por LES y retarde la aparición del daño orgánico terminal que produce esta enfermedad, factores que al final repercutirán en que el paciente lúpico mejore su calidad de vida.

II. MARCO TEORICO

A. LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

El LES es una enfermedad autoinmune multisistémica la cual es muy compleja y constituye el prototipo de enfermedades autoinmunes sistémicas, que se caracteriza por un proceso inflamatorio crónico y daño en diferentes órganos y sistemas debido a la producción de auto-anticuerpos, depósito de complejos autoinmunes y activación del sistema del complemento (Rojas W., 2012).

Una característica esencial de la enfermedad es la respuesta inmunitaria, conducida por los antígenos contenidos en los tejidos propios, la cual es aparentemente responsable de gran parte de las consecuencias patológicas diseminadas de esta enfermedad (Mcphee SJ., 2007).

El LES se caracteriza por afección de la piel, articulaciones, riñón, sistema nervioso central (SNC), vasos, y huesos, entre otros; estos pacientes desarrollan síntomas generales como fatiga y alteraciones inmunológicas particulares de la enfermedad. Además, se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos circulantes con diferente especificidad en que la actividad inflamatoria es secundaria a la formación de complejos inmunes circulantes (Marshall E., 2002).

El LES inicia con la aparición de Linfocitos B (LB) periféricos autorreactivos que van escapando a los habituales procesos de regulación, que se da cuando la unión y señalización del BCR excede cierto umbral, los LB inmaduros interiorizan el BCR autorreactivo y detienen su ciclo de maduración. Estos LB dan lugar a la aparición de la enfermedad autoinmune

mediante la producción de autoanticuerpos y también a través de la activación de Linfocitos T (LT) igualmente reactivos (Rojas W., 2012).

El principal trastorno inmunológico en los pacientes con LES es la producción de autoanticuerpos contra una variedad de componentes celulares encontrados dentro del núcleo, citoplasma o membrana de diferentes células, así como contra moléculas solubles y factores de la coagulación. Los anticuerpos antinucleares (ANA) son los más característicos y están presentes en el 95% de los pacientes. Los cuales son muy importantes en el diagnóstico de la enfermedad (Rojas W., 2012). Entre los autoanticuerpos más importantes tenemos:

- Anticuerpos Antinucleares
- Anti DNA de doble cadena
- Anticuerpo anti-nucleosoma
- Anticuerpo anti-Sm
- Anticuerpo anti-Ro
- Anticuerpo anti C1q
- Anticuerpo anti- alfa Actinina
- Anticuerpo anti- fosfolípidos
- Anticuerpos contra el citoplasma del neutrófilo

1. Tipos de anticuerpos producidos por LES

a) Anticuerpos Antinucleares

Los anticuerpos antinucleares (ANA) han dado excelente valor diagnóstico por medio del método de IFI alcanzando un 100% de sensibilidad en pacientes con LES (Kokuina., 1999). Estos ANA es la prueba de tamizaje

mas sensible para el diagnóstico de LES que permite la detección de aproximadamente 100 anticuerpos dirigidos contra el núcleo (Quintana GL., 2003)

El título de ANA hallados es muy importante para el diagnóstico de LES, donde títulos 1/160 o mayores son indicativos de este tipo de patologías. Estos ANA se encuentran en títulos bajos en personas jóvenes y sanas, pero se encuentran títulos elevados en pacientes con patologías, como enfermedades autoinmunes a nivel del tejido conectivo o títulos intermedios en personas ancianas y embarazadas (Quintana GL., 2003).

En esta prueba la interpretación de los patrones hallados es muy importante, los patrones característicos que se encuentran asociados con LES son el periférico y homogéneo o difuso. (Sontheimer RD., 1991) (Burnham TK., 1978)

b) Anticuerpos Anti DNA de doble cadena

Los anticuerpos anti-DNA son muy útiles en el diagnóstico de LES, especialmente en aquellos pacientes que presentan características clínicas lo que apunta a estos anticuerpos como una probabilidad para confirmar la enfermedad. No todos los pacientes con LES tienen anti-DNA positivo pero no excluye el diagnóstico de LES (Quintana GL., 2003).

Los anticuerpos anti-DNA van produciendo daño renal a través de una lesión directa sobre sus antígenos (ADN, histonas, núcleos), componentes de la membrana basal glomerular (laminina, colágeno IV y heparán sulfato) o bien a través de la formación previa de complejos inmunes con nucleosomas que

se depositan posteriormente sobre la membrana basal glomerular de los riñones con la que establecen puentes de histona (Van Bruggen MCJ., 1997). Además, los pacientes con nefritis lúpica (NL) tienen alta afinidad por los anticuerpos anti-DNA que activan el complemento fuertemente (Cameron J., 2000).

c) Anticuerpos Anti Smith (Anti-Sm)

Este anticuerpo fue descrito por primera vez en los estudios de Lerner y Steitz (Lerner M., 1979). Tiene como antígenos varias proteínas que convencionalmente se denominan B' (29kDa), B (28kDa), D1, D2, D3 (16kDa), E (13kDa), F y G (Ruddy S., 2003).

Es un marcador en el diagnóstico de LES y ausente en otras enfermedades reumáticas (Beaufils M., 1983). La presencia de autoanticuerpos anti-Sm está asociada con expresiones más severas de LES, incluyendo la NL (Su W., 2003). Se ha visto que en el LES agudo, este anticuerpo está presente en un 75% de los casos. La especificidad en pacientes lúpicos es muy alta con alrededor del 98% y una sensibilidad de 20 a 30% (Quintana GL., 2003).

d) Anticuerpos Anti DNA de simple cadena (Anti-ss)

Son también llamados anti-Histona que se dirigen frente a componentes protéicos de los nucleosomas, estos complejos de DNA-proteínas forman parte de la estructura de la cromatina que es transcripcionalmente inactiva, esta se encuentra en el núcleo y tiene 3 subunidades, dos dímeros H2A-H2B que rodean un tetrámero H3-H4 y este complejo rodea la tercera subunidad

que comprende aproximadamente 2 giros de DNA (Burlingame R., 1985) (Klug A., 1985).

Este tipo de anticuerpos son encontrados en un 90% de pacientes con LES inducido por farmacos (Fritzier MJ., 1978) (Weinstein A., 1980) y un 30% en LES (Provost TT., 1993)

e) Otros anticuerpos

Los anticuerpos Anti-Ro y Anti-La están presentes en pacientes con Sjögren y LES. El antígeno “Ro” se aisló por primera de extracto de bazo humano por medio de inmunodifusión con ayuda de anticuerpos extraídos de pacientes con LES (Clark G., 1969) y de la misma manera el antígeno “La” fue identificado (Mattioli M., 1974). Este anticuerpo está altamente asociado con el Lupus Neonatal, en esta forma de lupus el autoanticuerpo IgG de la madre atraviesa la placenta y llega al feto, lo que se manifiesta en un rash cutáneo y bloqueo cardíaco congénito luego del nacimiento (Franco H., 1981) (Provost T., 1989).

Los pacientes con LES en un 40% tienen actividad anti-Ro y solo un 10 a 15% de anti-La con NL usualmente tienen títulos bajos de anticuerpos anti-Ro y anti-La, en comparación con los pacientes sin nefritis (Quintana GL., 2003) (Cameron J., 2000) (Robles A., 2005)

Los anticuerpos antifosfolípidicos se han asociado a varios desordenes como LES, la cual se caracteriza por fenómenos trombóticos recurrentes en venas y arterias, pérdidas fetales recurrentes y trombocitopenia. (Von Scheven E., 1996) (Velasco F., 1997) (Said PB., 1993). Estos anticuerpos se dirigen

contra un complejo de fosfolípidos que se encuentran unidos a una proteína plasmática la $\beta 2$ glicoproteína 1 ($\beta 2$ -GP-1) (Dunn JP., 1996)

La determinación del anticoagulante lúpico, fue utilizada por Feinstein y Rapaport por primera vez. Además del diagnóstico de LES también se utiliza en el diagnóstico de otras enfermedades autoinmunes, neoplasias e infecciones virales en niños (Said PB., 1993). Esta es una prueba donde se cuantifica la capacidad de los anticuerpos antifosfolípidos de prolongar la coagulación por medio de la inhibición de la conversión de la protrombina en trombina, o de la activación del factor X (Barba JR., 2003)

2. Historia

Esta enfermedad es conocida desde la antigüedad, el origen del nombre es desconocido, el término 'lupus' significa 'lobo' en latín, tal vez debido a que el rostro inflamado del paciente adopta una gran similitud con la cara arañada de un lobo (Stobo & David B. Hellmann, 1996).

Sir William Osler fue quien acuñó el término de "Lupus Eritematoso Sistémico" (Ropes MW, 1976) hoy en día, se considera una enfermedad compleja y misteriosa, más que su propio nombre (Marshall, 2002)

El Dr. Hargraves junto a un grupo de médicos el año 1948, describieron la primera prueba sanguínea para diagnosticar LES, que fue el "análisis celular del lupus eritematoso o célula LE", la cual ha sido utilizada durante muchos años. Actualmente el diagnóstico se basa en que los pacientes presenten al menos 4 manifestaciones diferentes de las 11 descritas en los criterios de

diagnóstico elaborado desde 1982 por la Asociación Reumatológica Americana. (Tan E, 1982)

La enfermedad normalmente exhibe síntomas a nivel de la nariz y las mejillas, como un eritema malar con forma de alas de mariposa. En griego "*erythro*" que significa rojo. Y más extraño todavía es el informe que indica que el término lupus no proviene directamente del latín, sino de un estilo francés de máscara (loup=lobo de carnaval) que las mujeres usaban alrededor de los ojos (Quevauvilliers & Léon, 2004).

3. Epidemiología

La prevalencia del LES afecta a todas las razas, edades y sexos (Balow JE., 1999), en América del Norte y Europa Septentrional se ha registrado una prevalencia de 40 por 100,000 habitantes, por otra parte predomina en la raza negra y más del 90% de los casos corresponden a mujeres, en asiáticos existe 33 a 57 casos por 100,000 habitantes y en caucásicos la prevalencia fluctúa entre 14 a 50 por 100,000 habitantes, afectando a 1 de cada 4000 personas en Estados Unidos (Rahman A., 2008) (Rojas, 2012) (Hochberg M., 1997).

El LES afecta más a mujeres, el 90% de los casos se presenta en un intervalo de edad de 13 a 30 años (Gordillo G., 1996), con una relación de 9 a 10 entre el género femenino y masculino en adultos por lo que se asume que las hormonas sexuales desempeñan un rol importante en la aparición de la enfermedad. (Loredo A., 1996) (Lang B., 1993)

El LES parece estar más extendido entre mujeres africanas, asiáticas, hispanas y nativas americanas, pero esto podría deberse a los factores socioeconómicos. Las personas con parientes ya sean padres o hermanos que sufren de LES, artritis reumatoide o púrpura trombocitopénica trombótica tienen un riesgo ligeramente más elevado de padecerlo que la población general y solo el 5% de los niños nacidos de padres con lupus desarrollará la enfermedad. (Lupus Foundation of America, 2008).

De acuerdo a los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1971 había una supervivencia solo del 50% de los pacientes con nefritis lúpica después de 5 años. A principios de los noventa fue de 82% y en la actualidad continúa mejorando. Esto se debe a que ahora se conoce mejor la enfermedad por los avances logrados en el diagnóstico y tratamiento del LES, permitiendo la realización de diagnóstico más temprano. (Pistiner M., 1991) (Ginzler EM., 1988).

4. Etiología

Hasta el momento no se conoce con exactitud la etiología de la enfermedad pero la heterogeneidad de sus manifestaciones clínicas refleja la multiplicidad de alteraciones genéticas, hormonales e inmunológicas que contribuyen a la enfermedad clínica (Aranow C., 2008) y se observa que hay factores asociados como:

a) Factores endócrinos

En el caso de LES se presenta mayormente en mujeres, estableciéndose en adultos que la relación de afectación mujer a varón es de 9-10:1. (Loredo A.,

1996) (Lang B., 1993) Esta predisposición parece estar ligada al uso de píldoras anticonceptivas que contienen estrógenos los cuales tienen diferentes efectos sobre el sistema inmune. La desregulación resultante de la actividad de los linfocitos, parece impedir el efecto inmunomodulador de las hormonas sexuales (Verthelyi D. P. M., 2001). Se ha demostrado que los estrógenos inhiben a los linfocitos T supresores, incrementando la actividad de las células T-helper, conllevando al aumento de la maduración de las células B e incrementando, de esta manera la producción de anticuerpos, “autoanticuerpos” (Stimpson WH., 1988).

En concreto los estrógenos se han propuesto como causante de la enfermedad, ya que favorecen el incremento de la formación de anticuerpos anti-DNA y aumentan la gravedad de la enfermedad. (Petri M., 2008) además promueven la pérdida de la tolerancia en ratones sin predisposición genética para LES, facilitan el aumento en la expresión de Bcl-2 y el aumento de la expresión de CD40L en LT lo que conlleva a la supervivencia de LB autorreactivos. Así, los estrógenos facilitan la maduración de LB autorreactivos y patogénicos (Aranow C. 2008; Petri M. 2008).

Los niveles de prolactina también ha sido asociados a LES, la hiperprolactinemia sería una causa de la presentación de la enfermedad. (Walker SE., 2000). El primer reporte de hiperprolactinemia asociada a LES fue realizado en ocho hombres lúpicos, en el año 1987, encontrando concentraciones de prolactina sérica significativamente elevadas (Jara-Quezada L., 1991).

Jara Quezada y otros reportaron una frecuencia de hiperprolactinemia de un 22 % en pacientes con LES. (Jara-Quezada LJ., 2004) Mientras que otros

investigadores encontraron un 20% de hiperprolactinemia en mujeres jóvenes con LES que tenían altos niveles de anticuerpos anti-ADN de doble cadena (Ronchez MV., 2001). Esta hormona cumple acciones autócrinas y paracrinas a nivel del sistema inmune, en células Natural Killer (NK) contribuye a la proliferación, diferenciación y respuesta de actividad asesina inducida por linfocinas (LAK) y estimula la síntesis de factor de transcripción regulador del interferón gama (IFN- γ), en Granulocitos, estimula la expresión del gen del factor de transcripción regulador del interferón 1 (IRF-1) y la síntesis de la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS), en linfocitos estimula la inmunidad celular, proliferación y síntesis de INF- γ y sus receptores, inhibe la apoptosis, regula también la síntesis de la iNOS y estimula la expresión del gen de IRF-1, por último en monocitos induce la diferenciación y efectividad de la presentación antigénica y regula la expresión de los receptores del factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF) (Méndez I., 2005).

b) Factores ambientales o físicos

Una persona genéticamente susceptible puede necesitar exposiciones a múltiples estímulos ambientales previamente en la vida antes de cruzar el umbral y desarrollar la enfermedad clínica.

En relación a estos factores, Bollain (2001) ha demostrado que la exposición a la luz solar desencadena o agrava las lesiones cutáneas en LES, ya que éstas se presentan habitualmente en zonas expuestas al sol en el cual la fracción ultravioleta de 290-320 nm (UV-B) induce daño al DNA de las células epidérmicas, con la probable expresión de antígenos ocultos, que en presencia de autoanticuerpos inducen la formación de complejos inmunes *in*

situ. Estos quedan atrapados en la unión dermoepidérmica, que por IFI se puede observar la banda lúpica característica y también se observa cuerpos citoides en la dermis papilar, depósitos de IgG, IgM, C3 y fibrinógeno en biopsias de piel de pacientes con LES (Bollain y Goytia JJ., 2001) (Chan LS., 1998) (Provost TT., 1993). Hruza (1993) indica que la piel que es expuesta a la luz solar permite que la fracción UV-B penetre la epidermis y sea absorbida en la parte superior de la dermis, en tanto que la irradiación UV-A penetra hasta lo más profundo de la dermis y la melanina es el principal cromóforo, el cual absorbe longitudes de onda que van desde 350 a 1200 nm. La luz absorbida puede producir cambios químicos en un proceso que se llama fotoquímica. El daño tisular post-irradiación es mediado por citoquinas inflamatorias que son producidas por los linfocitos y por células de la piel como los queratinocitos y fibroblastos (Hruza LL., 1993). Durante el proceso inflamatorio inducido por radiación ultravioleta (R-UV) hay un aumento drástico en la producción y secreción de los niveles de Interleucina-1 (IL-1), de Interleucina-1-alfa (IL-1- α), Interleucina-1-beta (IL1- β), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Konodo S., 1994) (Rosette C., 1996)

Entre los varios factores infecciosos predisponentes a lupus, se menciona a varios virus, entre los que se destaca: el virus de Epstein-Barr (VEB). Se ha demostrado que el virus VEB tiene asociación con el inicio de LES. En un estudio caso control realizado por James JA., et al., en el año 2006 se evidenció que en niños y adultos jóvenes, los anticuerpos anti VEB estaban presentes en el 99% (116 de 117) de pacientes con LES en comparación con el 70% (107 de 153) de los controles involucrados en el estudio (James JA., 2006).

El VEB favorece la autoinmunidad a través de la síntesis de Interferones tipo 1 ($\text{INF-}\alpha$ e $\text{INF-}\beta$) por las Células Dendríticas (DC), la activación de LB, la reactividad cruzada entre proteínas como el antígeno nuclear 1 Epstein-Barr (EBNA-1) y los autoantígenos SmB y SmD1, Ro y La. Harley (2006) indica que además, el VEB expresa una proteína similar a la IL-10, que probablemente estimule la producción de anticuerpos; una proteína homóloga a Bcl-2 que permite resistir la apoptosis de las células B infectadas, y proteínas latentes de membranas (LMP1 y LMP2a) que inhiben la apoptosis y promueven la supervivencia de LB a través de la homología funcional entre LMP1 y la molécula coestimuladora CD40 (Abbas A., 2006) (Harley JB., 2006) (Rönblom L., 2006).

El virus humano poliomavirus BK (BKV) también se encuentra asociado a LES, que tiene como órganos diana al cerebro y riñón (Chester PM., 1983). Este virus afecta deteriorando el sistema inmunológico, siendo un patógeno oportunista en pacientes inmunodeprimidos. El estudio realizado por Sundsfjord et al., muestran una relación de este virus con la producción de anticuerpos anti-DNA y antígenos "T" del poliomavirus, que son antígenos que requieren de la participación de LT para que estimule a los LB a que produzcan anticuerpos específicos. Estos autores realizaron el estudio en muestras de orina de 44 pacientes lúpicos y muestras de orina de 88 personas aparentemente sanas, Los resultados obtenidos mostraron los pacientes sanos eran negativos para BKV y que 7 (16%) de 44 muestras de pacientes lúpicos eran positivas para BKV (Sundsfjord A., 1999).

c) Factores químicos

Muchas veces el uso de fármacos puede inducir a una patología parecida a LES llamado Lupus Eritematoso Sistémico Inducido por Fármacos (LESIF). Este estado es reversible y normalmente se produce en pacientes que han recibido tratamiento para alguna enfermedad diferente a lupus por largos periodos de tiempo (entre 3 a 6 meses). Pero, una vez que se suspende esta desaparece y este tipo de lupus imita al lupus sistémico que sería causado por una reacción de hipersensibilidad a un medicamento. Generalmente, una vez que el paciente ha dejado la medicación que desencadenó el episodio, no se repiten ni signos ni síntomas de lupus (Pretel M, 2012) (Wright B., 2010).

En este tipo de LES inducido por medicamento el patrón de Anticuerpos Antinucleares (ANA) es normalmente homogéneo, ya que estos anticuerpos tienen como blanco las histonas y una diferencia es que estos ANA no tienen capacidad de fijar complemento. (Borchers AT., 2007). En la actualidad no existen criterios de diagnóstico que estén estandarizados, para el diagnóstico de LESIF se han propuesto ciertos criterios:

- Pacientes con tratamiento continuo con un fármaco, por lo menos de tres meses.
- No tener historia clínica de haber padecido LES antes del tratamiento con el fármaco.
- Presentación de un cuadro caracterizado de fiebre, artritis, malestar general y mialgias.

- Presentar anticuerpos antihistona (en especial de tipo IgG frente al complejo ([H2A-H2B]- ADN) y anti-ADNss. Y no presentar anticuerpos anti-ADNs y anti-ENA. (Pretel M., 2012)

Actualmente se han descrito cerca de 40 medicamentos que pueden causar LESIF, si bien los más comunes según Wright (2010) son la procainamida, hidralazina, quinidina, cloranfenicol y la isoniazida, existen muchos más como podemos observar en la tabla N° 1 (Wright B., 2010) (Rubin R., 2002).



Tabla N°1 Fármacos descritos como potencialmente implicados en casos de lupus eritematoso cutáneo subagudo inducido por fármacos. (Pretel M., 2012)

Fármacos	Alto riesgo (> 5%)		Bajo riesgo (< 5%)
Antifúngicos	Griseofulvina Terbinafina		
Antihipertensivos	Antagonistas de los canales del calcio Betabloqueantes Diuréticos	Diltiazem, verapamilo, nifedipino nitrendipino Oxprenolol, acebutolol	Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (cilazapril, captopril)
Quimioterápicos			5-Fluorouracilo, capecitabina
Antiácidos	Docetaxel	Hidroclorotiazida, Espironolactona	Omeprazol, lansoprazol, ranitidina
Antiepilépticos			Fenitoína, oxcarbamazepina
Antimaláricos			Hidroxicloroquina
Inmunomoduladores			Etanercept, infliximab, efalizumab, INF- α
Hipolímiantes			leflunomida
Antiinflamatorios			Pravastatina, simvastatina
Antidepresivos			Naproxeno, piroxicam
Antidiabéticos			Bupropión
Antiarrítmicos			Sulfonilurea (gliburida)
Benzodiacepinas			Procainamida
Antiagregantes			Tetrazepam, lormetazepam
Antiestrógenos			Ticlopidina
Miscelánea			Tamoxifeno D-Penicilamina, insecticida

d) Factores genéticos

El primer mecanismo en la aparición del LES puede que sea por predisposición genética. Las investigaciones de Behrman et al. (2004)

indican que el lupus eritematoso sistémico puede tener un vínculo genético (Behrman ., 2004).

Rojas et al., muestran que entre los genes asociados a susceptibilidad a lupus se encuentran los genes codificados en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) que muestran la asociación genética más importante, especialmente los genes codificados en la región clase II del CMH y los loci directamente implicados son el locus DRB1*15 y DRB1*16 de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) y el locus HLA-DQB1*03. Otros estudios indican que los alelos HLADRB1*03:01 y el HLA-DRB1*15:01 estarían asociados a LES (Fernando MM., 2007). Los alelos HLA-DRB1*08:018 and HLA-DRB1*14:01 fueron también asociados a LES en el estudio realizado por Barcellos et al., el año 2009 (Barcellos LF., 2009).

El locus HLA-DQ también presenta alelos asociados, como en el estudio de Morris et al., en Europa, que muestran que el loci HLA-DQA1*01:02 estaría asociado a LES (Morris DL., 2012). Un estudio realizado en el Reino Unido y Estados Unidos indican que los alelos HLA-DQB1-DQA2 y HLA-DRB1*1501 como un factor de riesgo de desarrollar lupus (Rioux JD., 2009).

Quispe C., (2006) en su estudio indica que las personas que portan el antígeno HLA-DR2 presentan mayor riesgo de producir anticuerpos anti-DNA de doble cadena o bicatenario, aquellos con HLA-DR3 producen anticuerpos anti SS-A y anti SS-B y quienes poseen HLA-DRB1*04 y DRB1*03 generan anticuerpos anti Sm y anti-RNP y que entre otros factores genéticos también se encuentra la carencia de los factores C1r, C1s, C4, C2 ó C3 (Quispe C. 2006).

Otra sería la deficiencia de una enzima, la endonucleasa sérica DNasa 1 la cual es muy importante en la degradación de las trampas extracelulares de neutrófilos (NET) que se forman a partir de los neutrófilos para contener a los microorganismos, en este fenómeno biológico el núcleo de los neutrófilos pierde su forma lobulada, se homogenizan la eucromatina y la heterocromatina y hay ruptura de su membrana nuclear para que finalmente se produzca la ruptura de la membrana celular y la liberación al medio extracelular las redes, este mecanismo se denomina NETosis. Se ha observado que los pacientes con LES presentan una deficiencia de la degradación de las NET y se ha propuesto dos mecanismos, en el primero se observa una función ineficaz de esta enzima en la degradación de las NET y en el segundo, es la presencia de inhibidores de esta enzima (Fuchs TA., 2007).

Otro gen que ha sido asociado a LES es el gen que codifica la ECA. Este gen de la ECA, se encuentra en el cromosoma 17q23 y comprende 21 Kb, que acelera la producción de una proteína importante en el sistema renina-angiotensina y el sistema de calicreína-quininógeno (Pullmann R., 1999).

5. Patogénesis de la enfermedad

Los anticuerpos patógenos en la enfermedad son de afinidad elevada a los LT y específicos de los componentes nucleares. Según Mejía (2004) los LB específicos del ADN propio se unen a complejos formados por proteínas nucleosómicas y ADN, procesan las proteínas y presentan los epítopes peptídicos a los LT cooperadores, con la consiguiente producción de autoanticuerpos anti-ADN pero no se sabe si el defecto patogénico primario

(pérdida de la tolerancia central o periférica) afecta a los LB, LT cooperadores o a ambos.

Cuando la capacidad de aclaración de complejos inmunes es dañada, conduce a un proceso de apoptosis y finalmente a la necrosis secundaria de las células, estas liberan fragmentos nucleares como potenciales autoantígenos, así como señales de peligro externas induciendo la maduración de las células dendríticas, ya que han perdido la integridad de sus membranas. (Rojas W., 2012) Entonces, la autoinmunidad posiblemente resulta por la prolongada exposición a los autoantígenos nucleares e intracelulares provenientes de las células apoptóticas y necróticas secundarias, produciendo además una abrogación de la tolerancia de los LB y LT hacia células apoptóticas. Los linfocitos son activados por estos autoantígenos lo cual produce inflamación y la producción de autoanticuerpos. El proceso anteriormente mencionado es iniciado por las células plasmáticas (Rutstein J., 2000).

a) Daño renal producido por LES

Como se mencionó anteriormente, LES produce daño orgánico y el riñón es uno de los órganos más afectados, predominando la inflamación, el depósito de anticuerpos, complejos inmunes y factores del complemento (Koffler D., 1967).

En 1967, Koffler determinó, que los pacientes lúpicos que desarrollan nefritis lúpica, contenían anticuerpos anti-DNA de doble cadena y estos anticuerpos tenían la capacidad de unirse a células y tejidos de los pacientes (Koffler D., 1967). Existen dos teorías principales para el daño renal por estos

anticuerpos, ambas mencionan que por sí solos no establecen el sitio del daño tisular (Berden JH., 1999).

La primera indica que principalmente el DNA de doble cadena se encuentra en forma de nucleosomas, que son fragmentos de cromatina que se liberan de las células que hicieron apoptosis (Enríquez-Mejía MG., 2013). Berden et al. han propuesto que estos anticuerpos en pacientes con LES, migran a nucleosomas para entrar al torrente sanguíneo, así estos complejos anticuerpo-nucleosoma van a depositarse a la membrana basal glomerular (Berden JH., 1999). Estos complejos activan el sistema de complemento por la vía clásica lo que da inicio a la glomérulo nefritis (Enríquez-Mejía MG., 2013)

La segunda teoría plantea que los anticuerpos anti-DNA de doble cadena, antinucleosoma o ambos ingresan al riñón unidos a proteínas y una vez dentro producen efecto patogénico sobre las células renales, esto es un ejemplo de polirreactividad en el que anticuerpos similares pueden llegar unirse a diversos antígenos, por el hecho de tener epítomos compartidos (Enríquez-Mejía MG., 2013). En el riñón los antígenos blanco son elegidos por la presencia de alfa-actinina, que es esencial para el funcionamiento de los podocitos, que son muy importantes en la filtración glomerular, presentándose proteinuria y las características histológicas de la glomerulonefritis (Michaud JL., 2006). Pero, es necesario señalar que los anticuerpos anti-alfa-actinina no son específicos para LES y solo funcionan como un marcador de actividad. (Becker-Merok A., 2006) (Mason LJ., 2004)

b) Daño a SNC producido por LES

El sistema nervioso es también afectado, por la pérdida de la tolerancia por parte del sistema inmune (SI), existiendo manifestaciones neurológicas que ocasionan psicosis, convulsiones, accidentes cerebro-vasculares, mielitis transversa, neuropatía craneal y periférica, corea, pseudotumor cerebral, etc. (Morales AR., 1999). Actualmente, no se sabe exactamente como se producen estos daños, pero hay evidencia de una gran relación entre el SI y el neuroendocrino ya que estos comparten una serie de mediadores tanto a nivel endógeno como exógeno (Eiguchi K., 2002).

Estos sistemas se integran a diferentes niveles, como las hormonas clásicas y los neurotransmisores que se unen a los receptores específicos de las células del SI ayudando en su regulación, la producción de citoquinas pueden actuar sobre células del sistema neuroendocrino, alterando su función, las hormonas liberadas por el hipotálamo, así como los estímulos que manda el SI actúan sobre linfocitos ayudando la liberación de neuropéptidos, que podrían modificar la actividad del sistema neuroendócrino y algunas células del SI producen citoquinas o péptidos semejantes a las citoquinas, que son capaces de modular la función de las células del SI (Eiguchi K., 2002).

En el daño producido al SNC por LES se indican dos mecanismos, uno producido por una vasculopatía que puede ser inflamatoria o no, y el otro por efecto citotóxico de anticuerpos contra las neuronas como los antineurofilamentos y los anti P ribosomales. La vasculopatía inflamatoria puede mostrarse bajo dos modalidades, que son por depósito de complejos inmunes en los vasos sanguíneos produciéndose una vasculitis necrotizante

tipo poliarteritis, pero este tipo de daño no es frecuente en pacientes con LES (Calabrese L., 1997) (West S., 1995), la otra modalidad es por leucotrombosis que es la vasculopatía mas frecuente del SNC y no existen depósitos de complejos inmunes en vasos sanguíneos, este proceso se parece al fenómeno de Shwartzman en que la IL-1 y el TNF, estimulan la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de las células endoteliales, permitiendo la unión de neutrófilos y plaquetas, que son estimulados por complejos inmunes circulantes lo que conduce a daño microvascular difuso (Morales AR., 1999).

6. Características clínicas

La causa subyacente de la enfermedad aun no se conoce completamente, pero se caracteriza por la aparición de manifestaciones clínicas conjuntamente con la presencia de autoanticuerpos en sangre, formando complejos inmunes que se alojan en diferentes órganos produciendo posteriormente daño a estos.

Las manifestaciones clínicas más importantes consisten en erupciones cutáneas, artritis y glomerulonefritis, la gravedad varía entre leve e intermitente o persistente y fulminante. En la tabla 2 se muestran las manifestaciones clínicas más frecuentes (Schweinerberg J., 2009).

Tabla N°2. Manifestaciones clínicas características de Lupus Eritematoso Sistémico. (Marshall J. 2002)

Manifestaciones clínicas	Frecuencia %
Dolores articulares (astralgias)	95
Fiebre mayor a 38° C	90
Artritis (inflamación de las articulaciones)	90
Astenia y adinamia	81
Rash en la piel	74
Anemia	71
Afección de los riñones	50
Serositis (inflamación de tejido alrededor de pulmones y corazón)	45
Roncha en forma de mariposa en las mejillas y en la nariz	42
Foto sensibilidad a la luz solar	30
Pérdida del cabello	27
Problemas en la coagulación de la sangre	20
Fenómeno de Raynaud (dedos que se ponen blancos y/o morados con el frío)	17
Convulsiones	15
Úlceras en la boca o en la nariz	12

Esta enfermedad por lo general produce una gran variedad de autoanticuerpos, Thomas (2002) señala que en personas afectadas con lupus pueden producir autoanticuerpos contra DNA, histonas, eritrocitos, plaquetas, leucocitos y factores de la coagulación y la interacción de estos autoanticuerpos con sus antígenos específicos ocasiona diversos síntomas. (Thomas., 2002). Los autoanticuerpos específicos contra eritrocitos y

plaquetas, por ejemplo, puede originar lisis mediada por complemento que conduce a anemia hemolítica y trombocitopenia respectivamente.

Otra característica clínica de esta enfermedad son las células LE, que fueron descritas por Malcom Hargraves y Helen Richmond en el año 1948 por primera vez (Margraves MM., 1948), en el año 1949 Haserick et al., demostraron que en preparaciones de medula ósea de pacientes sanos si se añadía plasma de pacientes con LES se desarrollaba el fenómeno de las células LE y fue la base para postular los mecanismos autoinmunes de la enfermedad. Las células LE son polimorfonucleares (PMN) que han fagocitado material nuclear que se observan como vacuolas homogéneas en la periferia. Ahora se sabe que los ANA penetran e inducen la apoptosis que resulta en fagocitosis de cuerpos apoptóticos por los PMN y los anticuerpos anti ds-DNA impiden la degradación del DNA nuclear (Carrillo RE., 2012).

Si bien la prueba de células LE ha sido una de las primeras pruebas descubiertas para el diagnóstico de LES, esta prueba no tiene la sensibilidad y especificidad suficiente para hacer diagnóstico, porque muchos pacientes lúpicos no presentan la prueba positiva, solo un 50% de la población lúpica presenta esta prueba positiva, por esto se planteo el desarrollo de pruebas de mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la enfermedad (Quintana GL., 2003).

B. RELACION ENTRE EL POLIMORFISMO DEL GEN QUE CODIFICA LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA Y LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

El gen de la ECA contiene un polimorfismo basado en la presencia o ausencia de un fragmento sin sentido, ya que mutaciones conllevan a lesiones de segmentos de ADN de diferentes tamaños, como por ejemplo es el caso de la mutación *mdx* (*Dmd^{mdx}*) en el ratón (réplica de la distrofia muscular de Duchenne en el hombre), en la cual una delección provoca la transcripción de un ARN mensajero anormal y la falta de distrofina, una proteína importante para el funcionamiento del músculo. En el caso de inserciones, el genoma de los mamíferos contiene miles de copias de distintos tipos de secuencias de ADN llamadas retroposones (en inglés, *retroposons* o *trans-posable elements*) y estas secuencias son también una fuente de mutaciones por inserción. (Benavides FJ., 2003)

Rigat et al. observó una asociación del polimorfismo del gen que codifica la ECA con la presencia de LES, estableció que el polimorfismo genético debido a una inserción (I) o delección (D) en el intrón 16 de este gen y las manifestaciones clínicas asociadas estaría asociado al genotipo D/D o al alelo D, como Hussain et al. (2010) nos muestra en su estudio en población Pakistaní encontrando un 54% del genotipo D/D en pacientes con LES (Rigat B., 1990) (Hussain N., 2010).

Enzima convertidora de angiotensina

El gen ECA codifica una enzima que es una dicarbopeptidasa que utiliza como cofactores al Zn^{2+} y Cl^- para realizar sus diferentes funciones, Hubert

(1991) indica que la ECA es producida por varios tejidos como el pulmón, el endotelio, el riñón, el corazón y los testículos (Hubert C., 1991). Su función principal es convertir la angiotensina I en angiotensina II, esta tiene acción vasoconstrictora potente, esto se da a nivel del endotelio vascular de algunos órganos (pulmón, riñón, corazón, sistema vascular, células musculares lisas) y en el plasma sanguíneo. (Baudin B., 2002)

La secuenciación del gen de la ECA en el hombre, comprende 21000 pares de bases, que se localizan en el cromosoma 17 (17q23) y está compuesto por 26 exones y 25 intrones. Rigat et al., (1990) indica que en el intrón 16 se ha detectado un polimorfismo referido a la presencia/inserción (I) o ausencia/delección (D) de una secuencia Alu repetitiva la cual comprende 287 pares de bases (Sayed-Tabatabaei FA., 2006) (Rigat B., 1990). Rigat et al., y Ueda et al. (1995) afirmaron que los sujetos que presentan el polimorfismo de D tienen niveles serológicos mas altos de ECA en sangre que aquellos que portan el alelo I (Rigat B. 1990) (Ueda et al., 1995).

1. El sistema renina-angiotensina aldosterona

El sistema renina-angiotensina-aldosterona se pone en marcha cuando la renina actúa sobre el angiotensinógeno (Garrison JC., 1991). Esta es una alfa2-globulina circulante en plasma y constituye el sustrato principal de la renina, no el único. La síntesis y secreción del angiotensinógeno se produce a nivel hepático de forma continua, aunque el RNA que codifica esta proteína es también abundante en el tejido adiposo, riñón y algunas regiones del sistema nervioso central. Los niveles de ECA se incrementan por la acción de diversas hormonas, entre las que destacamos los glucocorticoides, estrógenos y tiroideas (Fernandez C, 1995).

La renina humana es una aspartil-proteasa que se sintetiza en forma de pre-prohormona de gran tamaño en las células del aparato yuxtaglomerular, situado en la pared de las arteriolas aferentes del riñón y es liberada a la circulación ante estímulos tales como: la disminución de la natremia, la hipovolemia, la hiperkalemia y los niveles elevados de angiotensina II. La prorrenina, que deriva de una pre-prorrenina inicial, tiene relativamente poca actividad biológica. La renina plasmática convierte el angiotensinógeno en angiotensina I, por sí misma no tiene actividad enzimática (Fernández C., 1995).

En el endotelio vascular de algunos órganos (pulmón, riñón, corazón, sistema vascular, células musculares lisas) y en el plasma, la angiotensina I es convertida en angiotensina II gracias a la ECA lo que nos da una idea de la importancia de su actividad en el mantenimiento de la presión sanguínea, la volemia y el contenido electrolítico del organismo (Fernández C., 1995).

2. Acción de la angiotensina II

La angiotensina II es un potente agente vasoconstrictor, según Fernandez & Gallego (1995) es capaz de aumentar la resistencia vascular periférica y como consecuencia aumentar la tensión arterial y la post-carga. Actúa de forma específica sobre las arteriolas, aunque tiene acción también sobre las vénulas. La contracción es más elevada en el territorio esplécnico y renal que en el músculo esquelético o el cerebro.

A nivel renal también cumple una acción en el funcionamiento del riñón como:

- Disminución de la filtración glomerular.

- Aumento de la presión intraglomerular.
- Aumenta la presión arterial al desencadenar directamente la vasoconstricción y al estimular la secreción de aldosterona, lo cual favorece la retención de sodio (Na⁺⁺).

En la glándula suprarrenal, la angiotensina II estimula la secreción de aldosterona, que actúa a nivel renal produciendo una reabsorción de sodio y agua, con incremento de la excreción de potasio. En consecuencia, hay un aumento de la volemia, la presión arterial y la precarga que es la cantidad de sangre que el corazón debe bombear con cada latido y representa el volumen de sangre que estira las fibras musculares ventriculares (Fernández C., 1995)

La angiotensina II también cumple la función de molécula pro-inflamatoria, que incrementa y perpetua la respuesta inmune en los tejidos renales y no renales, también se ha demostrado que es un importante mediador de la progresión de la enfermedad renal en los pacientes lúpicos (Parsa, et al., 2002).

III. ANTECEDENTES GENERALES SOBRE EL PROBLEMA

El LES es una enfermedad que afecta entre 300 a 400 pacientes por cada 100.000 mil habitantes en todo el mundo (Molina J., 2000), se ha realizado análisis del polimorfismo del gen de la ECA y su asociación con LES. Estos estudios han revelado que el individuo sano con el genotipo D/D puede ser resistente al tratamiento con inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (Ueda, 1995). Sato et al. (1999) mostró que aquellos individuos que presentaban el genotipo I/I presentaron un aumento significativo en la

actividad de LES y un aumento sérico de los niveles de Ds-DNA en aquellos con el genotipo D/D.

Otro estudio realizado por Parsa et al. (2002), con datos estadísticamente significativos demostró que existe asociación en el polimorfismo de I/D de ACE entre familias no caucásicas (61% de transmisión, con una $P = 0,026$).

Contrariamente a lo reportado por Sato, Hussain (2010) en población pakistaní, analizó 61 pacientes con LES y 61 controles, determinando que la frecuencia de D/D era elevada en los pacientes con LES con respecto a la de los controles y observó que la frecuencia del gen ECA no estaba en equilibrio de ligamiento. La frecuencia de los genotipos D/D, I/D y I/I fue de 54, 3 y 4% en los pacientes con LES y 23, 32 y 6% respectivamente en las personas sanas utilizadas como controles.

Prkacin et al. (2001) determinaron que la ECA estaba asociada a LES ya que encontraron mayor frecuencia del genotipo D/D la población estudiada, las frecuencias de D/D, I/D, y I/I en pacientes con LES fue de 50, 28, 22% y en controles sanos 25, 50, 25% respectivamente. (Prkacin I., 2001)

Pullman et al. (1999) encontraron en la República de Eslovaquia que el alelo D se encontraba en mayor frecuencia en pacientes lúpicos que en los controles, los pacientes con LES presentaban 62,9% y los controles 52%. Tassiulas et al. (1998) hallaron resultados opuestos en afroamericanos en los que la frecuencia del alelo D era más baja en pacientes lúpicos (59%) que en los controles (72,4%) (Tassiulas et al., 1998).

En Bolivia no a la fecha no existen publicaciones científicas reporten el polifermismo del gen de la ECA en la población boliviana o en estudio de

asociación con enfermedades, este es el primer trabajo que intenta reportar estos aspectos.

IV. JUSTIFICACION

El LES es una enfermedad autoinmune crónica caracterizada por una serie de anomalías a nivel del sistema inmune, se caracteriza por la producción de autoanticuerpos contra diferentes componentes proteicos de la membrana celular y del núcleo celular, como se mencionó anteriormente, presenta diferentes manifestaciones clínicas que van desde un eritema malar, disminución de los valores hematológicos, dolores articulares hasta daño multiorgánico severo a nivel neurológico, cardíaco o renal entre otros.

Debido a las graves consecuencias que produce la enfermedad en los pacientes a nivel mundial y el incremento de nuevos casos en nuestro medio, se están aunando esfuerzos para mejorar las herramientas de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Así como también, en la identificación de posibles factores genéticos o medioambientales que predisponen a la enfermedad. El mejor conocimiento de los factores ambientales, como el polimorfismo genético, permitirán a los equipos médicos en general implementar medidas de medicina preventiva para disminuir la incidencia de la enfermedad, brindando información y tratamiento oportuno a los pacientes susceptibles a LES.

Por lo antes expuesto, el presente estudio tiene como objetivo determinar mediante el uso de la prueba molecular de PCR la asociación genética entre el polimorfismo genético en el intrón 16 del gen codificante de la ECA con LES y el riesgo a sufrir NL. Se hace este planteamiento debido a re ha

reportado que los individuos que portan el alelo D ya sea en homocigosis (D/D) u heterocigosis (I/D) tienen mayor predisposición a padecer LES y NL.

Con los resultados del estudio se pretende dotar de una herramienta de laboratorio que aporte en la toma de decisiones referidas al ámbito de la medicina preventiva y asistencial, que permita mejorar la sobrevida de los pacientes afectados por LES y retarde la aparición del daño orgánico terminal que produce esta enfermedad, factores que al final repercutirán en que el paciente lúpico mejore así su calidad de vida.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las estadísticas del Laboratorio de Histocompatibilidad en Inmunogenética del Instituto SELADIS, en los últimos años han evidenciado que existe un elevado número de casos de LES que se registran cada año, como ejemplo entre los años 2010 y 2011 se diagnosticaron 141 y 146 casos nuevos de LES respectivamente y el año 2012 se diagnosticaron 134 casos nuevos. El LES al igual que el resto de las enfermedades autoinmunes, no tiene cura, administrándose solo tratamiento de sostén o paliativo a los pacientes lúpicos. A la fecha se conoce que se puede retardar la aparición de la enfermedad si se toman las acciones de medicina preventiva oportunamente. Por lo tanto, es de gran importancia poder determinar si un paciente tiene el genotipo de susceptibilidad a la enfermedad.

VI. HIPÓTESIS

El polimorfismo del gen de la ECA a nivel del intrón 16 está asociado a la susceptibilidad a LES y al riesgo a desarrollar Nefritis Lúpica.

VII. OBJETIVOS

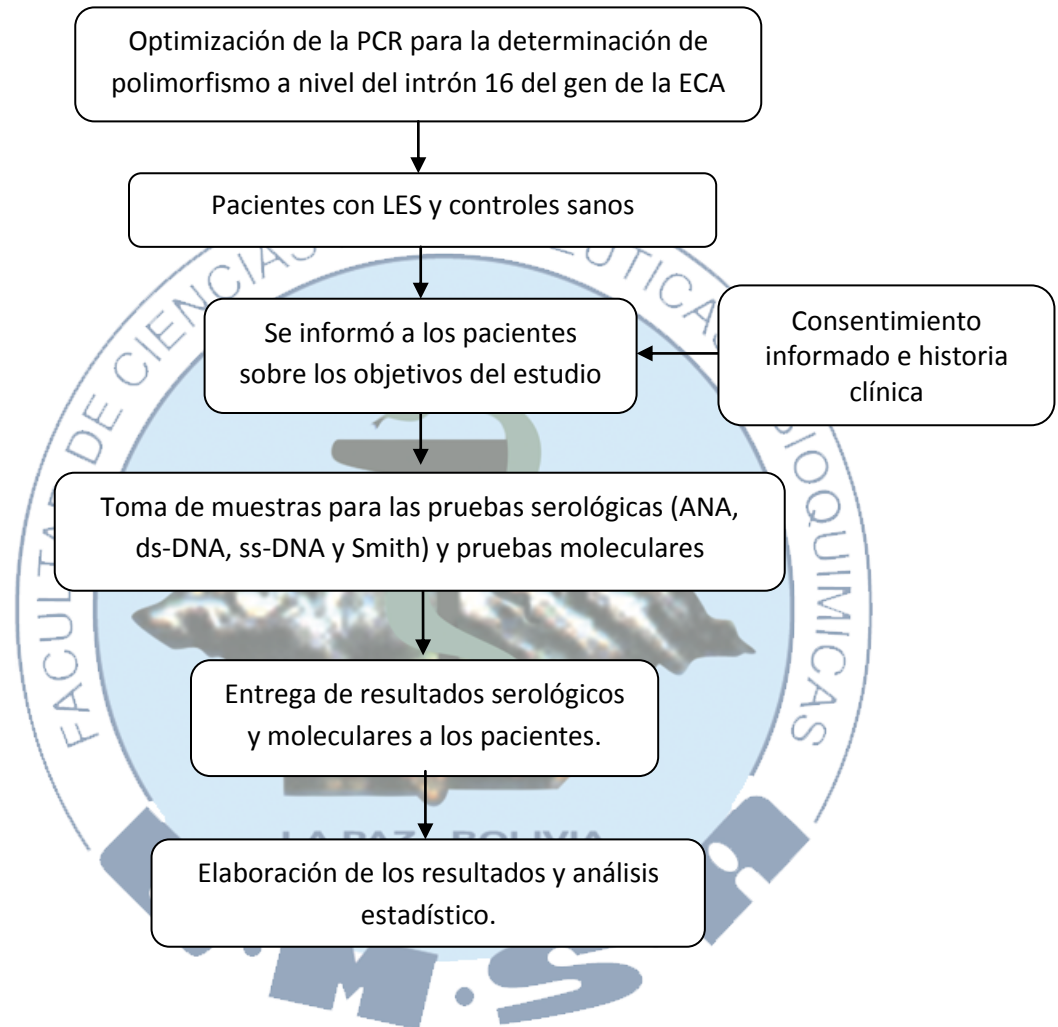
A. OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación del polimorfismo D/D, I/I, I/D del intrón 16 del gen que codifica la Enzima Convertidora de Angiotensina con la susceptibilidad a LES y con el riesgo de que los pacientes lúpicos desarrollen nefritis lúpica.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Optimizar la prueba de PCR para la identificación de inserción o delección de un fragmento genético en el intrón 16 del gen que codifica la enzima convertidora de angiotensina.
- b) Determinar la frecuencia del polimorfismo genotípico (I/I), (I/D) o (D/D) del gen que codifica la enzima convertidora de angiotensina en pacientes con lupus eritematoso sistémico.
- c) Asociar la frecuencia de los genotipos (I/I), (I/D) o (D/D) con la presencia de nefropatía lúpica.
- d) Asociar las características clínicas y serológicas (ANA, DNA-ds, DNA-ss y Anti-Smith) de los pacientes lúpicos con el polimorfismo del gen que codifica la enzima convertidora de angiotensina.

VIII. DISEÑO METODOLÓGICO



A. TIPO DE ESTUDIO

El trabajo de investigación corresponde a un estudio caso-control.

B. POBLACIÓN EN ESTUDIO

La población en estudio estaba conformada por 172 muestras, de las cuales 87 provenían de pacientes que tenían diagnóstico clínico y de laboratorio de LES y 85 muestras de pacientes aparentemente sanos que fueron usados como controles. Los pacientes fueron seleccionados por conveniencia por lo que no se requirió el cálculo de tamaño muestral.

IX. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

A. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes de cualquier edad y sexo con diagnóstico de LES con o sin nefropatía lúpica.

El grupo control estaba constituido por personas “aparentemente sanas”, que tuvieron serología negativa para LES y otras enfermedades autoinmunes.

B. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyeron del estudio a aquellos pacientes que presentaron otra patología autoinmune diferente a LES. Se excluyeron a mujeres embarazadas.

C. MATERIAL BIOLÓGICO

A los pacientes involucrados en el estudio se les tomó 5ml de sangre venosa en un tubo Vacutainer con anticoagulante EDTA.3K. Para determinar los

marcadores serológicos de laboratorio para catalogarlo como paciente caso (con LES) o control (sin LES) se utilizó el plasma, a partir del paquete globular se realizó los estudios moleculares.

D. TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño muestral fue determinado por el número de pacientes que asistieron al laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS que tuvieron diagnóstico clínico de laboratorio de LES en el periodo de diciembre 2012 a noviembre 2013 y que además dieron su consentimiento informado para participar en el estudio. El grupo control estaba constituido por un número equivalente de pacientes a quienes se les había descartado LES quienes también dieron su consentimiento informado para ser involucrados en el estudio.

E. ASPECTOS ÉTICOS

Todos los individuos que formaron parte del presente estudio fueron informados acerca de los objetivos, el alcance, así como también de las posibles complicaciones que pudieran resultar de la toma de muestra. Para lo cual, se obtuvo su consentimiento informado. El paciente en ningún momento pagó monto alguno por las pruebas de laboratorio que se le realizaron. También, se entregó al paciente una copia de los resultados de las pruebas realizadas, tanto serológicas como moleculares.

X. CONTEXTO Y LUGAR

El presente estudio fue desarrollado en los ambientes del laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética ubicado en el piso 6to del Instituto SELADIS de la FCFB de la UMSA. El laboratorio cuenta con todos los materiales y equipamientos necesarios para la realización del estudio.

A. MÉTODOS

9. Optimización de la prueba de PCR para la identificación de inserción o delección de un fragmento de 287 pares de bases en el intrón 16 del gen ECA.

Los polimorfismos del gen de la ECA están siendo utilizados como uno de los marcadores de predisposición a enfermedades más estudiados del eje renina-angiotensina. La optimización de la PCR para determinar la posible asociación de inserción o delección de un fragmento de 287 pb en el intrón 16 del gen de la ECA con susceptibilidad a LES se realizó en dos pasos: a) la PCR ECA1, permitió identificar la presencia o ausencia de los alelos I o D y b) la PCR ECA2 permitió confirmar la ausencia del alelo I.

La optimización de ECA1 se realizó a partir del método propuesto por *Chiang* (ver tabla 3) realizando las modificaciones y adaptaciones a las condiciones de la PCR propuestas por el autor para adecuarlas a las condiciones de trabajo del laboratorio. Las secuencias de los cebadores que se utilizaron en el estudio fueron: oligonucleótido en sentido 5': 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3', oligonucleótido anti-sentido: 5'-AT GTG GCC ATC ACA

TTC GTC AGA-3'. El producto esperado era un fragmento de 190pb para el alelo inserción y de 490pb para el alelo D.

Las concentraciones y volúmenes de los reactivos para realizar la amplificación fueron: Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM, MgCl₂ 2,0 mM, 0,32 mM de cada desoxirribonucleótido (dATP, dGTP, dGTP y dTTP), 0,5 μM de cada cebador, 0,8 unidades de la enzima Taq DNA Polimerasa (Promega, EUA) y agua para un volumen de reacción de 20 μL. En todas las amplificaciones se utilizó una concentración de 180ng de ADN (+/- 50ng).

Las condiciones de PCR que se utilizó para amplificar el gen ECA1 fueron: desnaturalización inicial a 95°/5 min; 5 ciclos de: 95° C/1 min, 70° C/1 min y 72° C/1 min; 5 ciclos de: 95° C/1 min, 65° C/1 min y 72° C/1 min; 30 ciclos de: 95° C/1 min, 60° C/1 min y 72° C/1 min; elongación final a 72° C/10 min.

Para confirmar la ausencia del alelo Inserción en todos los individuos con genotipo D/D, se realizó la optimización a partir del método confirmatorio que fue propuesto por Shanmugam et al., citado por *Lindpainer*, (ver tabla 3) a la cual se la denominó ECA2 y se esperaba un fragmento amplificado de DNA de 335 pb que confirmaba la presencia del alelo Inserción. En este segundo PCR se utilizaron los cebadores: oligonucleótido en sentido 5': 5'-TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC-3', oligonucleótido anti-sentido: 5'-TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA-3'.

Las concentraciones y volúmenes de los reactivos fueron las mismas que en el anterior caso, con la adición de DMSO al 1%. Las condiciones de la PCR para ECA2 fueron: desnaturalización inicial a 94 °C/3 min; 35 ciclos de 94 °C/30 s, 67 °C/45 s y 72 °C/60 s y una elongación final a 72 °C/10 min.

10. Obtención de material genético humano.

A partir de la sangre venosa tomada con anticoagulante EDTA.3K, se realizó el aislamiento del ADN del paciente mediante el protocolo de obtención del ADN optimizado en el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS que se basa en el uso del kit comercial Wizard Genomic DNA purification (promega, USA). El protocolo de aislamiento de ADN se describe brevemente:

1. Se centrifugó la muestra de sangre con EDTA.K3 a 3000 rpm por 10 min.
2. Se tomó 400 μ L de la interfase del plasma paquete globular y se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo, luego se agregó 900 μ L de Buffer de lisis celular.
3. Se mezcló bien por 20 seg y se incubó por 10 min, se centrifugó a 14000 rpm durante 1,5 min.
4. Se desechó el sobrenadante y se secó suavemente en papel absorbente.
5. Se agregó nuevamente al precipitado 900 μ L de Buffer de lisis y se repitió los pasos 3 y 4.
6. Luego, al precipitado se le agregó 400 μ L de Buffer de lisis de núcleos y 2 μ L de RNAasa, se mezcló bien hasta que el pellet se disgregue.
7. Se tapó con parafilm y se llevó a incubación a 37°C por 30 min en un bloque calentador. Luego se atemperó por 2 min para facilitar una adecuada lisis proteica.
8. Se agregó 130 μ L de Buffer de lisis de proteínas evitando mezclar bruscamente.

9. Se centrifugó a 14000 rpm por 10 min. Y se transfirió el sobrenadante a otro tubo Eppendorf debidamente etiquetado
10. Se agregó 400 μ L de Isopropanol y se mezcló por inversión suave para precipitar el material genético. Luego se centrifugó a 14000 rpm por 1,5 min.
11. Se desechó el sobrenadante y se seco el tubo en papel absorbente.
12. Se agregó 800 μ L de Etanol al 70% mezclando bien por inversión y se centrifugó a 14000 rpm por 1,5 min.
13. Se repitió los pasos 11 y 12 dos veces más.
14. Después de desechar el sobrenadante, se llevó a secar los tubos en bloque calentador a 60°C, durante media hora.
15. Se resuspendió el precipitado con Buffer de resuspensión de ADN, se tapó del tubo con parafilm e incubó en bloque calentador a 65°C por 1 hora o se incubó toda la noche a 4°C.
16. Se hizo la corrida electroforética en gel de agarosa al 2,5% a 150 voltios, 350 mAmp por 30 min mezclando 10 μ L del ADN extraído con 2 μ L de colorante de cargado de muestras Blue/Orange 6X (PROMEGA, USA) con la finalidad de observar la calidad del DNA extraído.
17. Para determinar la concentración del material genético obtenido se cuantificó con ayuda de un espectrofotómetro, utilizando cubetas de cuarzo. Se realizó una dilución 1/10 del material genético obtenido con agua libre de nucleasas para luego hacer la lectura a una longitud de onda de 280/260 nm por tres veces consecutivas. Se sacó el promedio de las lecturas para saber la concentración de DNA obtenido en la extracción. Finalmente, se guardó el material genético a -20°C hasta el momento de su utilización.

11.Revelado de los productos amplificados de la PCR ECA1 y PCR ECA2.

Los amplicones obtenidos se identificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5 % a 150 voltios, 350 mAmp por 30 min. en tampón TBE 1X teñido con SybrGrenn 1/1000. La visualización de los amplicones se realizó con ayuda de un transiluminador UV a una longitud de onda de 254 nm. Los productos esperados para ECA1 eran de 490 pb para Inserción, 190 pb para Delección, y para ECA2 de 335 pb.

12.Asociación de la frecuencia de los genotipos (I/I), (I/D) o (D/D) del gen de la ECA en pacientes con LES.

Para determinar las frecuencias alélicas del polimorfismo de inserciones y/o deleciones de un fragmento de 287pb en el intrón 16 del gen de la ECA en los pacientes lúpicos o controles se utilizó el software F-stat versión 2.9.3.2. 2002 y GENETIX versión 4.05. Para determinar la asociación de los genotipos I/I, I/D y D/D del gen ECA con la susceptibilidad a LES se utilizó el test de X^2 y el Odds ratio para un intervalo de confianza del 95%.

13.Asociación de la frecuencia de los genotipos (I/I), (I/D) o (D/D) con la presencia de nefropatía lúpica.

Para determinar la posible asociación entre los polimorfismos del gen la ECA con nefropatía lúpica, se utilizó el test de X^2 y el Odds ratio para un intervalo de confianza del 95%.

14. Realización de la técnica de ELISA indirecto para medir los niveles de anticuerpos anti: Ds-DNA, Ss-DNA y Smith.

La medición de los niveles de los diferentes anticuerpos producidos en LES, es de gran importancia para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes que padecen esta enfermedad.

A partir del plasma obtenido de los pacientes en estudio, se realizó las siguientes determinaciones serológicas: determinación de anticuerpos anti-ds-DNA (Trinity Biotech. USA), determinación de Anticuerpos anti-Ss-DNA (Trinity Biotech, USA), determinación de anticuerpos anti antígeno Smith (Trinity Biotech. USA). Todas estas determinaciones se realizaron mediante la técnica de ELISA siguiendo las recomendaciones del fabricante. Ver anexos N°1, 2 y 3.

15. Realización de IFI para medir títulos de Anticuerpos IgG anti nucleares (ANA)

Los niveles de ANA se determinaron a partir del plasma obtenido de los pacientes en estudio por la técnica de IFI, se utilizó el kit de la línea comercial Orgentec, Alemania. Todos los procesos para la técnica de IFI se realizaron en base a las recomendaciones realizadas por el fabricante. Ver anexo N°4

16. Asociación de las características clínicas y serológicas de los pacientes con LES y el polimorfismo del gen ECA.

Para evidenciar si existe asociación entre las características clínicas y serológicas con el polimorfismo del gen de la ECA, se analizó la parte clínica a partir de las encuestas realizadas a los pacientes con LES y la serología a partir de las pruebas de laboratorio que se les realizó a los pacientes con LES. Y se utilizó la prueba de X^2 para ver si existe la posible asociación.

XI. RESULTADOS

Con el propósito de cumplir los objetivos planteados en el presente estudio, en primer lugar se realizó la optimización de la prueba de PCR para la evaluación del polimorfismo del gen de la ECA y su asociación a LES.

1. Optimización de la prueba de PCR para la identificación de inserción o delección de un fragmento de 287 pares de bases en el intrón 16 del gen ECA.

La optimización de prueba de PCR para el gen de la ECA se realizó en varios pasos, en el primer ensayo para la optimización existió la amplificación de ECA1 y no de ECA2, también se observó exceso en la concentración del cebador utilizado (figura 1). Para resolver ambos problemas, se añadió DMSO al mix de ECA2 y se diluyó a la mitad la concentración de los cebadores.

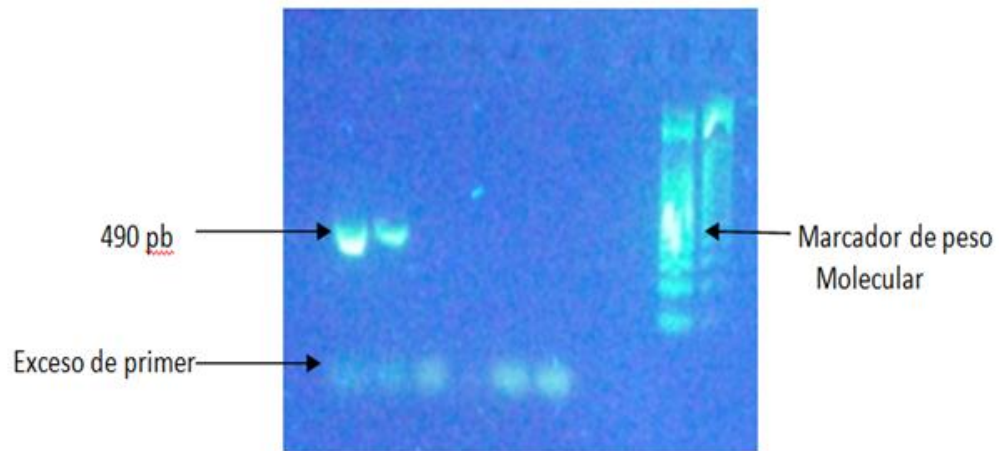


Figura 1. Fotografía del primer ensayo de PCR realizado para la optimización de la PCR del gen de la ECA. En el pozo 1 y 2 (izquierda) se observa bandas a 490 pb indicando la presencia del genotipo inserción para ECA1 y se observa exceso de primer. En los pozos 3, 4, 5 y 6 no hubo la amplificación de la banda a 335 pb esperada para ECA2. A la derecha los 2 pozos del marcador de peso molecular.

Al adicionar DMSO al mix del gen ECA 2 se observó la banda a 335 pb pero, existía un barrido por detrás de las bandas (figura 2). La dilución realizada a los primer tuvo buenos resultados como se observa (figura 2) por la desaparición del exceso de primer existente en el ensayo anteriormente mencionado.

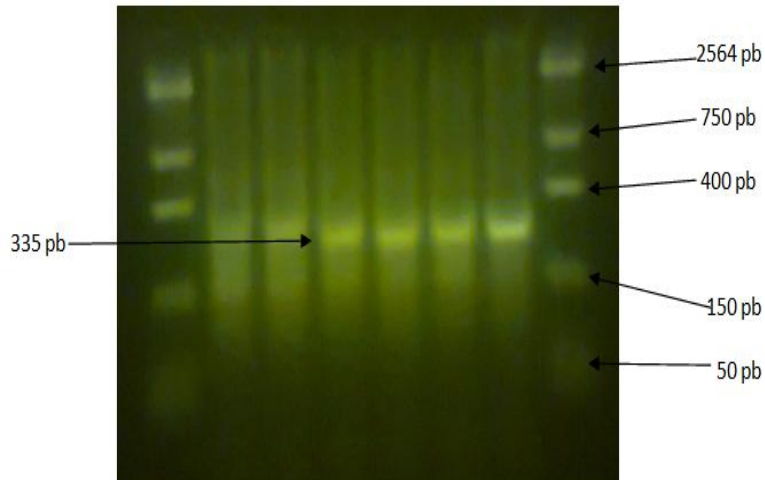


Figura 2. Fotografía de la amplificación del gen ECA 2 luego de la adición de DMSO. En los pozos 2, 3, 4, 5, 6 y 7 (centro) se observa bandas a 335 pb indicativo para confirmar la presencia del alelo inserción en ECA2, en todas las bandas existe barrido que no deja observar con claridad las bandas, en los pozos 1 y 8 se observa el marcador de peso molecular.

Para eliminar el barrido presente en la electroforesis se procedió a realizar cambios en las concentraciones de los dNTPs y ADN. Estos últimos cambios permitieron obtener resultados de PCR ECA1 y el PCR ECA2. Con los cambios realizados se pudo obtener las bandas esperadas que permitieron evidenciar la presencia de homocigosis o heterocigosis a nivel del intrón 16 del gen de la ECA (figuras 3 y 4). De manera general en la tabla 3 se muestra los cambios resultantes de la optimización de las PCR ECA que se realizaron a los protocolos de PCR inicialmente propuestos por Chiang y Lindpaintner.

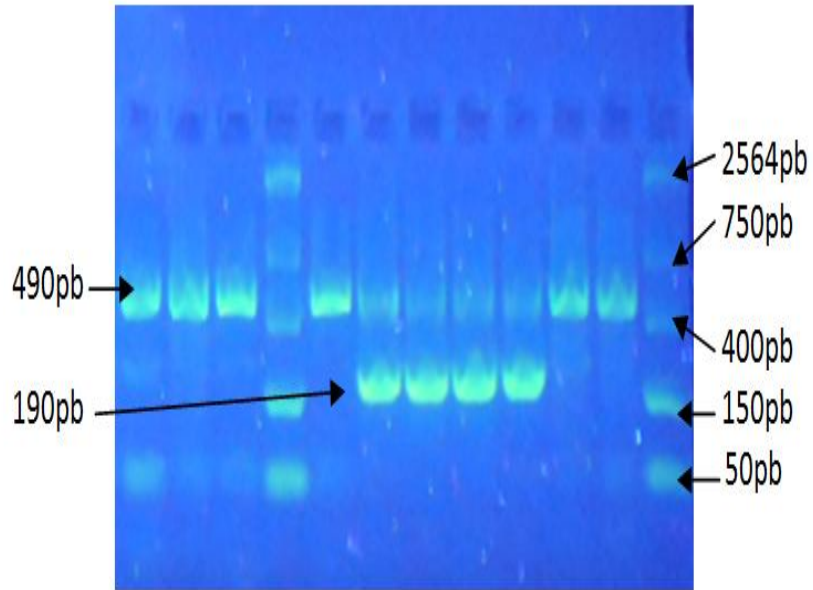


Figura N°3 Fotografía de la corrida electroforética de la genotipificación del polimorfismo I/D del gen ECA1. En los pozos 1, 2, 3 5 10 y 11 (izquierda) se observan bandas de 490 pb indicativo del alelo I, en los pozos 6,7, 8 y 9 se observa bandas de 190 pb indicativo del alelo D, pero tambien se observa bandas a 490pb en la parte superior indicativo del alelo I, en los pozos 4 y 12 se observa el marcador de peso molecular.

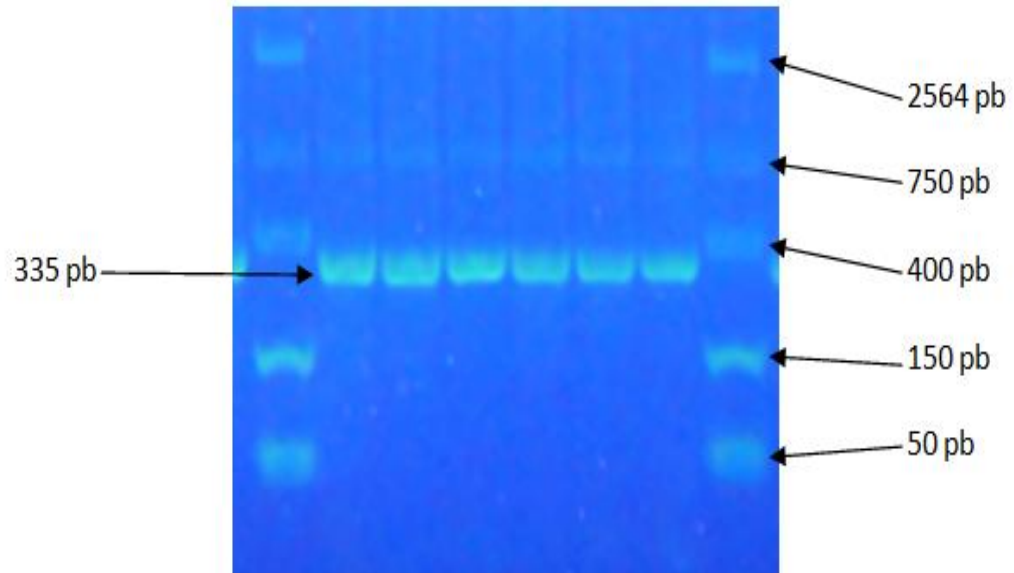


Figura N°4 Fotografía de la corrida electroforética de la genotipificación del polimorfismo de ECA2, en los pozos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 se observa bandas a 335 pb confirmando la presencia del alelo inserción, en los pozos 1 y 8 se observa el marcador de peso molecular.

Tabla N°3. Comparación de la concentración de los reactivos propuestos por Chiang y Shanmugam y las concentraciones utilizadas en el presente estudio para la optimización de la PCR para ECA1 y ECA2.

Reactivos ECA1 y ECA 2.	Concentraciones propuestas por Chiang y Shanmugam	Concentraciones utilizadas para la optimización de la PCR
Tris-HCl	10 Mm	200mM
KCl	50 Mm	500mM
MgCl₂	2,0 Mm	2,0 mM
DNTPs	0,2 Mm	0,32 mM
Tritón X100	0,1 %	No se utilizó
Primer ECA 1	1 Um	0,5Um
Primer ECA 2	1Um	0,5Um
Taq- Pol	2 unid	0,8 unid
ADN	200 ng	100- 200ng
DMSO	1 ul	0.8 ul
Volumen final	20 ul	20 ul

2. Frecuencias del polimorfismo genético (I/I, I/D y D/D) del gen de la ECA en pacientes con LES.

Las frecuencias encontradas del polimorfismo de I/I, I/D y D/D del gen de la ECA, muestran que solo para el alelo inserción ya sea en homocigosis o heterocigosis hay significancia estadística, ya que la prueba de X^2 con corrección de Yates, para el genotipo I/I e I/D emitió un valor de 6,19 y 4,22 respectivamente para un $\alpha=0,05$ y una p de 0,01 y 0,04 respectivamente.

Tabla N°4. Tabla de frecuencias genotípicas del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES versus pacientes sanos.

Polimorfismo ECA	Pacientes		Controles		Total	$P(\alpha=0,5)$
	N	%	N	%		
I/I	41	47,1	58	68,2	99	0,01
I/D	42	48,3	27	31,8	69	0,04
D/D	4	4,6	0	0	4	0,13
Total	87		85		172	

I= Inserción, D= Delección

Para hacer un mejor análisis del probable impacto que pueda tener el alelo Inserción o Delección en la susceptibilidad o no al LES, se hizo un análisis de las frecuencias alélicas utilizando los software libres F-stat versión 2.9.3.2. 2002 y GENETIX versión 4.05 2004 (tabla 5). Los resultados muestran que la frecuencia del alelo "I" es mayor en la población de pacientes sanos que en la de pacientes lúpicos. Por otra parte, se observa una mayor frecuencia del alelo D en el grupo de pacientes con LES que en el grupo de pacientes control. El cálculo de X^2 con corrección de Yates lanzó un valor de 7,45 ($p=0,006$) indicando que las diferencias son estadísticamente significativas. El valor del Odds ratio de 0,47 indica que el alelo "I" tiene una tendencia hacia la resistencia a la enfermedad; en el caso del alelo D el Odds ratio indican que las personas con este alelo tiene el doble de predisposición al lupus que las personas que no lo portan.

Tabla N°5. Comparación de frecuencias las alélicas del intrón 16 del gen de la ECA entre la población de pacientes con LES y la población de pacientes aparentemente sanos.

Polimorfismo ECA	Pacientes		Controles		Total	$P(\alpha=0,5)$	OR(IC)*
	n=87	%	n=85	%	n=172		
I	124	71,3	143	84,1	267	0,006	0,47(0,28–0,79)
D	50	28,7	27	15,9	77	0,006	2,13(1,26–3,61)
Total	174		170		344		

OR(IC) = Odds Ratio (Intervalo de confianza)

3. Frecuencias del polimorfismo genético (I/I, I/D y D/D) del gen de la ECA en pacientes con LES asociado al desarrollo de nefritis lúpica.

En la tabla 6, se puede observar la relación de los polimorfismos del gen ECA con la presencia o ausencia de nefropatía lúpica en la población lúpica. Se observa que la presencia de los genotipos I/D, D/D son mayores en pacientes lúpicos sin nefropatía lúpica que en los que la presentan. A su vez, el genotipo I/I es más frecuente en pacientes con nefropatía lúpica que en la población sin nefropatía lúpica. El valor de χ^2 encontrado fue de 1,26 ($p = 0,534$) ($\alpha=0,05$) lo que nos indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de estudio. El cálculo del Odds para los tres genotipos muestran una cercanía al valor de 1, indicando que no existe diferencias en la predisposición o protección a nefropatía lúpica.

Tabla N°6. Comparación de las frecuencias genotípicas del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES con y sin nefropatía lúpica.

Polimorfismo ECA	Con Nefropatía Lúpica		Sin Nefropatía Lúpica		Total	$P(\alpha=0,5)$	OR(IC)*
	Frec.	%	Frec.	%			
I/I	15	50,0	26	45,6	41	0,87	1.08(0.47 – 2,85)
I/D	14	46,6	28	49,1	42	0,99	0.91(0.14 – 15,7)
D/D	1	4,4	3	5,3	4	0,90	0.62(0,06 – 6,06)
Total	30		57		87		

OR(IC) = Odds Ratio (Intervalo de confianza)

Para determinar el impacto real que podría tener el alelo Inserción o el alelo Deleción se analizó re-categorizando nuevamente los pacientes en función al alelo que portaban (tabla 7). Los resultados obtenidos indican que el alelo D se encuentra en mayor frecuencia en pacientes sin daño renal que en aquellos que no presentan daño renal. El cálculo de X^2 con corrección de Yates muestra que las diferencias de las frecuencias encontradas para ambos alelos en los dos grupos comparados no son estadísticamente significativas. El cálculo del Odds para los dos alelos muestran una cercanía al valor de 1, indicando que no existe diferencias en la predisposición o protección a nefropatía lúpica.

Tabla N°7. Frecuencias alélicas del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES asociado a nefropatía lúpica.

Polimorfismo ACE	Con Nefropatía Lúpica		Sin Nefropatía Lúpica		Total	$P(\alpha=0,5)$	OR(IC)*
	Frec.	%	Frec.	%			
I	44	73,3	80	70,2	124	0,79	1.17(0,58 – 2,35)
D	16	26,7	34	29,8	50	0,79	0.85(0,43 – 1,72)
Total	44		85		174		

OR(IC) = Odds Ratio (Intervalo de confianza)

4. Características clínicas y serológicas asociadas al polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES

En el presente estudio se realizó una encuesta a los pacientes lúpicos para establecer la frecuencia de las características clínicas que presentaron y poder asociar esta información con los resultados de los diferentes marcadores serológicos de LES las cuales se analizaron para ver su posible asociación al polimorfismo del gen de la ECA. En las tablas 8 y 9 se muestran de manera general las manifestaciones clínicas reportadas por los pacientes que han sido clasificadas según la frecuencia de presentación. En el caso de los resultados de las pruebas serológicas estas se clasifican en función a la frecuencia de positividad de los resultados.

En la tabla 8 podemos observar que la artritis, el edema y la alopecia fueron las características clínicas que se presentaron con mayor frecuencia en pacientes lúpicos, con un 90,7, 85,3 y 81,3% respectivamente.

Tabla Nº 8. Tabla general de las características clínicas que presentaron los pacientes con LES.

Características clínicas	Presentaron		No presentaron	
	Frec.	%	Frec.	%
Artritis	68	90,7	7	9,3
Edema	64	85,3	11	14,7
Alopecia	61	81,3	14	18,7
Leucopenia	48	64	27	36
Anemia	47	62,6	28	37,3
Aftas	46	61,3	29	38,7
Fotosensibilidad	42	56	33	44
Signos y síntomas renales	40	53,3	35	46,7
Convulsiones	40	53,3	35	46,7
Eritema	39	52	36	48
Problemas cardiopulmonares	37	49,3	38	50,7
** Datos obtenidos a partir de la encuesta a 75 pacientes				

En la tabla 9 observamos que los pacientes lúpicos dieron resultados positivos, para ANA un 61,4%, anticuerpos anti Ds-DNA de 70,1%, anticuerpos anti Ss-DNA de 24,3% y anticuerpos anti-Smith 22,7%. También se muestran los porcentajes de resultados dudosos y negativos que reportó este grupo de pacientes.

Tabla Nº 9. Tabla general de los resultados obtenidos de las pruebas serológicas realizadas a los pacientes con LES.

	Pruebas serológicas							
	Anticuerpos antinucleares		Anti-ds-DNA		Anti-Ss-DNA		Anti-Smith	
	n=83	%	n=87	%	n=70	%	n=75	%
Positivo	51	61,4	61	70,1	17	24,3	17	22,7
Dudoso	20	24,1	3	3,4	0	0	0	0
Negativo	12	14,5	23	26,4	53	75,7	58	77,3

En las tablas 10 al 12 se encuentran los resultados del análisis de la asociación de las tres características clínicas más frecuentes y los resultados serológicos con el polimorfismo (I/I, I/D y D/D) del gen de la ECA. Para este análisis solo se tomo en cuenta a aquellos pacientes que en su historia clínica contaban con todos los parámetros a analizar. Finalmente, se hace énfasis en la asociación del alelo D ya sea en los genotipos de homocigosis (D/D) o de heterocigosis (I/D), como se evidenció en las tablas 4 y 5, siendo el alelo de riesgo para LES.

En la tabla 10 podemos observar la asociación del polimorfismo del gen de la ECA con respecto a la presencia de dolores articulares y los títulos de anticuerpos hallados en este grupo de pacientes. Se observa que de estos pacientes, 40 pacientes (52,8%) dieron ANA positivo, 48 pacientes (64%) anti-DS-DNA positivo, 15 pacientes (22%) anti-Sm positivo y 12 pacientes (18,5%) Ss-DNA positivo. Además se observa que los pacientes lupicos que portan el alelo D, ya sea en homocigosis y/o heterocigosis (I/D + D/D), el número obtenido de pacientes es sumando los pacientes con el alelo I/D y D/D, ejemplo: 17 pacientes con el genotipo I/D y 3 con el alelo D/D presentaron ANA positivo así se obtiene que 20 pacientes (27,7%) dieron

ANA positivo, entonces 20 pacientes (26,7%) dieron ds-DNA positivo, 8 pacientes (11,8%) anti-Sm positivo y 5 pacientes (7,7%) ss-DNA que presentaron esta característica clínica en el transcurso de la enfermedad. El cálculo de X^2 lanzo valores que indican que no existe significancia estadística. Ver tabla N°10.

En la tabla 11 se observa la asociación del polimorfismo del gen de la ECA con la caída notable de cabello localizada y los títulos de anticuerpos hallados, proporcionaron títulos serológicos positivos, para ANA fue de 38 pacientes positivos (52,8%), 43 pacientes positivos de Ds-DNA (57,3%), 15 pacientes positivos Anti-Sm (22%) y 11 pacientes positivos (16,9%) para ss-DNA. Observamos también, que los pacientes que portan el alelo D ya sea en homocigosis y/o heterocigosis (I/D+D/D), dieron títulos positivos para ANA de 19 pacientes (26,4%), 18 pacientes Ds-DNA (24%), 8 pacientes anti-Sm (11,8%) y 5 pacientes ss-DNA (7,7%) que presentaron caída de cabello en el transcurso de la enfermedad. El cálculo de X^2 lanzo valores que indican que no existe significancia estadística. Ver tabla N°11.

En la tabla 12 se puede ver la asociación del polimorfismo del gen de la ECA con la presencia de edema y los títulos serológicos hallados, encontrando 39 pacientes (54%) de ANA positivo, 45 pacientes (60%) de Ds-DNA positivo, 15 pacientes (22%) de anti-Sm positivo y 11 pacientes (16,9%) de ss-DNA positivo. Así mismo los pacientes que portan el alelo D ya sea en homocigosis y/o heterocigosis (I/D+D/D), se hallaron títulos positivos para ANA de 18 pacientes (25%), 18 pacientes Ds-DNA positivos (24%), 7 pacientes anti-Sm positivo (10,3%) y 5 pacientes positivo (7,7%) de ss-DNA que presentaron edema en el transcurso de la enfermedad. El cálculo de X^2

lanzo valores que indican que no existe significancia estadística. Ver tabla N°12.

El analisis de las otras caracteriticas clinicas no se las realizo porque no presentaron una alta frecuencia como las mencionadas anteriormente, pero las tablas de asociacion entre el pòlimorfismo del gen de la ECA, las caracteristicas clinicas y serologicas se encuentra en anexos.



Tabla Nº 10. Asociación del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES, respecto a dolores articulares o artritis y los títulos de ANA, anti Ds-DNA, anti-Smith y anti-Ss-DNA.

Polimorfismo ACE			ANA			Total	Anticuerpos Anti-dsDNA			Total	Anticuerpos Anti-Smith		Total	Anticuerpos Anti-Ss-DNA		Total	
			1/40	1/80	1/160		Negativo	Dudoso	Positivo		Negativo	Positivo		Negativo	Positivo		
I/I	Dolor articular	Presencia	5	5	20	30	5		28	33	2	7	29	21	7	28	
		Ausencia	0	0	2	2	0		2	2	1	1	2	1	0	1	
	Total		5	5	22	32	5		30	35	23	8	31	22	7	29	
I/D	Dolor articular	Presencia	3	12	17	32	13	2	17	32	21	8	29	25	3	28	
		Ausencia	2	2	1	5	2	0	3	5	5	0	5	4	1	5	
	Total		5	14	18	37	15	2	20	37	26	8	34	29	4	33	
D/D	Dolor articular	Presencia			3	3			3	3	3		3	1	2	3	
		Ausencia			0	0			0	0	0		0	0	0	0	
	Total				3	3			3	3	3		3	1	2	3	
Total	Dolor articular	Presencia	8	17	40	64	18	2	48	66	46	15	61	47	12	59	
		Ausencia	2	2	3	8	2	0	5	7	6	1	7	5	1	6	
	Total		10	19	43	72	20	2	53	75	52	16	68	52	13	65	
			$X^2=0,02$		$p=0,89$		$X^2=0,0$		$p=0,98$		$X^2=0,13$		$p=0,71$		$X^2=0,11$		$p=0,74$

Tabla Nº 11. Asociación del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES, respecto a la caída de cabello notable en forma localizada y los títulos de ANA, anti Ds-DNA, anti-Smith y anti-Ss-DNA.

Polimorfismo ACE			ANA			Total	Anticuerpos Anti-dsDNA			Total	Anticuerpos Anti-Smith		Total	Anticuerpos Anti-Ss-DNA		Total
			1/40	1/80	1/160		Negativo	Dudoso	Positivo		Negativo	Positivo		Negativo	Positivo	
I/I	Caída de cabello	Presencia	2	5	19	26	4	0	25	29	18	7	25	17	6	23
		Ausencia	3	0	3	6	1	0	5	6	5	1	6	5	1	6
	Total		5	5	22	32	5	0	30	35	23	8	31	22	7	29
I/D	Caída de cabello	Presencia	4	9	16	32	13	1	15	29	18	8	26	22	3	25
		Ausencia	1	5	2	5	2	1	5	9	8	0	8	7	1	8
	Total		5	14	18	37	15	2	21	38	26	8	34	29	4	33
D/D	Caída de cabello	Presencia			3	3			3	3	3		3	1	2	3
		Ausencia			0	0			0	0	0		0	0	0	0
	Total				3	3			3	3	3		3	1	2	3
Total	Caída de cabello	Presencia	6	14	38	61	17	1	43	61	39	15	54	40	11	51
		Ausencia	4	5	5	14	3	1	10	14	13	1	14	12	2	14
	Total		10	19	43	72	20	2	53	75	52	16	68	52	13	65
			$X^2=0,01$		$p=0,93$	$X^2=0,02$		$p=0,88$	$X^2=0,13$		$p=0,71$	$X^2=0,34$		$p=0,56$		

Tabla Nº 12. Asociación del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES, respecto a edema y los títulos de ANA, anti Ds-DNA, anti-Smith y anti-Ss-DNA.

Polimorfismo ACE			ANA			Total	Anticuerpos Anti-dsDNA			Total	Anticuerpos Anti-Smith		Total	Anticuerpos Anti-Ss-DNA		Total		
			1/40	1/80	1/160		Negativo	Dudoso	Positivo		Negativo	Positivo		Negativo	Positivo			
I/I	Edema	Presencia	4	5	21	30	5	0	27	32	21	8	29	22	6	28		
		Ausencia	1	0	1	2	0	0	3	6	2	0	2	0	1	1		
	Total		5	5	22	32	5	0	30	35	23	8	31	22	7	29		
I/D	Edema	Presencia	4	10	15	29	13	1	15	29	19	7	26	22	3	25		
		Ausencia	1	4	3	8	2	1	5	9	7	1	8	7	1	8		
	Total		5	14	18	37	15	2	20	38	26	8	34	29	4	33		
D/D	Edema	Presencia			3	3			3	3	3		3	1	2	3		
		Ausencia			0	0			0	0	0		0	0	0	0		
	Total				3	3			3	3	3		3	1	2	3		
Total	Edema	Presencia	8	15	39	62	18	1	45	64	43	15	54	45	11	51		
		Ausencia	2	4	4	10	2	1	8	11	9	1	14	7	2	14		
	Total		10	19	43	72	20	2	53	75	52	16	68	52	13	65		
			$X^2=0,01$		$p=0,94$		$X^2=0,07$		$p=0,79$		$X^2=0,07$		$p=0,79$		$X^2=0,34$		$p=0,56$	

XII. DISCUSIÓN

En el laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS, se ha observado en los últimos años un gran número de casos confirmados de LES, en años 2010 y 2011 con 141 y 146 casos nuevos respectivamente y el año 2012 se diagnosticaron 134 casos nuevos en población paceña, este hecho ha motivado a buscar métodos moleculares que se puedan emplear en el campo de la medicina preventiva. Permitiendo así aminorar el daño consecuente a órganos y sistemas producidos por el LES. Se ha reportado que un 50% de los pacientes con LES llegan a padecer nefropatía lúpica, como complicación de la enfermedad (Seelen MA. 2005, Chan TM. 2005).

En este estudio se capturaron a 87 pacientes con diagnóstico de LES, la relación mujer: varón de los pacientes lúpicos incorporados al estudio fue de 16:1, este dato reafirma el postulado de que el factor hormonal está fuertemente asociado con la susceptibilidad a desarrollar esta enfermedad en mujeres (Yacoub SZ. 2004).

Durante el proceso de optimización de la PCR que buscaba determinar el polimorfismo genético en el intrón 16 del gen de la ECA, se modificó las concentraciones del MIX inicialmente propuestas por Chiang et al (1998) y Lindpaintner et al., (1995), las modificaciones permitieron que los reactantes del MIX estén acorde a los requerimientos de la Taq DNA polimerasa empleada en la PCR. En la PCR no se utilizó triton X100 debido a que la amplificación de los alelos "I" y "D" fue eficiente sin usar este compuesto. El triton X100 es un detergente no iónico, que rompe los conglomerados de la enzima Taq DNA polimerasa para promover su actividad enzimática. (Alonzo A. 1987) Lindpaintner afirma que cuando se utiliza los cebadores propuestos por Chiang, hay una supresión de la amplificación del alelo I, teniendo así la amplificación preferentemente del alelo D en heterocigosis (I/D), por lo que el utilizó un segundo

cebador propuesto por Shanmugam et al., (1993) que permitió confirmar si el producto amplificado era realmente D/D o un genotipo I/D no amplificado.

Los resultados de las frecuencias obtenidas de los polimorfismos del gen de la ECA (I/I, I/D y D/D) en pacientes lúpicos fue de 47,1%, 48,3% y 4,6% y en pacientes sanos fue de 68,2%, 31,8% y 0%, existiendo una diferencia significativa entre ambos grupos de estudio ($p < 0,05$). El genotipo D/D se encontró presente solo en pacientes lúpicos. Al asociar el polimorfismo del gen ECA con la susceptibilidad a LES, el X^2 indica que existe una dependencia o relación entre el polimorfismo de las dos variables analizadas. El Odds Ratio obtenido fue dos veces mayor en los pacientes que portan el alelo D en el genotipo. Existen varios estudios realizados en población lúpica, en que asociaron el polimorfismo del gen de la ECA con LES, como el de Hussain et al., (2010) en su estudio realizado en Pakistan, que determinaron las siguientes frecuencias (I/I) 6,6%, (I/D) 4,9% y (D/D) 88,5% mostrando una relación entre el genotipo D/D con la susceptibilidad a lupus. Un estudio de Topete et al., (2012) reporta que pacientes mexicanos lúpicos presentan los siguientes genotipos del gen de la ECA I/I (21,5%), I/D (57%) y D/D (21,5%). Kaufman et al., (2001) en un estudio hecho en Oklahoma, reportaron las siguientes frecuencias genotípicas I/I (23,4%), I/D (39,6%) y D/D (37,1%). Contrariamente El-Shafeey et al., (2005) en Egipto halló las siguientes frecuencias genotípicas I/I (10%), I/D (54%) y D/D (36%). El estudio de Uhm et al., (2002) en Korea, hallaron las siguientes frecuencias para el genotipo I/I (39%), I/D (41%) y D/D (20%) y finalmente el estudio de Molad et al., (2008) reportó en pacientes lúpicos israelíes que se caracteriza por las siguientes frecuencias genotípicas: I/I (5%), I/D (36%) y D/D (59%). En el presente estudio se muestra que en la población lúpica atendida en el Instituto SELADIS el alelo D en los genotipos I/D y D/D está en mayor frecuencia que en el genotipo control. Por ello se hizo el análisis de las frecuencias del polimorfismo del intron 16 del gen de la ECA a nivel de la expresión de los alelos I o D. Observándose que el alelo D se presenta en un 28,7% en los pacientes lúpicos y en el 15,9% de los controles ($p=0.006$), confirmando entonces que los pacientes que portan el alelo D tienen dos veces

mas riesgo de padecer lupus que los pacientes que no lo portan. Esto posiblemente se deba a la diferencia étnica entre los distintos grupos poblacionales o la heterogeneidad genética de las poblaciones estudiadas. (Al-Awadhi AM, 2007)

Al investigar el posible rol del polimorfismo del gen de la ECA en la predisposición a NL, se observó que el polimorfismo genotípico (I/I, I/D y D/D) en pacientes con nefropatía lúpica es del 50%, 46,6% y 4,4%, y el polimorfismo alélico (I o D) es de 73,3% y 26,7% respectivamente, al comparar estos resultados con los de la población lúpica sin NL, no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$). Existen varios estudios que han buscado asociación entre el polimorfismo del gen de la ECA con NL; Samili et al., (2013) reportó que los pacientes que portan el genotipo D/D tienen 3 veces mayor riesgo de padecer NL que la población control. Por otra parte, Topete et al., indica que no existe asociación entre el polimorfismo del gen de la ECA con NL. Comparando las frecuencias obtenidas en nuestro estudio con los estudios de Samili et al., (2013) y Topete et al., (2013) se observa que el genotipo I/I se encuentra en mayor frecuencia en nuestra población de pacientes con NL.

Aunque se desconoce la etiología exacta de LES, se ha establecido que una combinación de factores de riesgo genéticos y eventos ambientales podrían favorecer el inicio y la progresión de la enfermedad (Lau CS, 2006; Chai HC, 2012). En este estudio se analizó primeramente las características clínicas y luego las características serológicas que los pacientes presentaron al momento de la captación. Finalmente se asociaron ambos aspectos con el polimorfismo del gen de la ECA.

En el estudio la artritis es la característica clínica que se presentó en mayor frecuencia (90,7%). Hussain et al., (2010) reportaron que la artritis se presentó en el 78,9% de la población lúpica pakistaní. En el estudio de Al-Awadhi et al., (2007) un 95,8% de la población lúpica estudiada presentó artritis y el estudio de Abbas

et al., (2012) halló que un 48% de población lúpica presentó esta característica. De esta manera se observa que en pacientes lúpicos los problemas articulares se pueden presentar en diferente proporción según sea la población estudiada. La artritis en los lúpicos se debe a la alta producción de autoanticuerpos y de complejos inmunes que se depositan en el tejido articular en forma localizada o general. (American College of Rheumatology. 1999)

Otra característica clínica que se presentó en mayor frecuencia fue la alopecia con 81,3%. Abbas et al., (2011) reportó que solo el 8% de la población lúpica en Egipto presentó esta característica. Es frecuente la caída de cabello cuando la LES se encuentra activa, solo un 27% (Marshall J. 2007) de la población lúpica la presenta, por lo que observamos es una característica clínica que se encuentra en proporciones diferentes en los grupos de estudio y posiblemente esto se deba a la diferencia étnica y que en el momento de la captación de los pacientes en nuestro estudio, estos fueron sometidos anteriormente a altas dosis de tratamiento (los citostáticos, antitiroideos, anticoagulantes, el mercurio y el ácido valproico) para contrarrestar la enfermedad lo que conlleva asimismo a la caída de cabello.

El edema, se presentó en una frecuencia del 85,3% en los pacientes lúpicos. Esta es una característica que se presenta en un 90% (Marshall J. 2007) de la población lúpica, que si bien se muestra a un inicio de la enfermedad, también suele presentarse por el tratamiento suministrado o como consecuencia de manifestaciones cardiacas y por la frecuencia hallada en nuestro estudio es una característica que según la Asociación Reumatológica Americana ayuda en el diagnóstico y seguimiento del paciente. Hasta el momento no existen estudios que indiquen una asociación entre el polimorfismo del gen de la ECA y estas características clínicas (alopecia y edema).

Todos los pacientes captados en el presente estudio al momento de la incorporación fueron seleccionados en base a los resultados positivos de ANA y ds-DNA. Los pacientes retornaron al laboratorio para hacerse los test moleculares

y las pruebas serológicas de control del tratamiento de uno a tres meses después de la captación, habiendo en todos los casos recibido el tratamiento correspondiente en función a las características clínicas que presentaron. Se observa que de los pacientes captados solo el 61,4% dio ANA positivo. En un estudio similar Al-Awadhi et al., (2007) reportó que el 100% de los pacientes presento ANA positivo, mientras que en el estudio de Abbas et al., el 88% presentó títulos positivos para este marcador serológico. Este anticuerpo se encuentra en un 98% de los pacientes diagnosticados con LES, lo cual lo hace importante para el diagnóstico y seguimiento del tratamiento de la enfermedad (Silva E. 2009). En el caso de la prueba de ds-DNA se halló que un 70,1% presentó títulos positivos. La disminución de los títulos de ANA y ds-DNA del 100% al 88% y 70% respectivamente puede deberse al tratamiento recibido por los pacientes. Abbas et al., muestra que solo el 72% de población lúpica presentó títulos positivos de ds-DNA. Estos resultados evidencian que este es un marcador relevante que acompañado de las características clínicas y otros marcadores como el ANA, C3 y C4 son útiles en el diagnóstico y seguimiento del paciente. Hay evidencia que apoya la existencia de que los títulos elevados de ds-DNA en pacientes lúpicos tienen un papel patológico en la producción de NL. (Dang H, 1984; Koffler H., 1967)

Se encontró que en la población lúpica estudiada los anticuerpos anti ss-DNA y anti-Smith se presentaron en un 24,3% y 22,7% respectivamente. Aunque la frecuencia de positividad de estas pruebas no es alta, ambas pruebas son importantes ya que no solo ayudan a descartar la posible presencia de un lupus medicamentoso (ss-DNA) sino que también ayudan a confirmar la enfermedad, si no que títulos positivos de anti-Smith solo la presentan personas con esta enfermedad, el único inconveniente es que solo del 10 a 30% de los pacientes producen este tipo de anticuerpo (Zieve GW. 2003).

Por último, para poder establecer una posible asociación de los polimorfismos del gen de la ECA con alguna característica clínica y su patrón serológico

correspondiente se asoció estas tres variables. En los aspectos clínicos solo se hizo el análisis a los tres más frecuentes. En el análisis estadístico no se pudo detectar la vinculación significativa o asociación genética entre estas variables ($p > 0,05$). Se observa que a nivel del polimorfismo del gen de la ECA (I/I, I/D y D/D), el genotipo I/I se correlaciona mejor con los niveles elevados de las pruebas de ANA y ds-DNA en pacientes lúpicos. En el caso de anticuerpo ss-DNA y anti Smith se observó que en relación al genotipo I/I, estos anticuerpos solo se presentaron del 16% al 22% en los pacientes lúpicos del estudio.

Se observa que, también los pacientes que presentaron artritis y se caracterizan por portar preferentemente el genotipo I/I y tienen títulos positivos de ds-DNA en el 37,3% de los casos. Este marcador serológico estaría en mayor frecuencia en comparación con los otros marcadores serológicos (ANA, ss-DNA y Smith). De la misma manera se observa que los títulos positivos de ds-DNA están en mayor frecuencia en la asociación de las otras dos características clínicas (alopecia y edema). Posiblemente el alelo Inserción (I) juegue un papel importante en la producción de autoanticuerpos en LES y predisponga a padecer estas características clínicas.

Sería importante hacer un estudio de cohorte para determinar si el polimorfismo ECA I/I condiciona a que los pacientes lúpicos tengan niveles elevados de autoanticuerpos y que condicione a agravar el estado de salud del paciente lúpico.

XIII. CONCLUSIONES

Los pacientes lúpicos se caracterizan por presentar el alelo delección en heterocigosis (I/D) o en homocigosis (D/D), siendo el riesgo de padecer LES dos veces más con respecto al grupo control. Este parámetro puede ser utilizado en medicina preventiva para establecer el riesgo de desarrollo de LES en los familiares de pacientes lúpicos.

Se realizó la optimización de la prueba de PCR para la identificación de inserción o delección de un fragmento genético de 287 pb a nivel del intrón 16 del gen de la ECA.

Se estableció que los pacientes lúpicos los genotipos del gen ECA se expresan de la siguiente manera I/I, I/D y D/D (47,1%, 48,3% y 4,6%) y que en el grupo control 68,2%, 31,8% y 0% respectivamente siendo las frecuencias genotípicas estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio.

Se estableció que en pacientes lúpicos el polimorfismo genético y alélico del gen ECA no muestra asociación significativa como factor predisponente a NL.

El estudio no encontró una asociación entre el polimorfismo del gen de la ECA y las características clínicas y serológicas ($p > 0,05$). Pero se observó que la mayoría con niveles positivos de los marcadores serológicos y las diferentes características clínicas tienen el genotipo I/I.

XIV. RECOMENDACIONES

Gracias a los resultados del estudio se puede evidenciar que los pacientes lúpicos se caracterizan por portar el alelo D en heterocigosis u homocigosis. Si bien en nuestra población el alelo D o muestra asociación con alguna manifestación clínica en particular y con los niveles de autoanticuerpos, se recomienda hacer un estudio de mayor profundidad para evaluar si la asociación del gen ECA con otros genes es un factor predisponente para padecer un determinado tipo de manifestación clínica como complicación de las enfermedad.



XV. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A. (2006). Enfermedades de la inmunidad. En A. A. Kumar V, *Robbins y Cotran Patología Estructural y Funcional*. (7 ed., págs. 232-239). Madrid: Elsevier.
- Al-Awadhi AM, Haider MZ, Sharma PN, Hasan EA, Botaiban F, Al- Herz A, Nahar I, Al-Enezi H, Al-Saeid K (2007). Angiotensin converting enzyme gene polymorphism in Kuwaiti patients with systemic lupus erythematosus 25:437- 442.
- Alonso A., U. M. (1987). Kinetic studies on the interaction of phosphatidylcholine liposomes with Triton X-100. *Biochim.Biophys* , 902, ,237-246.
- American College of Rheumatology and hoc committee on systemic lupus erythematosus guidelines. (1999). Guidelines for referral abd manage

ment of systemic lupus erythematosus in adults. *Arthr Rheum* , 42, 1785-1796.

- Aranow C., D. B. (2008). Systemic lupus erythematosus. En Rich R., *Clinical Immunology Principles and Practice* (3ra ed., págs. 749-776). Philadelphia: Mosby Elsevier.
- Avalos-Díaz E, A.-F. E.-E. (1999). UVA irradiation stimulates the synthesis of inflammatory cytokines in human dermal fibroblasts. *Rev Rhum* , 66, 13-9.
- Balow J E, Bumpas DT, Austin III HA.(1999) Lupus nephritis. En: Brady HR, Willax C. *Therapy in Nephrology and arterial hypertension a company Brenner and Rector´s. 1ªed.Canadá:W B Sawders Company*
- Barba JR. (2003) Síndrome de anticuerpos antifosfolípido. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 50(1), 20-32.
- Barcellos LF., M. S. (2009). High-density SNP screening of the major histocompatibility complex in systemic lupus erythematosus demonstrates strong evidence for independent susceptibility regions. *PLoS Genet* , 5, 696.
- Baudin B. (2002). New aspects on angiotensin-converting enzyme: from gene to disease. *Clin Chem Lab Med* , 40 (3), 256-265.
- Beaufils M., K. F.-M. (1983). Clinical significance of anti-Sm antibodies in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* , 74, 201-205.
- Becker-Merok A., K. M. (2006). Alpha-actinin-binding antibodies in relation to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* , 8, 162.
- Behrman RE., R. M. (2004). Lupus eritematoso sistémico. En *Nelson Tratado de Pediatría* (17 ed., págs. 809-810). McGraw-Hill.
- Benavides FJ., G. J. (2003). Manual de genética de roedores de laboratorio. *Mutaciones* .
- Berden JH., L. R. (1999). Role of nucleosomas for Induction and glomerular binding of autoantibodies in lupus nephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* , 8, 299-306.

- Berton TR., M. D. (1997). Epidermal proliferation but not the quantity of DNA photodamage is correlated with UV-induced mouse skin carcinogenesis. *J Invest Dermatol* , 109, 340-7.
- Bollain y Goytia JJ. (2001). La luz ultravioleta A aumenta la transcripción de los genes fas-L y bax y contribuye a la redistribución de la proteína Ro60 de queratinocitos. Unidad Académica de Biología Experimental: Universidad Autónoma de Zacatecas.
- Borchers AT., K. C. (2007). Drug-induced lupus. *Ann N Y Acad Sci* , 1108, 166-82.
- Burlingame R., L. W. (1985). Crystallographic studies of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 angstroms. *Science* , 228, 546-553.
- Burnham TK. (1978) Antinuclear antibodies: a simplified classification of the nuclear immunofluorescent patterns. *Arch Dermatol*, 114: 1343-1344.
- Calabrese L., e. a. (1997). Vasculitis in the central nervous system. *Arthritis Rheum* , 40 (7), 1187-1201.
- Cameron J. Lupus Nephritis.(2000) Comprehensive Clinical Nephrology Johnson R, Feehally J. *Harcourt Publishers Limited*. 292.
- Carrillo RE., R. F. (2012). Fenómeno de las células de lupus eritematoso (LE): reporte de un caso. *Rev Invest Med Sur Mex* , 19 (3), 190-192.
- Chai HC., P. M. (2012). Genetic risk factors of systemic lupus erythematosus in the Malaysian population: A Minireview. *Clin Dev Immunol 2012* , 963-730.
- Chan LS., V. C. (1998). Epitope spreading: lessons from autoimmune skin diseases. *J Invest Dermatol* (110), 103- 9.
- Chan TM. (2005). Histological reclassification of lupus nephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* , 4, 561-6.
- Chester PM., H. J. (1983). Persistence of DNA sequences of BK and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J Infect Dis* , 147, 676–84.
- Clark G, Richlin M and Tomasi T. (1969) Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*; 102: 117-124

- Crocker JA., K. R. (2005). Genetics of susceptibility and severity in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* , 17 (5), 529-537.
- Dang H., H. R. (1984). The in vivo and in vitro glomerular deposition of isolated anti-double-stranded-DNA antibodies in NZB/W mice. *Clin Immunol Immunopathol* , 30, 265–78.
- Dunn JP. (1996). Antiphospholipid antibodies and retinal vascular disease. *Lupus* , 5, 313-322.
- Eiguchi K., S. S. (2002). Psiconeuroinmunoendocrinología en enfermedades autoinmunes (LES). *Archivos de alergia e inmunología clinica* , 33 (1), 8-16.
- El-Shafeey MM., E.-S. M. (2005). Angiotensin converting Enzyme gene polymorphishm in Egyptian patients with systemic lupus erythematosus. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine* , 21, 131-138.
- Enríquez-Mejía MG. (2013). Fisiopatología del lupus eritematoso sistémico. *Revista de Medicina e Investigación. El sevier* , 1 (1), 8-16.
- Fernández C., G. C. (1995). Utilidad terapéutica de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. *Revisiones* , 19 (1), 3-9.
- Fernández-Madrid F, Mattioli M. (1976) Antinuclear antibodies (ANA): immunologic and clinical significance. *Semin Arthritis Rheum*, 6: 83-124.
- Fernando MM., S. C. (2007). Identification of two independent risk factors for lupus within the MHC in United Kingdom families. *PLoS Genet* , 3, 192.
- Franco H, Weston W, et al. (1981) Autoantibodies directed against sicca syndrome antigens in the neonatal lupus syndrome. *J Am Acad Dermatol*; 4: 67-72.
- Fritzler MJ., T. E. (1978). Antibodies to histones in druginduced and idiopathic lupus erythematosus. *J Clin Invest* , 62, 560- 567.
- Fuchs TA., A. U. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* , 176 (2), 231-41.
- Ganong WF. (1986). *Fisiología médica* (10 ed.). México D. F.: El Manual Moderno S. A.

- Garrison JC., P. M. (1991). Renina y angiotensina. En R. T. Goodman GA., *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (8 ed., págs. 733-46). México D. F.: Editorial Médica Panamericana, S. A. de C. V. México D. F.
- Gary WZ., P. R. (2003). Khusial The anti-Sm immune response in autoimmunity and cell biology . *Autoimmunity Reviews* , 2, 235–240.
- Ginzler EM, Schorn K. (1988) Outcome and prognosis in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am*, 14:67-78.
- Gordillo G. (1996) Glomerulopatía del lupus eritematoso sistémico. En: GordilloG. *Nefrología Pediátrica. 1ªed. España: Mosby/Doyman libros SA. : 222- 33.*
- Harley JB., H. I. (2006). The curiously suspicious: a role for Epstein-Barr virus in lupus. *Lupus* , 15.
- Hochberg MC. (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*; 40:1725.
- Hruza LL., P. A. (1993). Mechanisms of UV-induced inflammation. *J Invest Dermatol* , 100, 35-41.
- Hubert C., H. A. (1991). Structure of the angiotensin I-converting enzyme. *J Biolo Chem* , 266, 15377-83.
- Hussain N., J. G. (2010). Angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism in Pakistani systemic lupus erythematosus patients. *Afr J Biotechnol* , 8134–8138.
- James JA., K. K.-A. (2006). An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a posible etiology for systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* , 100, 3019-26.
- Kemény L., M. G. (1994). Cytokine system as potential target for antipsoriatic therapy. *Exp Dermatol* , 3, 1-8.
- Klug A., F. J. (1985). Crystallographic structure of the octamer histone core of the nucleosome. *Science* , 229, 1109-1110.
- Koffler D., S. P. (1967). Immunological studies concerning the nephritis of systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* , 126, 607-624.
- Kokuina., e. a. (1999). *Revista Mexicana de Reumatología*. 14, 84-88.

- Konodo S., S. D. (1994). Differential modulation of interleukin-1a (IL-1a) and interleukin-1b (IL-1b) in human epidermal keratinocytes by UVB. *Exp Dermatol* , 3, 29-39.
- Lang B., S. E. (1993). A clinical overview of systemic lupus erithematosus in childhood. *Pediatrics Review* , 14, 194-202.
- Lau CS., Y. G. (2006). Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: An overview. *Lupus* , 15 (11), 713-714.
- Lerner M., S. J. (1979). Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* , 76, 5495-5497.
- Lian LH., K. B. (2011). "Lack of association between RANTES-28, SDF-1 gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus in the Malaysian population. *Genet. Mol Res* , 10 (4), 2841-2850.
- Lindpaintner K, Pfeffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Grodstein F, LaMotte F, et al. (1995) A prospective evaluation of an angiotensin- converting-enzyme gene polymorphism and risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med*; 332: 706-11.
- Loredo A., C. A. (1996). Lupus eritematoso sistémico. En C. L. Loredo A., *Medicina interna pediátrica* (3 ed., págs. 132-49). Mexico: McGraw Hill I.
- Lupus Foundation of America. (2008). Kids Speak Out about Lupus.
- Margraves MM, Richmond H, Morton R. (1948) Presentation of two bone marrow elements; the "tart" cell and LE cell. *Proc Staff Meet Mayo Clin*, 23: 25-8.
- Marshall E., E. A. (2002). Lupus: Mysterious disease holds its secrets tight. *Science* , 296:689.
- Mason LJ., R. C. (2004). Is alpha-actinin a target for pathogenic anti-DNA antibodies in lupus nephritis? *Arthritis Rheum* , 50, 866-870.
- Mattioli M and Reichlin M. (1974) Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*; 17: 421-429.
- Mcphee SJ., e. a. (2007). *Fisiopatología médica: una introducción a la medicina clínica* (5ª ed ed.). Bogotá: Colombia: Manual Moderno.

- Mejia H., M. A. (2004). Lupus eritematoso sistémico. *Rev. bol.ped* , 43 (1).
- Méndez I, Cariño C, Díaz L. (2005) Prolactin in the immunological system: synthesis and biological effects. *Rev Invest Clin* ;57:447-456.
- Michaud JL., L. L. (2006). Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant alpha- actinin-binding antibodies in relation to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* , 8, 162.
- Molad Y., G. E. (2008). Renal outcome and vascular morbidity in systemic lupus erythematosus (SLE): lack of association with the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. *Semin Arthritis Rheum* , 11, 132-137.
- Molina J., A. J. (2000). "Lupus Eritematoso: Manual práctico para médicos y pacientes". *CIB* .
- Morales AR., R. H. (1999). Afectación del sistema nervioso central e pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico . *Boletín Médico de Postgrado* , 15 (4), 149-158.
- Morris DL., T. K. (2012). Unraveling Multiple MHC Gene Associations with Systemic Lupus Erythematosus: Model Choice Indicates a Role for HLA Alleles and Non-HLA Genes in Europeans. *The American Journal of Human Genetics* , 91, 778-793.
- Norris DA. (1993). Pathomechanisms of photosensitive lupus erythematosus. *J Invest Dermatol* , 100, 58-68.
- Noticias, O. C. (12 de enero de 2005). 800 personas enferman de mal crónico de los riñones . *La razón* .
- Parsa A., P. E. (2002). Association of angiotensin-converting enzyme polymorphisms with systemic lupus erythematosus and nephritis: analysis of 644 SLE families Gene and immunity. 3, S42-S46.
- Petri M., (2008). Sex hormones and systemic lupus erythematosus. *Lupus* , 17, 412-15.
- Pistiner M., Wallace DJ, Nessim S, Metzger Al., Klinenberg JR. (1991) lupus erythematosus in the 1980s: a survey of 570 patients. *Semin Arthritis Rheum*, 21:55-64.
- Pretel M., M. L. (2012). Lupus eritematoso inducido por fármacos. *Actas Dermosifiliogr* , 9-10.

- Prkacin I., N. B. (2001). Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in patients with systemic lupus. *55* (2), 73-76.
- Provost TT., W. R. (1989). Antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus. En Norris DA., *Immune mechanisms in cutaneous disease* (págs. 333-357). New York: Marcel Dekker.
- Provost TT., W. R. (1993). Anti-Ro(SS-A) HLA-DR3- positive women: the interrelationship between some ANA negative, SS,SCLE, and NLE mothers and SS/LE overlap female patients. *J Invest Dermatol* , *100*, 14-20.
- Pullmann R., L. J. (1999). "Association between systemic lupus erythematosus and insertion/deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme (ACE) gene," . *Clin Exp Rheumatol* , *17* (5), 593-596.
- Quevauvilliers LP. (2004). *Diccionario de Enfermería Enciclopedia practica* (2da ed.). España: Elsevier.
- Quintana GL., F. A. (2003). Aplicación clínica de los anticuerpos en lupus eritematoso sistémico. *Revista colombiana de reumatología* , *10* (1), 32-45.
- Quispe C, (2006) Incidencia de LES en pacientes atendidos en el instituto de laboratorio de diagnostico e investigacion en Salud (SELADIS). Durante el periodo 2000 al 2004.
- Rabbani A., M. S. (2008). Association of Angiotensin-Converting Enzyme Gene Dimorphisms with Severity of Lupus Disease. *J. Rheumatol* , *19*, 761-766.
- Rahman A., I. D. (2008). Systemic Lupus Erythematosus and, M.D.N . *Engl J Med* , 358:929-939.
- Rigat B., H. C.-G. (1990). An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* , *86*, 1343-6.
- Rioux JD., G. P. (2009). Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 18680-5.
- Robles A., Ramos M., (2005) Significado clínico de los anticuerpos antinucleares. *Servicio de Enfermedades Sistémicas. 1578*. 85-90.

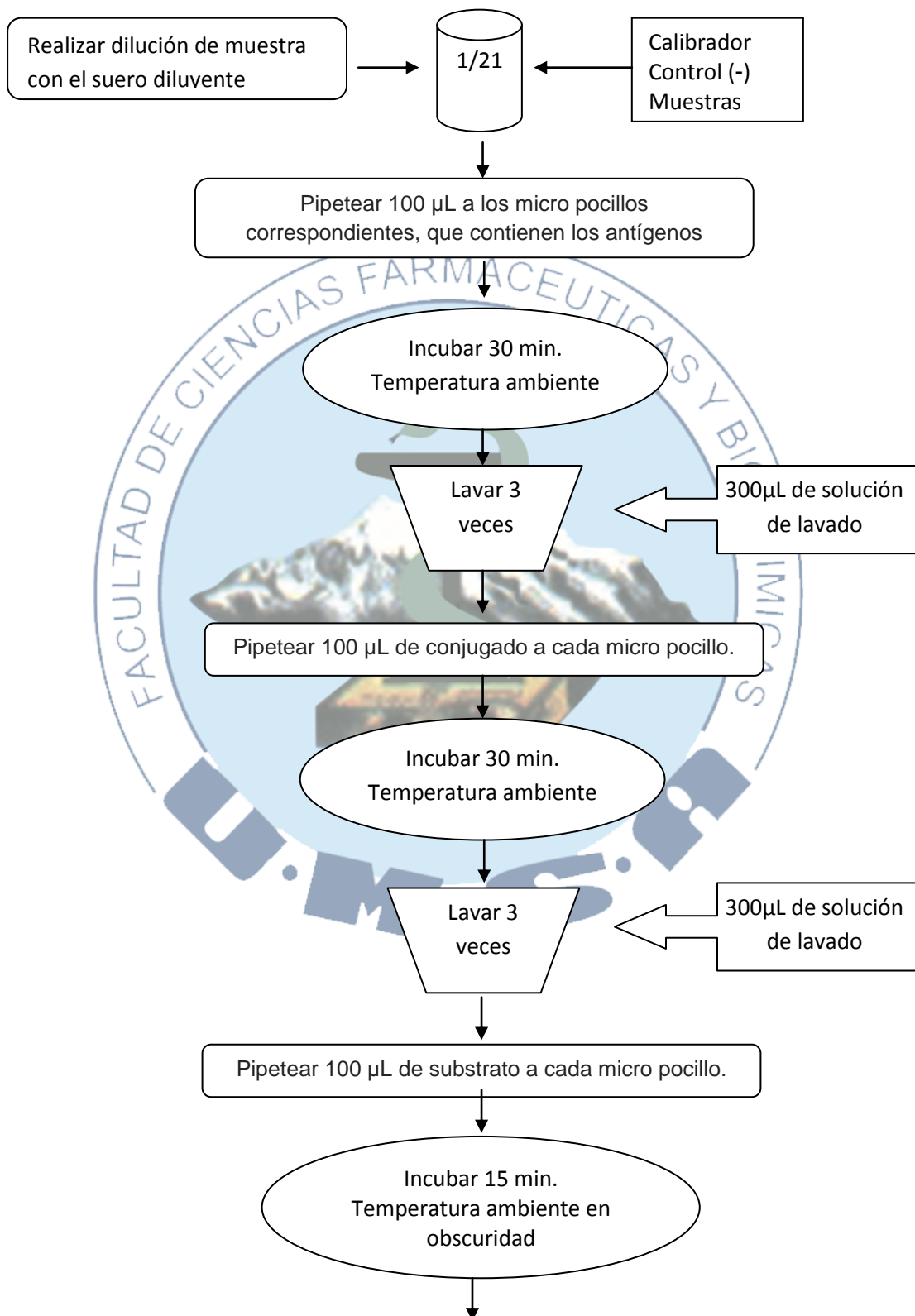
- Rojas WM., A. J. (2012). Lupus Eritematoso Sistémico. En Rojas WM., *Imunología de Rojas* (págs. 457-62). Medellín, Colombia : corporacion para investigaciones.
- Ronchez MV, Len CA, Spinola e Castro A, Sacchetti S, Lourenzi VM, Ajzen S, et al. (2001) Thyroid function and serum prolactin levels in patients with juvenile systemic lupus erythematosus. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 14:165-9.
- Rönblom L, . E. (2006). The type interferon system in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* (54), 408-420.
- Ropes MW: (1976) Systemic Lupus Erythematosus. Cambridge, Mass, Harvard University Press,
- Rosette C., K. M. (1996). Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* , 274, 1194-7.
- Rubin R. (2002). Drug induced lupus. En H. B. Wallace DJ, *Dubois lupus erythematosus*. (6th ed ed., págs. 885-916). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins;.
- Ruddy S., e. a. (2003). *Texto de Reumatología de Kelly*. España: Marbán Editores.
- Rutstein J., M. M. (2000). Mapa interactivo de enfermedades para Lupus Eritematoso Sistémico. *Arthritis Central.com* .
- Said PB. (1993). Fisiopatología del síndrome antifosfolípido. *Sangre* , 38 (2), 1131-1138.
- Sato H., A. Y. (1998). "Association of an insertion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene with the activity of systemic lupus erythematosus Lupus". 530-534.
- Sayed-Tabatabaei FA., O. B. (2006). ACE polymorphisms. *Circ Res* , 98, 1123-33.
- Seelen MA., R. A. (2005). Role of complement in innate and autoimmunity. *J Nephrol* , 18, 642-53.
- Silva EC. (2009). Inmunopatogenia del Lupus Eritematoso Sistémico, parte II: Rol de los Componentes del Sistema Inmune y de los Autoanticuerpos. *Rev. chil. reumatol* , 25 (4), 140-147.

- Sontheimer RD, McCauliffe DP, Zappi E, Targoff I. (1991) Antinuclear antibodies: clinical correlations and biologic significance. *Adv Dermatol*, 7: 3-52.
- Sprovieri SR., S. Y. (2005). Polymorphisms of the reninangiotensin system genes in Brazilian patients with lupus nephropathy. *Lupus* , 14 (5), 356-62.
- Stimpson WH. (1988). Estrogen and human T lymphocytes: presence of specific receptors in the T- suppressor/ cytotoxic subset. *ScandImmuno* , 28, 345-350.
- Stobo JD., D. B. (1996). *The principles and practice of medicine* (23va ed.). McGraw-Hill Professional.
- Su W, Madaio M.(2003) Recent advances in the pathogenesis of lupus nephritis: Autoantibodies and B cells. *Semin Nephrol* 23: 564-568,
- Sundsford A., O. A. (1999). BK and JC Viruses in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: Prevalent and Persistent BK Viruria, Sequence Stability of the Viral Regulatory Regions, and Nondetectable Viremia. *The Journal of Infectious Diseases* , 180, 1-9.
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF *et al.* (1982) The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25: 1271–1277.
- Tassiulas IO., A. I. (1998). ACE gene polymorphism in SLE decreased prevalence of DD genotype in African-American patients. *Clin Nephrol* , 50, 8-13.
- Thomas WG, Brandenburger Y, Autelitano DJ, Pham T, Qian H, Hannan RD : (2002) Adenoviral-directed expression of the type 1^a angiotensin receptor promotes cardiomyocyte hypertrophy via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Circ Res* 90:135-42
- Trefzer U., B. M. (1993). The 55-KD tumor necrosis receptors on human keratinocytes is regulated by tumor necrosis factoralpha and by ultraviolet B radiation. *J Clin Invest* , 92, 462-70.
- Ueda S., E. L. (1995). Enhanced pressor response to angiotensin I in normotensive men with the deletion genotype DD for angiotensin converting enzyme Hypertension. 25, 1266-1269.
- Uhm WS., L. H. (2002). Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and vascular manifestations in Korean patients with SLE. *Lupus* , 11, 227-233.

- VanBruggen MCJ, Kramers C, Algreen B y cols. (1997) Nucleosomes and histones are present in glomerular deposits in human lupus nephritis. *Nephrol Dial Transpl.* 12:57-66.
- Velasco F. (1997). Síndrome antifosfolípido (SAF): posibles mecanismos patogénicos de trombosis. *Sangre* , 42 (6), 475-481.
- Verthelyi D., P. M. (2001). Disassociation of sex hormone levels and cytokine production in SLE patients. *Lupus* .
- Von SE. (1996). Clinical characteristics of antiphospholipid antibody syndrome in children. *J Pediatr* , 129, 339-345.
- Walker SE, Jacobson JD. (2000) Roles of prolactin and gonadotropin releasing hormone in Rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am.* 26:713-36.
- Weinstein A. (1980). Drug-induced systemic lupus erythematosus. *Prog Clin Immunol* , 4, 1-21.
- West S., e. a. (1995). NeuroPsychiatric lupus erythematosus: a 10 years prospective study on the value of diagnostic tests. *Am J Med* , 99, 153 - 163.
- Wright B., B. S. (2010). Systemic Lupus Erythematosus. En C. WD, *Current Clinical Medicin* (2da ed.). Philadelphia: Sarunders Elsevier.
- Yacoub Wasef SZ. (2004). Gender differences in systemic lupus erythematosus. *Gend Med* , 1, 12-7.

ANEXO Nº 1

Protocolo para la determinación de anticuerpos anti ds-DNA (ELISA)



Parar la reacción con 100 μ L de solución de parada.

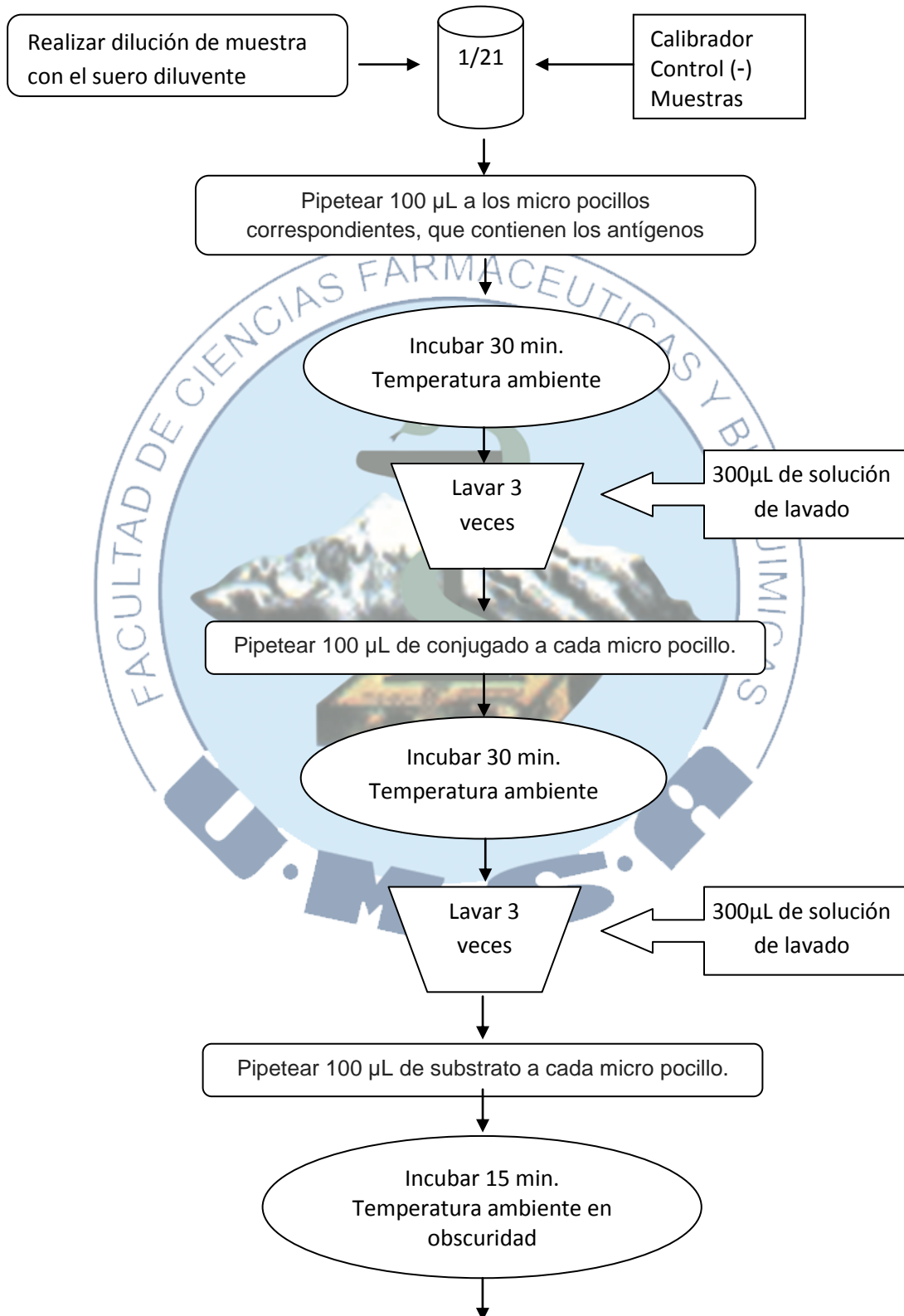


Realizar la lectura de 450 a 630nm, en un lector de ELISA



ANEXO Nº 2

Protocolo para la determinación de anticuerpos anti Smith (ELISA)



Parar la reacción con 100 μ L de solución de parada.

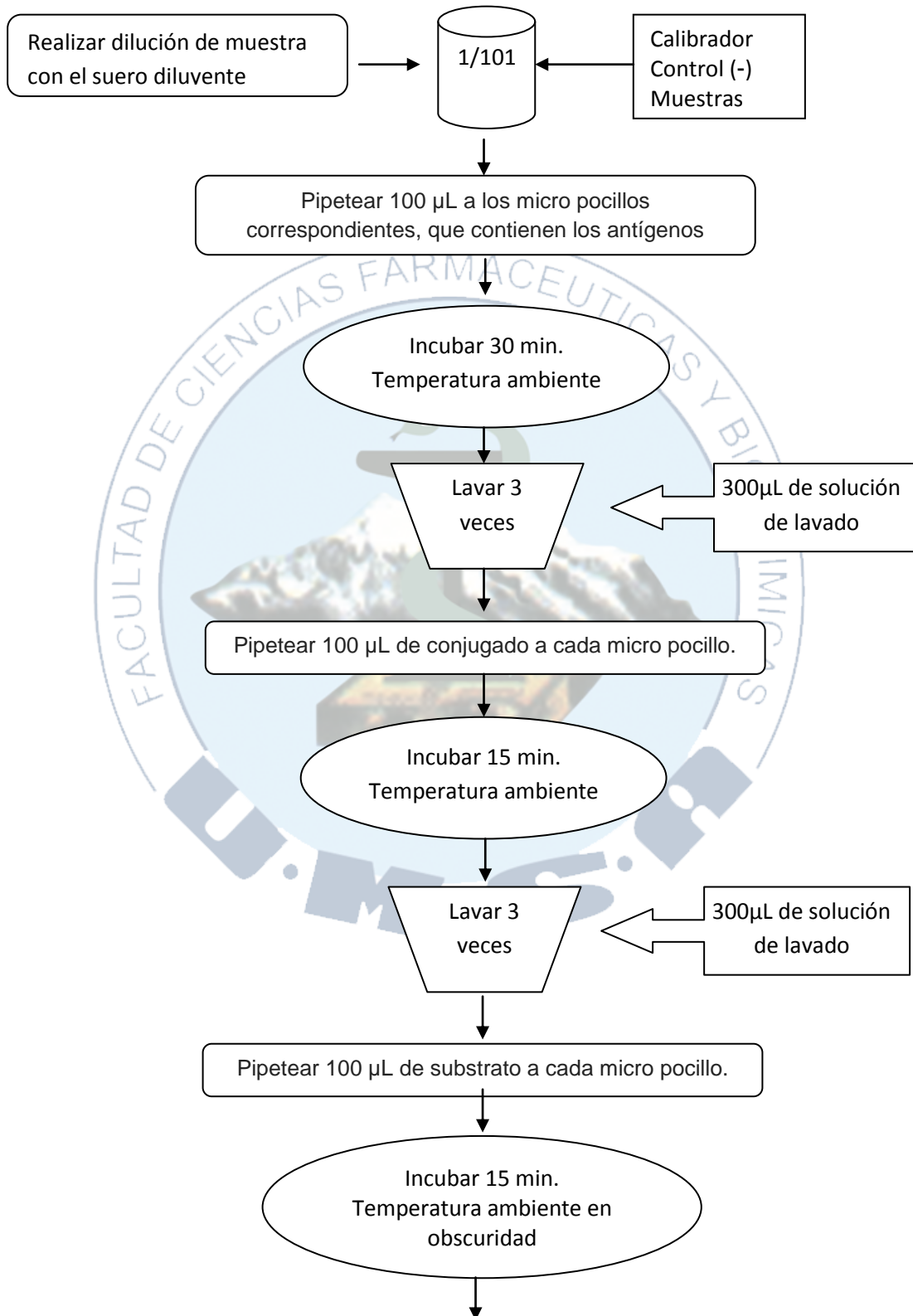


Realizar la lectura de 450 a 630nm, en un lector de ELISA



ANEXO Nº 3

Protocolo para la determinación de anticuerpos anti ss-DNA (ELISA)



Parar la reacción con 100 μ L de solución de parada.



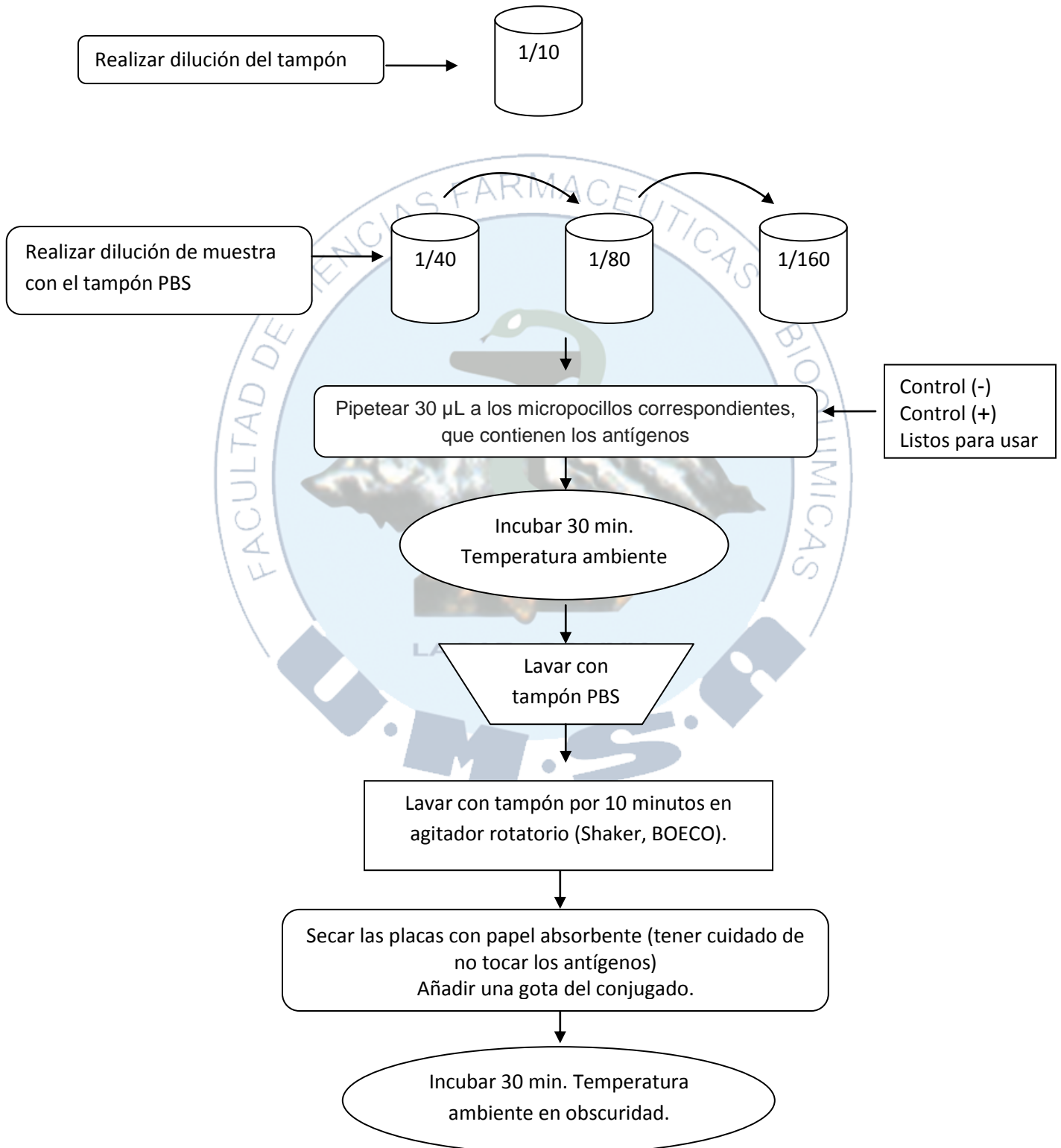
Realizar la lectura de 450 a 630nm, en un lector de ELISA



ANEXO Nº 4

Protocolo para la determinación de anticuerpos antinucleares (IFI)

Kit comercial



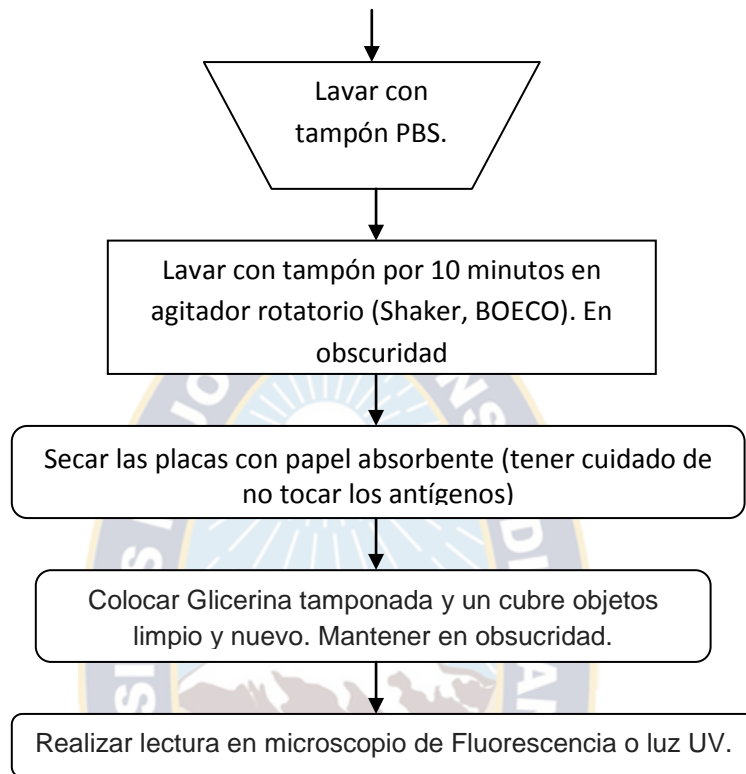


Tabla Nº 13. Asociación del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES, respecto a erupciones después de exponerse al sol y los títulos de ANA, anti Ds-DNA, anti-Smith y anti-Ss-DNA.

Polimorfismo ACE			ANA			Total	Anticuerpos Anti-dsDNA			Total	Anticuerpos Anti-Smith		Total	Anticuerpos Anti-Ss-DNA		Total	
			1/40	1/80	1/160		Negativo	Dudoso	Positivo		Negativo	Positivo		Negativo	Positivo		
I/I	Fotosensibilidad	Presencia	3	2	10	15	3	0	13	16	10	5	25	11	4	15	
		Ausencia	2	3	12	17	2	0	17	19	13	3	16	11	3	14	
	Total		5	5	22	32	5	0	30	35	23	8	31	22	7	29	
I/D	Fotosensibilidad	Presencia	2	9	12	24	11	0	13	24	14	7	21	17	3	20	
		Ausencia	3	5	5	13	4	2	7	13	12	1	13	12	1	13	
	Total		5	14	18	37	15	2	20	37	26	8	34	29	4	33	
D/D	Fotosensibilidad	Presencia			3	3			2	2	2		2	1	1	1	
		Ausencia			0	0			1	1	1		2	0	1	1	
	Total				3	3			3	3	3		3	1	2	3	
Total	Fotosensibilidad	Presencia	5	11	25	61	14	0	28	42	26	12	54	29	8	51	
		Ausencia	5	8	18	14	6	2	25	33	26	4	14	23	5	14	
	Total		10	19	43	72	20	2	53	75	52	16	68	52	13	65	
			$X^2=1,35$		$p=0,24$		$X^2=0,07$		$p=0,79$		$X^2=0,03$		$p=0,86$		$X^2=0,16$		$p=0,68$

Tabla Nº 14. Asociación del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES, respecto a enrojecimiento o erupción sobre la nariz y las mejillas en forma de alas de mariposa y los títulos de ANA, anti Ds-DNA, anti-Smith y anti-Ss-DNA.

Polimorfismo ACE			ANA			Total	Anticuerpos Anti-dsDNA			Total	Anticuerpos Anti-Smith			Total	Anticuerpos Anti-Ss-DNA		
			1/40	1/80	1/160		Negativo	Dudoso	Positivo		Negativo	Positivo	Negativo		Positivo	Total	
I/I	Eritema malar	Presencia	5	3	7	15	4	0	13	32	12	3	15	12	3	15	
		Ausencia	0	2	15	17	1	0	17	6	11	5	16	10	4	14	
	Total		5	5	22	32	5	0	30	35	23	8	31	22	7	29	
I/D	Eritema malar	Presencia	2	8	11	21	9	0	12	21	12	6	18	16	1	17	
		Ausencia	3	6	7	16	6	2	8	16	14	2	16	13	3	16	
	Total		5	14	18	37	15	2	20	37	26	8	34	29	4	33	
D/D	Eritema malar	Presencia			3	3			3	3	3		3	1	2	3	
		Ausencia	0	0	0	0			0	0	0		0	0	0	0	
	Total				3	3			3	3	3		3	1	2	3	
Total	Eritema malar	Presencia	7	11	21	62	13	0	28	41	27	9	36	29	6	35	
		Ausencia	3	8	22	10	7	2	25	34	25	7	32	23	7	30	
	Total		10	19	43	72	20	2	53	75	52	16	68	52	13	65	

Tabla Nº 15. Asociación del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES, respecto a signos y síntomas renales y los títulos de ANA, anti Ds-DNA, anti-Smith y anti-Ss-DNA.

Polimorfismo ACE			ANA			Anticuerpos Anti-dsDNA				Anticuerpos Anti-Smith			Anticuerpos Anti-Ss-DNA			
			1/40	1/80	1/160	Total	Negativo	Dudoso	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
I/I	Renal	Presencia	4	4	10	18	5	0	14	19	14	4	18	14	4	18
		Ausencia	1	1	12	14	0	0	16	16	9	4	13	8	3	11
	Total		5	5	22	32	5	0	30	35	23	8	31	22	7	29
I/D	Renal	Presencia	3	7	8	18	10	0	8	18	10	5	15	11	3	14
		Ausencia	2	7	10	19	5	2	12	19	16	3	19	18	1	19
	Total		5	14	18	37	15	2	20	37	26	8	34	29	4	33
D/D	Renal	Presencia			3	3			3	3	3		3	1	2	3
		Ausencia			0	0			0	0	0		0	0	0	0
	Total				3	3			3	3	3		3	1	2	3
Total	Renal	Presencia	7	11	21	39	15	0	25	64	27	9	36	26	9	51
		Ausencia	3	8	22	33	5	2	28	11	25	7	32	26	4	14
	Total		10	19	43	72	20	2	53	75	52	16	68	52	13	65

Tabla Nº 16. Asociación del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES, respecto a la aparición de llagas orales o nasales por 5 días o más y los títulos de ANA, anti Ds-DNA, anti-Smith y anti-Ss-DNA.

Polimorfismo ECA			ANA			Anticuerpos Anti-dsDNA				Anticuerpos Anti-Smith			Anticuerpos Anti-Ss-DNA			
			1/40	1/80	1/160	Total	Negativo	Dudoso	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
I/I	Aftas	Presencia	2	3	12	18	4	0	16	20	13	4	17	13	3	16
		Ausencia	3	2	9	14	1	0	14	15	10	4	14	9	4	13
	Total		5	5	22	32	5	0	30	35	23	8	31	22	7	29
I/D	Aftas	Presencia	2	9	14	24	11	0	13	24	17	5	22	17	4	21
		Ausencia	3	5	5	13	4	2	7	13	3	9	12	12	0	12
	Total		5	14	18	37	15	2	20	37	26	8	34	29	4	33
D/D	Aftas	Presencia			3	3			3	3	3		3	1	2	3
		Ausencia			0	0			0	0	0		0	0	0	0
	Total				3	3			3	3	3		3	1	2	3
Total	Aftas	Presencia	4	12	29	62	15	0	32	64	33	9	42	31	9	40
		Ausencia	6	7	14	10	5	2	21	11	13	13	26	21	4	25
	Total		10	19	44	72	20	2	53	75	46	22	68	52	13	65

Tabla Nº 17. Asociación del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES, respecto a problemas cardiopulmonares y los títulos de ANA, anti Ds-DNA, anti-Smith y anti-Ss-DNA.

Polimorfismo ECA			ANA			Anticuerpos Anti-dsDNA				Anticuerpos Anti-Smith			Anticuerpos Anti-Ss-DNA			
			1/40	1/80	1/160	Total	Negativo	Dudosos	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
I/I	Problemas cardiopulmonares	Presencia	3	3	12	18	3	0	17	20	13	5	18	12	4	16
		Ausencia	2	2	10	14	2	0	13	15	10	3	13	10	3	13
	Total		5	5	22	32	5	0	30	35	23	8	31	22	7	29
I/D	Problemas cardiopulmonares	Presencia	2	5	7	14	7	0	7	14	10	2	12	12	0	12
		Ausencia	3	9	11	23	8	2	13	23	16	6	22	17	4	21
	Total		5	14	18	37	15	2	20	37	26	8	34	29	4	33
D/D	Problemas cardiopulmonares	Presencia			3	3			3	3	3		3	1	2	3
		Ausencia			0	0			0	0	0		0	0	0	0
	Total				3	3			3	3	3		3	1	2	3
Total	Problemas cardiopulmonares	Presencia	5	8	22	35	10	0	27	37	26	7	33	25	6	31
		Ausencia	5	11	21	37	10	2	26	38	26	9	35	27	7	34
	Total		10	19	43	72	20	2	53	75	52	16	68	52	13	65

Tabla Nº 18. Asociación del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES, respecto a convulsiones o problemas de memoria y los títulos de ANA, anti Ds-DNA, anti-Smith y anti-Ss-DNA.

Polimorfismo ACE			ANA				Anticuerpos Anti-dsDNA			Anticuerpos Anti-Smith			Anticuerpos Anti-Ss-DNA			
			1/40	1/80	1/160	Total	Negativo	Dudoso	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
I/I	Convulsiones	Presencia	2	5	11	18	3	0	16	19	14	4	18	14	4	18
		Ausencia	3	0	11	14	2	0	14	16	9	4	13	8	3	11
	Total		5	5	22	32	5	0	30	35	23	8	31	22	7	29
I/D	Convulsiones	Presencia	2	9	8	19	9	1	9	19	15	3	18	14	3	17
		Ausencia	3	5	10	18	6	1	11	18	11	5	16	15	1	16
	Total		5	14	18	37	15	2	20	37	26	8	34	29	4	33
D/D	Convulsiones	Presencia			2	2			2	2	2		2	1	1	2
		Ausencia			1	1			1	1	1		1	0	1	1
	Total				3	3			3	3	3		3	1	2	3
Total	Convulsiones	Presencia	4	14	21	62	12	1	27	64	31	7	38	29	8	51
		Ausencia	6	5	22	10	8	1	26	11	21	9	30	23	5	14
	Total		10	19	43	72	20	2	53	75	52	16	68	52	13	65

Tabla Nº 19. Asociación del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES, respecto a anemia y los títulos de ANA, anti Ds-DNA, anti-Smith y anti-Ss-DNA.

Polimorfismo ACE			ANA			Anticuerpos Anti-dsDNA				Anticuerpos Anti-Smith			Anticuerpos Anti-Ss-DNA			
			1/40	1/80	1/160	Total	Negativo	Dudoso	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
I/I	Anemia	Presencia	2	5	14	21	4	0	19	23	14	7	21	16	4	20
		Ausencia	3	0	8	11	1	0	11	12	9	1	10	6	3	9
	Total		5	5	22	32	5	0	30	35	23	8	31	22	7	29
I/D	Anemia	Presencia	2	8	13	24	9	1	13	23	15	6	21	18	3	21
		Ausencia	3	6	5	14	6	1	7	14	11	2	13	11	1	12
	Total		5	14	18	37	15	2	20	37	26	8	34	29	4	33
D/D	Anemia	Presencia			1	1			1	1	1		1	0	1	1
		Ausencia			2	2			2	2	2		2	1	1	2
	Total				3	3			3	3	3		3	1	2	3
Total	Anemia	Presencia	4	13	28	45	13	1	33	47	30	13	43	34	8	42
		Ausencia	6	6	15	27	7	1	20	28	22	3	25	18	5	23
	Total		10	19	43	72	20	2	53	75	52	16	68	52	13	65

Tabla Nº 20. Asociación del polimorfismo del gen de la ECA en pacientes con LES, respecto a leucopenia y plaquetopenia y los títulos de ANA, anti Ds-DNA, anti-Smith y anti-Ss-DNA.

Polimorfismo ACE		ANA				Anticuerpos Anti-dsDNA				Anticuerpos Anti-Smith			Anticuerpos Anti-Ss-DNA			
		1/40	1/80	1/160	Total	Negativo	Dudoso	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total	
I/I	Leucopenia	Presencia	2	3	15	20	4	0	18	22	15	4	19	16	3	19
		Ausencia	3	2	7	12	1	0	12	13	8	4	12	6	4	10
		Total	5	5	22	32	5	0	30	35	23	8	31	22	7	29
I/D	Leucopenia	Presencia	1	8	14	23	8	1	14	23	16	5	21	17	4	21
		Ausencia	4	6	4	14	7	1	6	14	10	3	13	12	0	12
		Total	5	14	18	37	15	2	20	38	26	8	34	29	4	33
D/D	Leucopenia	Presencia			3	3			3	3	3		3	1	2	3
		Ausencia			0	0			0	0	0		0	0	0	0
		Total			3	3			3	3	3		3	1	2	3
Total	Leucopenia	Presencia	3	11	32	46	12	1	35	48	34	9	43	34	9	43
		Ausencia	7	8	11	26	8	1	18	27	18	7	25	18	4	22
		Total	10	19	43	72	20	2	53	75	52	16	68	52	13	65



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:



ANEXOS OBLIGATORIOS

16. 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.



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIOS DE DIAGNOSTICO E INVESTIGACION EN SALUD
PROYECTO: 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 SUSCEPTIBILIDAD A LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO



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.

Personas a contactar

Si tiene cualquier pregunta, o en caso de algún efecto adverso por la toma de muestra sanguínea, por favor hable con los médicos, Dr. Luis Fernando Sosa al celular 70592562, al SELADIS 2222436. Dra. María de los Ángeles Terán de Baudoin. UNIMED av, Arce 2630, teléfono 2431133, celular 70142282,. Dr. Raúl Plata Cornejo. Instituto de Nefrología calle Presbítero Medina N° 2395 Teléfono 2412809, 2418214, celular 70112221.



1. DATOS PERSONALES:

Nombre y Apellidos.....
Lugar y fecha de nacimiento.....
Edad actual.....Genero.....C.I.....
Dirección Actual.....
Ocupación actual (Profesión).....Tel Dom/Cel.....
Estado civil.....Toma de muestra (fecha).....

2. ANTECEDENTES FILOGENETICOS (DONDE NACIERON):

Padre (P):..... Abuelo (P):..... Abuela (P):.....
Madre (M):..... Abuelo (M):..... Abuela (M):.....

3. ANTECEDENTES PATOLÓGICOS FAMILIARES (LES EN LA FAMILIA):

Padre (P) Abuelo (P) Abuela (P)
Madre (M) Abuelo (M) Abuela (M)
Hermano(a) Tío(a) Otros(as)

4. ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLÓGICOS:

Nº de parejas sexuales y/o matrimonios anteriores
Hijos vivos Nº Abortos Nº Grupo sanguíneo

5. HISTORIA CLINICA:

Motivo de la consulta.....
.....
.....

Tratamiento antibiótico actual: SI NO

¿Cuál?.....

Nº de sistemas implicados:

Renal Hepática
Dermatológicas Respiratorio
Hematológico Serológicas
Neurológicas Ds-DNA
Articular ANA
Gastrointestinal C3 y C4

Biopsia Renal: SI NO

Resultados:.....



**FORMULARIO HISTORIA CLÍNICA
LES-ECA-HLA**

COD: FOR- HCLEH
Página 2 de 2

¿De qué origen étnico se considera usted?

Caucásico Mestizo Indígena Afroamericano Asiático Otro

Por favor marque con una X donde corresponda:

	nunca	alguna vez	frecuente mente
¿Alguna vez ha tenido enrojecimiento o erupción sobre la nariz y las mejillas en forma de mariposa?			
¿Alguna vez ha tenido erupción después de exponerse al sol? (no es quemadura)			
¿Ha experimentado caída de pelo notable de forma localizada?			
¿Ha presentado orina espumosa, sangre en la orina o dolores en los riñones?			
¿Ha notado la aparición de llagas orales o nasales por 5 días o más?			
¿Ha tenido dolores articulares o artritis?			
¿Alguna vez ha tenido dolor de pecho al respirar profundo?			
¿Ha tenido usted convulsiones y/o problemas de memoria?			
¿Ha tenido usted anemia?			
¿Ha tenido usted bajo conteo de células blancas o bajo conteo de plaquetas?			
¿Ha tenido hinchazón?			

Medico solicitante:..... Especialidad.....

Observaciones.....

.....

.....

La Paz,..... de de 201



**FORMULARIO HISTORIA CLÍNICA
LES-ECA-HLA**

COD: FOR- HCLEH
Página 2 de 2

¿De qué origen étnico se considera usted?

Caucásico Mestizo Indígena Afroamericano Asiático Otro

Por favor marque con una X donde corresponda:

	nunca	alguna vez	frecuente mente
¿Alguna vez ha tenido enrojecimiento o erupción sobre la nariz y las mejillas en forma de mariposa?			
¿Alguna vez ha tenido erupción después de exponerse al sol? (no es quemadura)			
¿Ha experimentado caída de pelo notable de forma localizada?			
¿Ha presentado orina espumosa, sangre en la orina o dolores en los riñones?			
¿Ha notado la aparición de llagas orales o nasales por 5 días o más?			
¿Ha tenido dolores articulares o artritis?			
¿Alguna vez ha tenido dolor de pecho al respirar profundo?			
¿Ha tenido usted convulsiones y/o problemas de memoria?			
¿Ha tenido usted anemia?			
¿Ha tenido usted bajo conteo de células blancas o bajo conteo de plaquetas?			
¿Ha tenido hinchazón?			

Medico solicitante:.....Especialidad.....

Observaciones.....

.....
.....

La Paz,..... de de 201

Calculos para el preparado del MIX.

dNTPs

$$C1 = 25\text{mM}$$

$$C2 = 10\text{mM}$$

$$V1 = ?$$

$$V2 = 50\text{uL}$$

$$V1 = \frac{C2 \cdot V2}{C1}$$

$$V1 = \frac{10\text{mM} \cdot 50\text{uL}}{25\text{mM}} = 20\text{uL (c)} + 30\text{uL H}_2\text{O}$$

$$C1 = 10\text{mM}$$

$$C2 = 0,2\text{mM}$$

$$V1 = ?$$

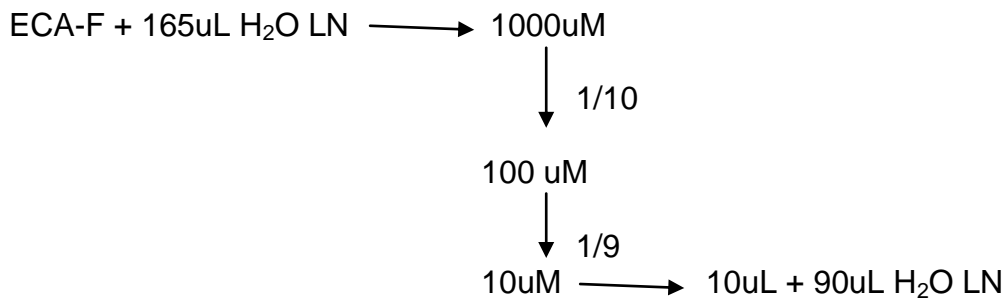
$$V2 = 20\text{uL}$$

$$V1 = \frac{C2 \cdot V2}{C1}$$

$$V1 = \frac{0,2\text{mM} \cdot 20\text{uL}}{10\text{mM}} = 0,4 \text{ uL}$$

Primers

Verificar en el inserto el volumen de resuspension para cada primers.



$$C1 = 10\text{uM}$$

$$C2 = 1\text{uM}$$

$$V1 = ?$$

$$V2 = 20\text{uL}$$

$$V1 = \frac{C2 \cdot V2}{C1}$$

$$V1 = \frac{1\text{uM} \cdot 20\text{uL}}{10\text{uM}} = 0,2\text{uL primers}$$

Taq Polimeraza

$$C1 = 5 \text{ U/uL}$$

$$C2 = 1 \text{ U/uL}$$

$$V1 = 1 \text{ uL}$$

$$V2 = ?$$

$$V2 = \frac{V1 \cdot C2}{C1}$$

$$V2 = \frac{1\text{U/uL} \cdot 1\text{uL}}{5\text{U/uL}} = 0,2\text{uL} \cdot 2 = 0,4 \text{ uL Taq}$$

Calculo del Buffer de reaccion.

Según las indicaciones del proveedor para la Taq platinum.

50 uL mix \longrightarrow 5 uL Buffer
20 uL mix \longrightarrow X Buffer

X= 2 uL de Buffer

Calculo del MgCl2

C1= 50 mM V1= $\frac{C2 \cdot V2}{C1}$ V1= $\frac{2 \text{ mM} \cdot 20 \text{ uL}}{50 \text{ mM}} = 0,8 \text{ uL MgCl}_2$
C2= 2 mM
V1=?
V2= 20uL