

HLA clase II en pacientes mexicanos con pénfigo vulgar: epítipo compartido para autoinmunidad

Lucía Rangel-Gamboa^{1*}, María Elisa Vega-Memije¹, Víctor Acuña-Alonzo² y Julio Granados-Arriola³

¹Subdirección de Investigación, Hospital Dr. Manuel Gea González; ²Laboratorio de Genética Molecular, Escuela Nacional de Antropología e Historia;

³Departamento de Trasplantes, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Ciudad de México, México

Resumen

Introducción: Los pénfigos son enfermedades ampollosas, autoinmunes, adquiridas, de piel y mucosas, caracterizadas por la presencia de anticuerpos IgG dirigidos contra las desmogleínas 3 y 1. Estas proteínas están presentes en las formas clínicas de pénfigo vulgar y foliáceo, respectivamente. Las desmogleínas son proteínas transmembrana componentes de las uniones celulares denominadas desmosomas. Las moléculas del MHC clase II participan en procesos autoinmunes; en el pénfigo se asociaron diferentes HLA, como HLA-DR4, HLA-DR14 y HLA-DR1, en diversas poblaciones. **Objetivo:** Determinar las frecuencias génicas de alelos HLA-DR en pacientes mexicanos con pénfigo. **Método:** Se incluyeron pacientes con diagnóstico clínico, histológico y por inmunofluorescencia directa de pénfigo, estudiados en el Departamento de Dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González. El ADN se obtuvo a partir de muestras de sangre periférica y la tipificación génica de HLA-DRβ1 se realizó por el método de reacción en cadena de la polimerasa e hibridación con sondas específicas. Se incluyeron 43 pacientes, con edades comprendidas entre 16 y 85 años; 35 mujeres (81.4%) y 8 hombres (18.6%). **Resultados:** Se encontró un aumento de la frecuencia génica de los alelos HLA-DR14 y HLA-DR1 en los pacientes con pénfigo; estos alelos confieren un riesgo para presentar pénfigo de 2.2 y 3.3, respectivamente. **Conclusión:** Los resultados sugieren que la susceptibilidad para el pénfigo es parte de la susceptibilidad general para autoinmunidad.

PALABRAS CLAVE: Pénfigo vulgar. HLA clase II. Autoinmunidad. Epítipo. DRβ1.

Abstract

Introduction: Pemphigus is an autoimmune blistering disease of skin and mucous membranes characterized by presence of IgG antibodies against desmoglein 3, and 1. Desmoglein 3 and 1 are presented in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus, respectively. Desmoglein are transmembrane proteins that form part of cellular junctions called desmosomes. Major histocompatibility complex class II molecules have been related to autoimmune disease; in pemphigus vulgaris, different human lymphocyte antigens (HLA) were associated among different ethnic groups, such as HLA-DR4, HLA-DR14, and HLA-DR1. **Objective:** to determine the allele HLA-DR genetic frequencies in Mexican patients with pemphigus. **Method:** Patients with clinical, histological, and immunofluorescence diagnosis monitored at the Dermatology Department of the Mexican General Hospital were included. DNA was extracted from blood samples and genetic recognition of HLA-DRβ1 was

Correspondencia:

*Lucía Rangel-Gamboa
Departamento de Ecología de Agentes Patógenos
Subdirección de Investigación
Hospital General Dr. Manuel Gea González
Calzada de Tlalpan, 4800
Col. Sección XVI
C.P. 14080, Ciudad de México, México
E-mail: draluciarangel@yahoo.com.mx

Fecha de recepción: 08-06-2015
Fecha de aceptación: 23-07-2015

performed by polymerase chain reaction and hybridization. Forty-three patients with pemphigus were included: 35 (81.4%) women and eight men (18.6%) between 16 and 85 years old. **Results:** The HLA-DR14 and HLA-DR1 genetic frequencies were elevated among pemphigus patients and these alleles confer risk to pemphigus 2.2 and 3.3, respectively. **Conclusion:** These findings suggest that pemphigus vulgaris susceptibility is part of a general predisposition to present autoimmune diseases. (Gac Med Mex. 2016;152:587-91)

Corresponding author: Lucía Rangel-Gamboa, draluciarangel@yahoo.com.mx

KEY WORDS: Autoimmunity. DR β 1. Epitope. HLA class II. Pemphigus.

Introducción

El pénfigo vulgar (PV) es una enfermedad autoinmune adquirida, en la cual anticuerpos IgG dirigidos contra las proteínas desmosomales producen ampollas intraepiteliales (Figs. 1 y 2). La desmogleína (Dsg) 3 es el principal antígeno¹, pero del 50 al 60% de los pacientes tienen anticuerpos adicionales contra la Dsg 1, que es el antígeno del pénfigo foliáceo (PF)². El pénfigo se ha observado en todas las edades y razas; predomina de los 30 a 60 años. Afecta ambos sexos, con discreto predominio en mujeres en una relación 1.6:1. La frecuencia varía de 0.5 a 3.2 por 100,000 habitantes por año³. La mortalidad era del 75% antes de la introducción de los corticosteroides, en 1950⁴. El diagnóstico del PV se efectúa con los datos clínicos y el estudio histológico de piel intacta perilesional o clínicamente no comprometida. La acantólisis suprabasal y la formación de ampollas son altamente sugestivas de PV (Fig. 2), pero el diagnóstico debe ser confirmado por inmunofluorescencia directa⁵, en la que se observa el depósito característico de IgG en el espacio intercelular de la epidermis (Fig. 2)². En la producción de autoanticuerpos participan moléculas codificadas por numerosos genes, algunos de ellos localizados dentro de un sistema genético denominado complejo principal de histocompatibilidad (MHC)⁶. El producto de los genes del MHC desempeña un papel en el reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T; este proceso se realiza por medio del reconocimiento de determinantes antigénicos denominados «epítomos». Existen tres clases de genes del MHC: clase I, clase II y clase III; los dos primeros son codificados por el sistema del antígeno leucocitario humano (HLA)⁷. Estas moléculas funcionan como elementos de restricción, esenciales para el reconocimiento de los antígenos por los linfocitos T citotóxicos CD8+⁸.

En el caso de los pacientes mexicanos, en un estudio previo con un número reducido de pacientes se

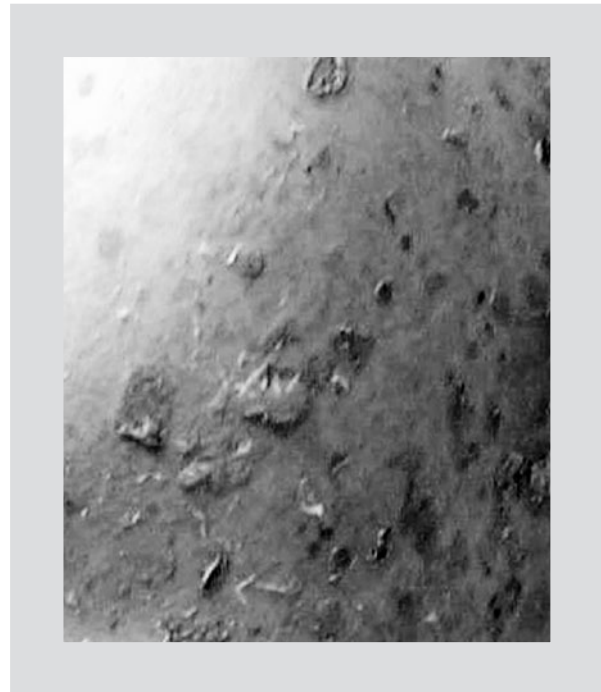


Figura 1. Paciente con PV que presenta ampollas flácidas y erosiones, (fotos del archivo del Servicio de Dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González).

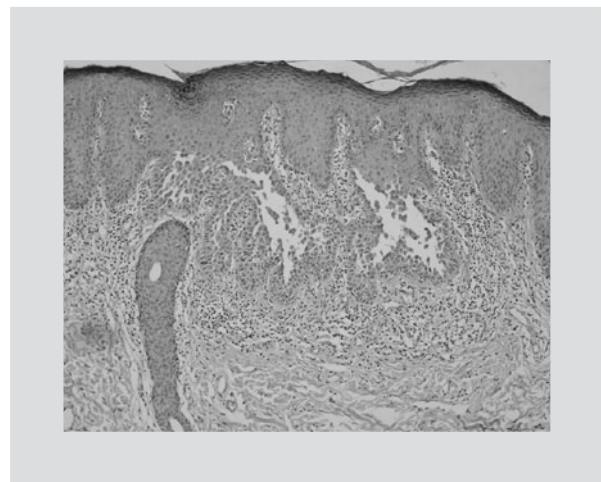


Figura 2. Histopatología, H&E 10x. Obsérvese la formación de ampollas intraepiteliales caracterizadas por acantólisis suprabasal. Dermis papilar con abundante infiltrado inflamatorio

encontró que el HLA-DR14 (DR6) es más común en los pacientes con pénfigo, sobre todo PV, con respecto a la población sana control⁹. Por tanto, el objetivo de nuestro trabajo fue ampliar el número de pacientes y determinar las frecuencias génicas de alelos HLA-DR en pacientes mexicanos con pénfigo.

Material y métodos

Se realizó un estudio prospectivo, comparativo, abierto y observacional. Se incluyeron 43 pacientes que acudieron de forma secuencial al Departamento de Dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González durante un periodo de 12 meses consecutivos, con diagnóstico de pénfigo clínico e histológico, confirmado por inmunofluorescencia directa. Se obtuvo consentimiento informado de todos los pacientes y los procedimientos se realizaron de acuerdo a los principios expresados en la Declaración de Helsinki y las reglamentaciones del comité de ética de las instituciones participantes. Los controles cumplen con la condición de ser mexicanos sin diagnóstico de pénfigo.

Se aisló ADN genómico de células mononucleares de sangre periférica mediante la técnica de *salting-out*¹⁰. La tipificación genética de HLA-DR β 1 se realizó por el método de reacción en cadena de la polimerasa con 0.125 U/ μ l de *Taq* ADN polimerasa (Promega, Madison, WI), seguida por hibridación con sondas específicas de secuencia, mediante el equipo Dynal PCR-SSO (Hoffman La-Roche). La información de los oligonucleótidos y de las sondas que se utilizaron se tomó de las especificidades para DR y DQ publicadas en el 12.º Taller Internacional de Histocompatibilidad. Se utilizó estadística descriptiva para el análisis de los datos epidemiológicos. Se realizó el cálculo de frecuencias génicas a partir de la frecuencia de cada gen o alelo respecto al total de 2N (uno del padre y otro de la madre). El análisis de asociación de la frecuencia de cada alelo del HLA se realizó mediante tablas de contingencia de 2 \times 2 y se aplicaron la prueba de ji al cuadrado y la prueba exacta de Fisher. La fuerza de asociación en las tablas 2 \times 2 se determinó con la razón de momios, en la cual una cifra mayor de 1 es asociación positiva o de susceptibilidad, y menor de 1 es negativa o de protección.

Resultados

Se incluyeron en el estudio 43 pacientes con diagnóstico de pénfigo por clínica y confirmado por estudio histopatológico, 41 de ellos con PV (95.3%) y 2 con

PF (4.7%). El rango de edad fue de 16 a 84 años al momento del estudio, y la media de edad fue 44.26 ± 18.27 tomando la edad a la fecha del diagnóstico de pénfigo, con una desviación estándar de ± 18.27 . El grupo incluía 35 mujeres (81.4%) y 8 hombres (18.6%), presentando una relación mujer:hombre de 4.375:1. En cuanto a las enfermedades asociadas, dos pacientes presentaron enfermedades dermatológicas concomitantes (uno psoriasis y otro con hiperqueratosis palmo-plantar adquirida); una paciente tenía diagnóstico previo de esclerosis múltiple y cinco presentaban diabetes *mellitus* tipo 2. Se interrogaron posibles factores desencadenantes, sin encontrar relación alguna entre el inicio del PV o el PF y factores medioambientales. Al comparar las frecuencias génicas de HLA-DR de los pacientes con pénfigo con la población general se encontró un aumento de la frecuencia génica (fg) de los alelos HLA-DR14 y HLA-DR1 en los pacientes con pénfigo, los cuales confieren un riesgo de 2.2 y 3.3, respectivamente (Tabla 1).

Discusión

Diferentes mecanismos pueden ser responsables de la activación de células T autorreactivas en las enfermedades autoinmunes. Los alelos del MHC asociados a autoinmunidad pueden conferir susceptibilidad al afectar el desarrollo del repertorio de células T en el timo, el sistema inmunitario periférico, o al presentar péptidos propios contra los cuales se dirige una respuesta inmunitaria¹¹. Este estudio evidencia la asociación del pénfigo con los alelos HLA-DR14 (DR6) y HLA-DR1 en pacientes mexicanos y confirma lo reportado en otras poblaciones como iraníes no judíos¹², judíos askenazís¹³, amerindios¹⁴, mestizos latinoamericanos^{15,16}, caucásicos¹⁷ y turcos¹⁸, en las que los alelos HLA-DR14 (DR β 1*1401, *1405) y HLA-DR4 (DR β *0402,*0406) confieren fuerte susceptibilidad para el desarrollo de PV. Cabe destacar que el HLA-DR4 es uno de los alelos más frecuentes en la población mexicana (fg 0.237 en los controles sanos), y aun cuando se encontró elevado en los pacientes con pénfigo fg 0.313, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Por otra parte, la aparición y la progresión del pénfigo posiblemente dependen de la interacción de varios factores, algunos conocidos y otros aún por descubrir. Entre estos se encuentran factores genéticos que incluyen los alelos del HLA ya mencionados, así como otros genes en los tejidos afectados que podrían conferir mayor susceptibilidad. En el caso particular

Tabla 1. HLA-DRB1 de los pacientes con pénfigo vulgar y los controles

DRB1	Casos (n = 86)		Controles (n = 198)		p	RR
	n	fg	n	fg		
DR4	27	0.313	47	0.237	NS	–
DR14	20	0.232	21	0.105	0.09	2.5
DR8	10	0.116	33	0.165	NS	–
DR13	3	0.034	10	0.05	NS	–
DR11	2	0.023	20	0.1	NS	–
DR1	13	0.151	10	0.05	0.08	3.3
DR16	2	0.023	5	0.025	NS	–
DR7	4	0.046	22	0.111	NS	–
Otros	5	0.058	–	–	NS	–

Fg: frecuencia génica; RR: riesgo relativo.

del pénfigo, la evidencia sugiere que las moléculas que regulan la expresión de las desmogleínas, como los receptores colinérgicos, están involucradas en la fisiopatología de la enfermedad^{19,20}. Por tanto, los individuos con predisposición genética para el pénfigo desarrollarán la enfermedad solo cuando uno o más factores adicionales estén presentes. La naturaleza de la mayoría de estos factores es actualmente desconocida. Sin embargo, se han reportado como desencadenantes algunos medicamentos (penicilamina²¹, clo-roquina²², imiquimod²³), radioterapia²⁴, virus²⁵ y el uso de cosméticos²⁶, entre otros factores²⁷. Desde un punto de vista fisiopatológico, consideramos el pénfigo como una única enfermedad, con un amplio espectro de presentaciones clínicas, desde el PV oral, sin afección de la piel con IgG anti-Dsg3, la variante mucocutánea con IgG contra Dsg3 y Dsg1, hasta el PF solo con afección cutánea e IgG contra Dsg1. Los casos de transición documentados de PV a PF^{28,29}, y viceversa, apoyan esta idea. Por otra parte, alelos específicos en el locus HLA-DR β 1 se han asociado a enfermedades autoinmunes, como la enfermedad de Graves, el lupus eritematoso sistémico^{30,31}, el síndrome autoinmune contra la insulina, la artritis reumatoide, la hepatitis crónica autoinmune³² y la esclerosis múltiple³³. En el caso específico de la artritis reumatoide, esta enfermedad se asoció con un número restringido de alelos del locus HLA-DR β 1, principalmente DRB1 *0401, *0404 y *0101. Cada uno de estos alelos comparte secuencias homólogas en la tercera región hipervariable de la cadena β , lo que se denomina epítipo compartido³⁴.

Aunado a lo antes descrito, reportes de la coexistencia de dos enfermedades autoinmunes en un mismo individuo apoyan la existencia de un epítipo compartido para autoinmunidad, por lo que podemos concluir que la expresión de la enfermedad dependerá de la interacción con el medio, así como de otros determinantes genéticos aún por descubrir.

Agradecimientos

Al Servicio de Dermatología del Hospital Dr. Manuel Gea González; a mis maestros Dr. Luciano Domínguez, Dra. Judith Domínguez Cherit y Dra. Teresa Hojo.

Financiamiento

Esta investigación se realizó con recursos propios de las instituciones participantes.

Bibliografía

- Amagai M. Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48:244-52.
- Harman K, Gratian M, Bhogal B, Challacombe S, Black M. A study of desmoglein 1 autoantibodies in pemphigus vulgaris: racial differences in frequency and the association with a more severe phenotype. *Br J Dermatol.* 2000;143:343-8.
- Vega M, Villatoro V, Mosqueda A. Pénfigo vulgar: informe del manejo de 40 casos. *Rev Mex Dermatología.* 1998;42: 244-9.
- Harman K, Albert S, Black M. Guidelines for the management of pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol.* 2003;149:926-37.
- Mutasin D, Adams B. Immunofluorescence in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 2001;45:803-22.
- Trowsdale J, Ragoussis J, Campell RD. Map of the human MHC. *Immunol Today.* 1991;12:443-6.

7. Heinrichs H, Orr HT. HLA non-A, B, C class I genes: their structure and expression. *Immunol Res.* 1990;9:265-74.
8. Ploegh H, Orr HT, Strominger J. Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, B, C) and murine (H2-K, H2-D) class I molecules. *Cell.* 1981;42:287-99.
9. Vega-Memije M, Sáez M, Cortés-Franco R, Domínguez L, Granados J. Análisis de HLA-DR en pacientes mexicanos con pénfigo. *Gac Méd Méx.* 2001;137:535-40.
10. Miller S, Dykes D, Polesky H. A salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215.
11. Wucherpfenning K. Structural basis of molecular mimicry. *J Autoimm.* 2001;16:293-302.
12. Mobini N, Yunis E, Alper C, et al. Identical MHC markers in non-Jewish Iranian and Ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris: possible common central Asian ancestral origin. *Hum Immunol.* 1997;57:62-7.
13. Scharf S, Freidmann A, Steinman L, Brautbar C, Erlich H. Specific HLA DQB y HLA DRB1 alleles confer susceptibility to pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci.* 1989;86:6215-9.
14. Hans-Filho G. dos Santo V, Katayama J, Aoki V, et al. An active focus of high prevalence of fogo selvagem on an Amerindian reservation in Brazil. *J Invest Dermatol.* 1996;107:68-75.
15. Loewenthal R, Slomov Y, Gonzalez-Escribano M, et al. Common ancestral origin of pemphigus vulgaris in Jews and Spaniards: a study using microsatellite markers. *Tissue Antigens.* 2004;63:326-4.
16. Bordenave K, Griffith J, Hordes S, Williams T, Padilla R. The historical and geomedical immunogenetics of pemphigus among the descendants of Sephardic Jews in New Mexico. *Arch Dermatol.* 2001;137:825-6.
17. Ahmed A, Wagner R, Khatri K, et al. Major histocompatibility complex haplotypes and class II genes in non-Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci.* 1991;88:5056-60.
18. Birol A, Yavuzer R, Turkak H, Gürgey E. HLA-class 1 and 2 antigens in Turkish patients with pemphigus. *Int J Dermatol.* 2002;41:79-83.
19. Vu T, Lee T, Ndoye A, et al. The pathophysiological significance of non desmoglein targets of pemphigus autoimmunity. Development of antibodies against keratinocyte cholinergic receptor in patients with pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *Arch Dermatol.* 1998;134:971-80.
20. Botelho-Nogueira L, Quarantini L, Miranda-Scippa A. Use of anticholinergic drugs and worsening of pemphigus foliaceus in a patient with bipolar disorder. *Rev Bras Psiquiatr.* 2011;33:412-3.
21. Thurston J, Marks J, Trapnell D. Pemphigus foliaceus induced by penicillamine. *Br Med J.* 1976;11:1423-4.
22. Ghaffarpour G, Jalali MH, Yaghmaei B, Mazloomi S, Soltani-Arabshahi R. Chloroquine/hydroxychloroquine-induced pemphigus. *Int J Dermatol.* 2006;45:1261-3.
23. Bauza A, Del-Pozo L, Saus C, Martin A. Pemphigus-like lesions induced by imiquimod. *Clin Exp Dermatol.* 2009;34:e60-e62.
24. Orion E, Matz H, Wolf R. Pemphigus vulgaris induced by radiotherapy. *J EADV.* 2004;18:508-9.
25. Tayyebi N, Nahidi Y, Mahmoudi M, et al. Evaluation of coexistence of the human herpesvirus type 8 (HHV-8) infection and pemphigus. *Int J Dermatol.* 2010;49:780-3.
26. Bastuji-Garin S, Turki H, Mokhtar I, et al. Possible relation of Tunisian pemphigus with traditional cosmetics: a multicenter case-control study. *Am J Epidemiol.* 2002;155:249-56.
27. Tur E, Brenner S. Diet and pemphigus. In pursuit of exogenous factors in pemphigus and fogo selvagem. *Arch Dermatol.* 1998;134:1406-10.
28. Tóth G, Pas H, Jonkman M. Transition of pemphigus vulgaris into pemphigus foliaceus confirmed by antidesmoglein ELISA profile. *Int J Dermatol.* 2002;41:525-7.
29. Tsuji Y, Kawazhima T, Yokoya K, et al. Clinical and serological transition from pemphigus vulgaris to pemphigus foliaceus demonstrated by desmoglein ELISA system. *Arch Dermatol.* 2002;138:95-6.
30. Liu X, Wu Y, Yang Y, et al. Identical twins: one with anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis the other with systemic lupus erythematosus. *BMC Nephrol.* 2013;14:1-5.
31. Furukawa H, Kawasaki A, Oka S, Ito I, Shimada K, Sugii S. Human leukocyte antigens and systemic lupus erythematosus: a protective role for the HLA-DR6 alleles DRβ1*13:02 and *14:03. *Plos one.* 2014;9:e87792.
32. Roh E, Kim YA, Ku EJ, et al. Two cases of methimazol induced insulin autoimmune syndrome in Graves' disease. *Endocrinol Metab.* 2013;28:55-60.
33. Zuñiga J, Yu N, Barquera R, et al. HLA class I and class II conserved extended haplotypes and their fragments or blocks in Mexicans: implications for the study of genetic diversity in admixed populations. *Plos one.* 2013;8:e74442.
34. Wicks I, McColl G, D'Amico A, Dougherty L, Tait B. Use of monoclonal antibodies to detect disease associated HLA-DRB1 alleles and the shared epitope in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1997;52:135-9.