

# DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL GEN HLA-DRB1 EN PACIENTES LÚPICOS CON COMPROMISO RENAL

Daniel Ccolcca<sup>1</sup>, Rubén Castellón<sup>2</sup>, José A. Proaño<sup>1</sup>, Francis Valdivia<sup>1</sup>, Víctor Neyra<sup>3</sup>, Jorge Rodríguez<sup>4</sup>, José L. Rojas<sup>5</sup>, Norman Valdivia<sup>1</sup>, María I. Mimbela<sup>1</sup>, Alfredo Berrocal<sup>1</sup>, José L. Aguilar<sup>1,6</sup>

---

**Correspondencia**  
Daniel Ccolcca  
socreuma@yahoo.es

---

<sup>1</sup> Servicio Inmuno-Reumatología del HCH. Lima, Perú

<sup>2</sup> Maestrando de Inmunología, Escuela de Posgrado. UPCH, Lima, Perú.

<sup>3</sup> Lab de Histocompatibilidad y Biología Molecular. Unidad de Trasplante. HCH.

<sup>4</sup> Unidad de Biotecnología Molecular. Dpto. Ciencias Celulares y Moleculares. Facultad de Ciencias. UPCH.

<sup>5</sup> Escuela de Posgrado "Víctor Alzamora Castro", UPCH

<sup>6</sup> Laboratorio de Inmunología, Dpto. Ciencias Celulares y Moleculares. Facultad Ciencias. UPCH.

## RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar la existencia de genes del locus HLA-DRB1 que se asocian a compromiso renal en pacientes peruanos mestizos con LES.

**Materiales y Métodos:** Estudio comparativo de tipo transversal. Se evaluaron 93 pacientes con Dx. definido de LES (según criterios de ACR-2012), que acudieron al servicio de Inmuno-Reumatología del Hospital Cayetano Heredia (HCH) entre enero 2018 a junio 2019. Se consignaron manifestaciones demográficas, clínicas y laboratoriales en una ficha especialmente desarrollada. La evaluación del compromiso renal se evaluó utilizando los scores de SLEDAI-2K, SLICC 2012. El tipaje molecular HLA de alta resolución se desarrolló por la metodología de reacción en cadena de polimerasa (PCR), utilizando la plataforma de LUMINEX. Toda la genotipificación se realizó en el Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular del HCH.

**Resultados:** Se evaluaron 93 pacientes con LES, de los cuales 52 tuvieron compromiso renal y 41 sin compromiso renal. Se tuvieron con 62 controles sanos, posibles donantes sanos. Los 3 alelos en baja resolución más frecuentes en los 93 pacientes de la población lúpica fue: HLA-DR\*04 (36/186 [considerando número total de alelos], 19.35%), DR\*09 (35/186, 18.82%), DR\*08(16/186, 8.60%). Mientras en el grupo control sano fue: HLA-DR\*04(32/124, 25.81%), DR\*08 (23/124, 18.55%), DR\*09 (17/124, 13.71%). No hubieron diferencias genómicas entre los grupos evaluados. En el tipaje de alta resolución el alelo más frecuente fueron HLA-DR\*09:01: 20.19% en lúpicos con compromiso renal, 15.85% en lúpicos sin compromiso renal y 12.90% en sujetos normales, sin embargo, esta diferencia no fue significativa.

**Conclusiones:** En este primer estudio del tipaje HLA-DRB1 de pacientes lúpicos exclusivamente en mestizos peruanos se encontró un incremento no significativo en prevalencia del alelo HLA-DR\*09:01 entre lúpicos con y un grupo de población sana peruana

## INTRODUCCIÓN

Lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune crónica con fuertes componentes genéticos y ambientales, que afecta predominantemente a mujeres en un 90%. La enfermedad se caracteriza por daño vascular y presencia de auto-anticuerpos, principal responsable en la patogénesis. LES es considerado una enfermedad multisistémica, ya que puede afectar a diversos órganos, como articulaciones, riñones, corazón, sistema nervioso, pulmones, sistema hematológico o piel. La nefritis por lupus (NL) es una complicación del LES y se asocia con una mala supervivencia y una alta morbilidad. Estudios genómicos en todo el mundo, han encontrado varios alelos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), llamado antígeno leucocitario humano (HLA) que están relacionados con susceptibilidad al LES. Del mismo modo se ha encontrado cierta asociación de los genes HLA con daño renal en pacientes con LES, que posteriormente conlleva deterioro del paciente.<sup>1-3</sup>

La contribución de determinados genes en el riesgo de desarrollar la enfermedad, se han encontrado especialmente en la región del MHC, ubicado en el brazo corto del cromosoma 6 (la región más polimórfica del genoma), el cual se encuentra dividido en tres regiones denominadas clase I, II y III. Las de clase I y II codifican las proteínas del HLA, que participan en la presentación de antígenos al receptor de las células T (TCR). Por otro lado, el MHC de clase II, está frecuentemente asociado a enfermedades. Esta región confiere el mayor riesgo genético de LES en todas las poblaciones estudiadas, con fuertes evidencias de asociación en la clase II, en el locus HLA-DRB1, específicamente en los alelos: HLA-DRB1\*03:01 y HLA-DRB1\*15:01, pero también asociado con otros alelos como HLA-DRB1\*08:01 y HLA-DRB1\*14:01.4-7

Similar asociación con susceptibilidad a LES se encontró en poblaciones de África, Europa, Asia, Norteamérica, América central y Sudamérica con alelos HLA-DR2 y HLA-DR3.<sup>8,9</sup>

Por otro lado, el HLA DRB1\*13 cumpliría una función protectora para las enfermedades autoinmunes, con una asociación negativa en los

pacientes que presentan LES reportadas en la población de Portugal<sup>10</sup>

En un estudio realizado a nivel latinoamericano encontraron que los grupos HLA-DR2 y -DR3 confieren susceptibilidad a LES y aumentan el riesgo en los latinoamericanos de desarrollar esta enfermedad en 1,75 y 2,02, respectivamente<sup>11</sup>

Del mismo modo se realizó un estudio en una población japonesa específicamente sobre alelos HLA DRB1 con efecto protector, y se evidenció una función protectora de los alelos HLA-DRB1 \* 13: 02 y \* 14: 03 en LES.<sup>12,13</sup>

Otro estudio sobre un mapeo genético entre afroamericanos y europeos con respecto a LES, concluyen que los afroamericanos tienen de 2 a 3 veces mayor riesgo de susceptibilidad a LES vs los europeos, corroborando estudios anteriores.<sup>14</sup>

Este estudio busca la asociación del locus HLA-DRB1 con compromiso renal en pacientes peruanos mestizos con LES.

## MATERIALES Y MÉTODOS:

### Tipo de estudio:

Estudio comparativo de tipo transversal

### Tamaño muestral:

Se tomó como antecedente un estudio realizado en Taiwán donde se emplea una población de 108 de pacientes con LES con nefritis lúpica (NL) <sup>14</sup>. a su vez también incluyen controles sanos sin LES. Se decide incluir en el estudio 118 pacientes distribuidos en 02 grupos de 59 cada uno. En este reporte preliminar se incluyeron al estudio 93 pacientes con LES a su vez se cuenta con 62 controles sanos sin LES que son donantes del programa de trasplante renal.

### Colección de muestras:

Se incluyeron en el estudio a 93 pacientes con diagnóstico de LES, ingresados por consulta

externa, hospitalizados y por emergencia del servicio de reumatología del Hospital Cayetano Heredia (HCH). El diagnóstico de LES se estableció aplicando los criterios del American College of Rheumatology (ACR) 2012.

La información se obtuvo a través de la historia clínica del paciente que fue facilitada al momento de la consulta con el médico tratante y fue recolectada por el médico especialista del servicio de inmuno-reumatología del HCH en una ficha de datos. El estudio tuvo aprobación del Comité de Ética de la UPCH y del Comité de Ética Institucional del HCH.

### **Población de estudio:**

Para los pacientes lúpicos se aplicaron los siguientes criterios:

#### **Criterio de inclusión**

- Pacientes Diagnosticados con LES, según criterios de la ACR 2012, 04 criterios de positividad para LES.
- Pacientes con ANA + (Anticuerpos Antinucleares), Anti dsDNA+ (anti-DNA de doble cadena).
- Pacientes mayores de 18 años
- Consentimiento informado firmado voluntariamente por el paciente.
- Género Femenino y masculino.
- Pacientes admitidos de consulta externa, emergencia y hospitalizados.
- Pacientes con diagnóstico de LES y compromiso renal: según evaluación clínica y laboratorial que indiquen daño renal, considerando:
  - Laboratorio, con proteinuria  $\geq 0.5$  g/24 horas.
  - Determinación de Urea, Creatinina por encima de valor referencial,
  - Sedimento urinario con presencia de hematíes, presencia de cilindros granulados o hialinos.
  - Disminución de complemento C3 y C4
  - Biopsia renal patológica que evidencie algún tipo de daño renal
- Pacientes con diagnóstico de LES sin daño renal:

Según evaluación clínica que no indiquen daño renal:

Sedimento urinario negativo,

No hematuria.

No presencia de cilindros en orina

No presencia de proteínas en orina,

Urea y creatinina dentro de los valores referenciales,

Complemento sérico C3 y C4 dentro de los valores referenciales

Biopsia renal negativo no sugestivo de patología.

### **Criterios de exclusión**

- Gestantes.
- LES inducido por fármacos
- Otras enfermedades autoinmunes del tejido conectivo que no sea LES clínicamente evaluado. (Evaluados por el médico especialista).

Los controles sanos fueron colectados del banco de datos del laboratorio de Histocompatibilidad del HCH, de potenciales donantes renales sanos.

### **Enrolamiento de pacientes y colección de muestras**

Todos los pacientes fueron enrolados del Hospital Cayetano Heredia, previa firma del consentimiento informado, las muestras de sangre total fueron obtenidas mediante venupunción y colectadas en tubos tipo "Vacutainer" de tapa amarilla con CPD (para extracción de ADN), volumen de 6ml

### **Ensayos de Biología Molecular**

Extracción de ADN, Se obtuvo ADN genómico de las células blancas mediante el protocolo de Qiagen "QIAamp®DNA Mini Kit". Luego el ADN fue cuantificado por absorbancia mediante lecturas OD 260/280nm en el equipo QUBIT y estas muestras fueron utilizadas para los ensayos de PCR e Hibridización.

Tipificación molecular HLA-DRB1, se realizó mediante el kit de tipificación molecular de HLA-DRB1 genómico por secuencia de oligonucleótidos(SSO) de la marca LIFECODES utilizando el software y las recomendaciones del fabricante. Se logra obtener una tipificación molecular de alta resolución del gen (eRES) HLA-DRB1. Se utilizó la plataforma de LUMINEX® para realizar el procedimiento.

### Análisis Estadísticos:

Las frecuencias alélicas, número de alelos por locus, heterocigocidad observada ( $H_O$ ) y esperada ( $H_E$ )<sup>15</sup>, contenido de información polimórfica (PIC)<sup>16</sup>, probabilidad de exclusión individual (PE)<sup>17</sup> para la totalidad de individuos analizados (N=155) fueron determinadas utilizando el programa Cervus v3.018.

Las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (deficiencia o exceso de heterocigotos) para cada población en estudio se estimaron mediante la prueba U (Score test) y el método de Fisher, utilizando el algoritmo de Cadena de Markov (MC) [Dememorization: 10 000, batches: 100, ititeration per batch: 10 000] para estimar el valor exacto de probabilidad<sup>19</sup>, disponible en el programa Genepop v4.020.

Un análisis de diferenciación génica y genotípica entre poblaciones fue estimado mediante la prueba G exacta (exact G test) y el método de Fisher, utilizando el algoritmo de cadena de Markov (MC) [Dememorization: 10 000, batches: 100, ititeration per batch: 10 000] para estimar el valor exacto de probabilidad<sup>16</sup>, disponible en el programa Genepop v4.020.

El grado de diferenciación genética entre las 3 poblaciones (lúpica con compromiso renal, lúpica sin compromiso renal y no lúpicas) en conjunto fue cuantificada mediante el valor de FST<sup>21</sup> utilizando el programa Genepop v4.020.

### RESULTADOS:

En este reporte preliminar se evaluaron 93 LES con genotipificación definida, de un total del tamaño muestral de 118 casos. Se tuvieron 62 controles sanos, igualmente, de población mestiza peruana, potenciales donantes sanos.

Se identificaron un total de 44 alelos para el gen DRB1 para la población peruana (N=155), con una mayor presencia de alelos en la población lúpica con compromiso renal y menor presencia de alelos en la población lúpica sin compromiso renal, sin la presencia de alelos privados para cada una de las poblaciones lúpicas y sanas. Ver Tabla 1

Locus	A	N	$H_O$	$H_E$	PIC	PE2
Lupus no renal	25	41	0.902	0.935	0.918	0.847
Lupus Renal	30	52	0.923	0.927	0.913	0.839
Sanos	28	62	0.823	0.929	0.916	0.842
Total pop	44	155	0.877	0.928	0.921	0.851

Tabla 1. Número de alelos (A), número de individuos analizados (N), heterocigocidad observada ( $H_O$ ), heterocigocidad esperada ( $H_E$ ), contenido de información polimórfica (PIC) y probabilidad de exclusión (PE) para el locus DBR1 en 2 poblaciones lúpicas (con compromiso renal y sin compromiso renal) y una población no lúpica (sana) peruanas (N=155).

Los alelos más frecuentes en poblaciones peruanas fueron 09.01, 08.02 y 04.07 con frecuencias de 0.1613, 0.1323 y 0.0968 respectivamente. Sin embargo, las poblaciones lúpicas presentaron una mayor frecuencia del alelo 09.01 (15.85% para poblaciones con compromiso renal y 20.19% para poblaciones sin

compromiso renal) a diferencia de lo observado en la población sana (12.9%).

La frecuencia de alelos en baja resolución no mostró diferencias significativas entre la población lúpica y sujetos sanos. Ver Tabla 2

	PACIENTES LES	SANOS
DR*04	19.35%	25.81%
DR*09	18.82%	13.71%
DR*08	8.60%	18.55%

Tabla 2. Alelosen baja resolución más frecuentes en población lúpica y sana

Al analizar la población lúpica con y sin compromiso renal comparativa a la población sana, tampoco se encontró diferencias significativas. Ver Tabla 3

	LES		SANOS
	RENAL	LES NO RENAL	
DR*04	20/104 (19.23%)	16/82 (19.5%)	32/124 (25.81%)
DR*09	21/104 (20.19%)	14/82 (17.07%)	17/124 (13.71%)
DR*08	16/104 (15.38%)	12/82 (14.63%)	23/124 (15.55%)

Tabla 3. Alelos en baja resolución más frecuentes en población lúpica con y sin compromiso renal y sana

La tipificación HLA-DRB1 en alta resolución mostró mayor frecuencia del alelo HLA-DR\*09:01 en población lúpica con compromiso renal comparado a la población sana, sin embargo, esta diferencia no fue significativa. Ver Tabla 4

	LES		SANOS
	RENAL	LES NO RENAL	
DR*09:01	21/104 (20.19%)	13/82 (15.85%)	16/124 (12.9%)
DR*08:02	13/104 (12.50%)	9/82 (10.98%)	19/124 (15.32%)
DR*04:07	8/104 (7.69%)	9/82 (10.98%)	13/124 (10.48%)

Tabla 4. Alelos en alta resolución más frecuentes en población lúpica con y sin compromiso renal y sana

La heterocigosidad observada (HO), heterocigosidad esperada (HE), contenido de información polimórfica (PIC) y probabilidad de exclusión (PE) observado para el locus DRB1 (Tabla 1) para la población peruana, indica la elevada informatividad del locus analizado, sin embargo se observa la presencia de desequilibrio de Hardy Weinberg en la población sana debido a deficiencia de heterocigotos ( $p < 0.01$ ) en contraste con lo observado para las poblaciones lúpicas (con y sin compromiso renal).

No se observaron diferencias significativas en los patrones de distribución alélica (diferenciación génica) y genotípica (diferenciación genotípica) ( $p > 0.05$ ) ni valores de  $F_{ST}$  (0.003,  $p > 0.05$ ) entre

las tres poblaciones lúpicas y no lúpicas (sanas) analizadas para el locus DRB1.

En conclusión de esta evaluación, se demuestra elevada variabilidad genética en el locus DRB1 en la población mestiza peruana con o sin diagnóstico de LES y dentro de la población lúpica con o sin compromiso renal, con la presencia de 3 alelos con mayor frecuencia en la población peruana. Aunque no se obtuvo una diferencia estadísticamente en la distribución diferenciada de las frecuencias alélicas en individuos sanos y lúpicos, sin embargo, el alelo HLA-DR\*09:01 mostró más frecuencia en población lúpica con compromiso renal, requiriéndose un tamaño muestral mayor para evaluar su real significancia

## REFERENCIAS

1. de Holanda MI, Klumb E, Imada A, Lima LA, Alcántara I, Gregorio, et al. The prevalence of HLA alleles in a lupus nephritis population. *Transpl Immunol.* 2018 Apr;47:37-43.
2. Morris DL, Taylor KE, Fernando MM, Nititham J, Alarcón-Riquelme ME, Vyse TJ. Unraveling multiple MHC gene associations with systemic lupus erythematosus: model choice indicates a role for HLA alleles and non-HLA genes in Europeans. *Am J Hum Genet.* 2012 Nov 2; 91(5):778-93
3. Barcellos LF, SL de mayo, Ramsay PP, Quach HL, Lane JA, Nititham J. et al, La detección por SNP de alta densidad del complejo de histocompatibilidad principal en el lupus eritematoso sistémico demuestra una fuerte evidencia de regiones de susceptibilidad independientes. *PLoS Genet.* 2009. (10): e1000696
4. Morris DL, Fernando MM, Taylor KE, Chung SA, Nititham J, Criswell LA. MHC associations with clinical and autoantibody manifestations in European SLE. *Genes Immun.* 2014 Apr;15(4):210-7
5. Rullo OJ, Tsao BP. 2013. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2013 ;72 Suppl 2:56-61.
6. Fernández M, Alarcón GS, Calvo-Alén J, Andrade R, McGwin G Jr, Vilá LM, et al. A multiethnic, multicenter cohort of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) as a model for the study of ethnic disparities in SLE. *Arthritis Rheuma.* 2007, pp 576–584
7. Hom G, Graham RR, Modrek B, Taylor KE, Ortmann W, Garnier S, et al. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med.* 2008 Feb 28; 358(9):900-9.
8. Sanchez E , Webb R, Rasmussen A, Kelly JA , Riba L, Kaufman KM et al. Genetically Determined Amerindian Ancestry Correlates with Increased Frequency of Risk Alleles for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 62(12): 3722–3729.
9. Chung SA , Brown EE , Williams AH , Ramos PS , Berthier CC , Bhangale T. et al Lupus Nephritis Susceptibility Loci in Women with Systemic Lupus Erythematosus. *J Am Soc Nephrol.* 2014; 25(12): 2859–2870
10. Bettencourt A, Carvalho C , Leal B, Brás S , Lopes D , Martins da Silva A , Santos E. et al. El papel protector de HLA-DRB1 \* 13 en enfermedades autoinmunes. *J Immunol Res.* 2015; 2015: paginas 6

11. Castaño-Rodríguez N, Díaz-Gallo LM, Pineda-Tamayo R, Rojas-Villarraga A, Anaya JM. Meta-analysis of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 polymorphisms in Latin American patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2008 Feb;7(4):322-30
12. Furukawa H, Kawasaki A, Oka S, Ito I, Shimada K, Sugii S. et al. Human Leukocyte Antigens and Systemic Lupus Erythematosus: A Protective Role for the HLA-DR6 Alleles DRB1\*13:02 and \*14:03. *PLoS One.* 2014; 9(2): e87792
13. Lianxiang Q, Jicheng LV, Xujie Z, Ping H, Haizhen Y. and Hong Z. Association of irf5 gene polymorphisms and lupus nephritis in a Chinese population. *Nephrology*15 (2010) 710–713
14. Hanscombe KB, Morris DL, Noble JA, Dilthey AT, Tombleson P, Kaufman KM et al. Genetic fine mapping of systemic lupus erythematosus MHC associations in Europeans and African Americans. *Hum Mol Genet.* 2018 Nov 1; 27(21): 3813–3824.
15. Nei, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the national academy of sciences USA.* 1973;70:3321--3323.
16. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J human genetics.* 1980;32:314–31.
17. Jamieson A., Taylor S.C. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal genetics,* 1997;28:397–400.
18. Kalinowski S.T., Taper M.L., Marshall T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular ecology.* 2007;16:1099–106.
19. Guo, S. W., Thompson, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics.* 1992;48:361-372.
20. Raymond, M., Rousset, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of heredity.* 1995;86:248-249.
21. Weir, B.S., Cockerham, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 1984;38:1358-1370.