Análisis de HLA-DR en pacientes mexicanos con pénfigo

María Elisa Vega-Memije,* María del Mar Sáez de Ocariz-Gutiérrez* Roberto Cortés-Franco* Luciano Domínguez-Soto,* Julio Granados-Arriola**

Recepción versión modificada: 2 de abril de 2001; aceptación: 11 de mayo de 2001

Resumen

Los pénfigos son un grupo de enfermedades ampollosas de piel y mucosas que histológicamente presentan ampollas intraepidérmicas por acantólisis y anticuerpos fijos y circulantes dirigidos contra la superficie celular de los queratinocitos.

En pacientes mexicanos que padecen pénfigo, no se han determinado desequilibrios de presentación de antígenos del HLA, como se ha estudiado en otras poblaciones, por lo que se efectuó un estudio comparativo, prospectivo, transversal y observacional en 25 pacientes; 18 de ellos con pénfigo vulgar y 7 con pénfigo foliáceo a quienes se les tomó muestra de sangre periférica para la extracción de DNA, con el método de expulsión salina ("salting out"). Se realizó determinación de HLA-DR, amplificando la región HLA-DRB1, mediante la técnica de reacción de polimerasa en cadena (PCR) y se determi-naron cada uno de los alelos con oligonucleótidos específicos de alelos (ASO), utilizando el kit Amplicor Hoffman La Roche Basilea, Suiza.

Los resultados mostraron que el HLA-DR14 (DR6) es más común en los pacientes con pénfigo, sobre todo pénfigo vulgar, que en la población sana control, esto concuerda con lo descrito en la literatura universal. Por otra parte, el HLA-DR1 representa un riesgo relativo mayor para el desarrollo de pénfigo foliáceo en nuestra población.

Palabras clave: *Pénfigo, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, antígeno de histocompatibilidad, HLA-DR.*

Summary

Pemphigus are a group of bullous skin disorders histologically characterized by intraepidermal acantholytic and circulating antibodies blisters due to directed against the cellular surface of keratinocytes.

In Mexican patients with pemphigus, HLA antigens have not been studied as they have been for other populations; for this reason, a comparative, prospective, transversal and observational study has been done with 25 patients, 18 with pemphigus vulgaris and the other seven with pemphigus foliaceus. DNA was extracted by the salting-out method and HLA-DR was determined by amplification with PCR and allele-specific oligonucleotides (ASO).

Results: HLA-DR14 (DR6) is more common in patients with pemphigus vulgaris than in the healthy population, which corroborates with previous reports.

On the other hand, as reported we also found that HLA-DR1 in Mexican population represents a higher risk for pemphigus foliaceus.

Key words: *Pemphigus, pemphigus vulgaris, pemphigus foliaceus, histocompatibility antigen, HLA-DR.*

**Departamento de Dermatología Hospital General "Dr. Manuel Gea González".*
***Departamento de Inmunología Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".*
Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dra. María Elisa Vega Memije Departamento de Dermatología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González", Tlalpan 4800, Col. Toriello Guerra, 14000, Tlalpan México, D.F.

Introducción

Los pénfigos son un grupo de enfermedades autoinmunes de piel y membranas mucosas que se caracterizan histológicamente por ampollas intra-epidérmicas debidas a acantólisis e inmunopatológicamente por el hallazgo de anticuerpos fijos y circulantes dirigidos contra la superficie celular de los queratinocitos.[1]

Clínicamente el pénfigo vulgar se caracteriza por la presencia de vesículas y ampollas en la piel y las mucosas que al romperse dejan zonas denudadas, excoriaciones y costras melicéricas (Figuras 1 y 2). En el caso del pénfigo foliáceo o seborreico, las vesículas son más superficiales, se observan placas eritematoescamosas, excoriaciones y costras melicéricas únicamente, no afecta mucosas. Se presenta por igual en hombres y mujeres.

La edad de inicio se encuentra entre la sexta y la séptima décadas de la vida.[1-3] Sin embargo, estudios realizados en otras poblaciones como la mexicana,[4] la hindú y la kuwaití,[3,5] muestran que la edad de presentación es menor.

La etiología del pénfigo es desconocida. Se coloca dentro de las enfermedades autoinmunes y la característica principal es el depósito de autoanticuerpos de tipo IgG- y a veces de IgA- contra la superficie celular de los queratinocitos.[1] Estos autoanticuerpos están dirigidos contra antígenos que forman parte de los desmosomas (desmogleina 3 y 1).[6-9]

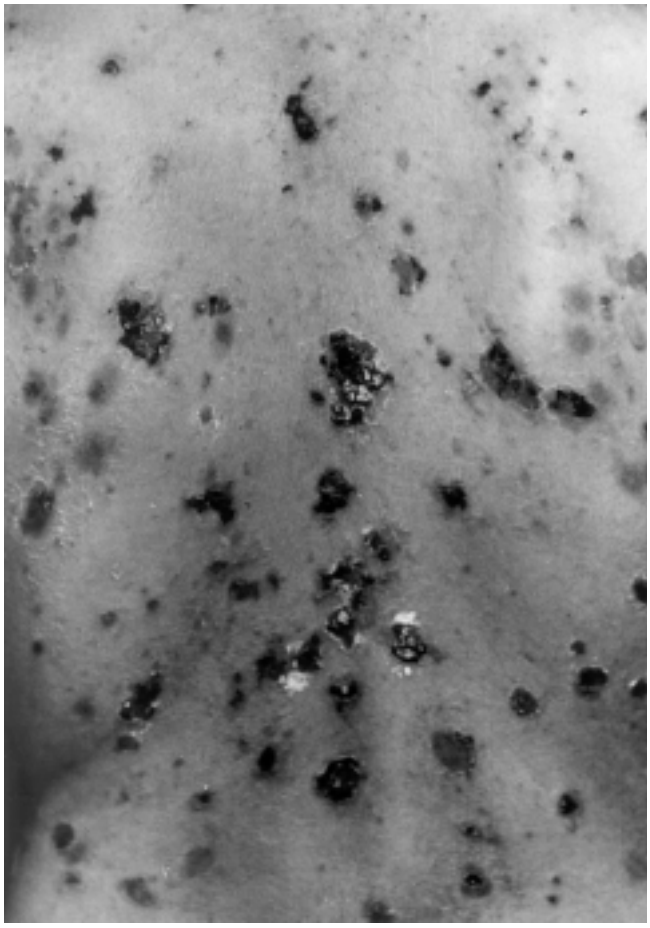

Figura 1. Paciente con pénfigo vulgar. En tronco posterior presencia de vesículas, exulceraciones y costras.

Cuadro I. Frecuencias genéticas y antigénicas del HLA-DR en pacientes con pénfigo vulgar y foliáceo y en individuos sanos

	Pacientes				Controles						
	n=25		N=50		n=96		N=152				
DR	n	fg	N	fag	n	fg	N	fag	p	RM	IC$^{95\%}$
4	18	0.360	18	0.720	46	0.240	38	0.396	NS		
14(6)	14	0.280	14	0.560	21	0.109	20	0.208	0.004	3.17	1.38-7.27
8	9	0.180	9	0.360	32	0.167	26	0.271	NS		
1	5	0.100	4	0.160	10	0.052	10	0.104	NS		
11	2	0.040	2	0.080	18	0.094	17	0.177	NS		
7	2	0.040	2	0.080	21	0.109	20	0.208	NS		
2	1	0.020	1	0.040	18	0.094	18	0.188	NS		

fg = frecuencia génica, fag = frecuencia antigénica, RM = razón de momios

Figura 2. Paciente con pénfigo vulgar, lesiones exulceradas en la mucosa de labio y encía.

Se ha encontrado que los factores genéticos pueden influir de forma importante en la patogénesis del pénfigo. De éstos, uno de los más relevantes es el complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés).

El MHC es una región de genes altamente polimórficos cuyos productos se expresan en la superficie de una variedad de células. Se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 ocupando un gran segmento del ADN y posee tres clases de genes (clase I, II y III).

Las moléculas de HLA tienen dos funciones distintas, ambas de tipo inmunológico: la primera, modelar el repertorio del receptor de células T en el timo, y la segunda, seleccionar y presentar epítopes de péptidos antigénicos a las células T periféricas.[10,11] La asociación con un HLA específico apoya la noción de que una enfermedad en particular, es autoinmune.

La asociación con un alelo de HLA específico implica que el estímulo inmunogénico para la autoinmunidad sería un péptido específico, y que al menos inicialmente la autoinmunidad es dependiente de la reactividad de una o un número limitado de clonas de células T potencialmente auto-agresivas.[12] Las células CD4+ específicas seleccionadas por moléculas de HLA asociadas con enfermedad deben estar involucradas en el desarrollo de la patología órgano-específica en estas entidades.[13] Se cree que las moléculas de histo-compatibilidad asociadas con pénfigo permiten la presentación de péptidos de desmogleína 3 o 1 a las células T.[1] Inclusive, se ha encontrado que algunos péptidos obtenidos de la desmogleína 3, capaces de *encajar* en el sitio de unión de un alelo HLA-DR específico son capaces de estimular a las células T de los pacientes con pénfigo.[14,15]

A pesar del peso que puedan tener los factores genéticos, es necesario reconocer que los estímulos ambientales son también importantes en el desarrollo de enfermedades autoinmunes y esto es particularmente cierto en el caso del pénfigo, se cree que los individuos con una predisposición genética para desarrollar pénfigo, lo manifestarán clínicamente sólo cuando uno o más factores adicionales estén presentes.[16,17]

Cuadro II. Frecuencias genéticas y antigénicas del HLA-DR en pacientes con pénfigo vulgar y en individuos sanos

	Pacientes				Controles						
	n=18		N=36		n=96		N=152				
DR	n	fg	N	fag	n	fg	N	fag	p	RM	IC$^{95\%}$
4	14	0.388	1 4	0.777	46	0.240	38	0.396	NS		
14(6)	12	0.333	1 2	0.666	21	0.109	20	0.208	0.001	4.07	1.64-10.05
8	7	0.194	7	0.388	32	0.167	26	0.271	NS		
7	2	0.055	2	0.111	21	0.109	20	0.208	NS		
2		0.027	1	0.055	18	0.094	1.8	0.188	NS		
11		0.027	1	0.055	18	0.094	1.7	0.177	NS		
2	1	0.020	1	0.040	18	0.094	18.	0.188	NS		

fg=frecuencia génica, fag=frecuencia antigénica, RM=razón de momios

medigraphic.com

Hasta el momento, no conocemos ningún estudio que haya determinado desequilibrio de presentación de antígenos HLA en pacientes mexicanos. El objetivo de este trabajo es determinar las frecuencias génicas de los alelos HLA DR de pacientes mexicanos con pénfigo (vulgar y foliáceo) y sus diferencias con la población mexicana sana.

Material y método

Se trata de un estudio comparativo, prospectivo, transversal y observacional. Se incluyeron pacientes con diagnóstico de pénfigo (tanto clínico como histológico) que fueron vistos de forma secuencial, ya fuera de primera vez o subsecuentes en el Departamento de Dermatología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" del 1 de octubre de 1998 al 30 de septiembre de 1999.

A los pacientes se les realizó un cuestionario para completar algunos datos epidemiológicos y demográficos y se les tomó una muestra de 4.5 mL de sangre periférica (previo consentimiento) para la extracción de DNA. Se realizó determinación de HLA DR amplificando la región HLA-DRB1 mediante la técnica de reacción de polimerasa en cadena (PCR) y se determinaron cada uno de los alelos mediante oligonucleótidos específicos de alelos (ASO).

La extracción de DNA genómico se realizó mediante el método de expulsión salina o *salting out*,[18] en el cual inicialmente se lisan los eritrocitos y el DNA se obtiene a partir de linfocitos periféricos en pasos secuenciales que incluyen digestión de proteinasa K, precipitación de proteínas con hidróxido de sodio y precipitación y lavado de DNA con etanol absoluto y 70% respectivamente.

La tipificación genérica de los alelos de locus HLA-DRB1 se realizó mediante el kit Amplicor (Hoffmann La Roche Basilea, Suiza), en el cual se usa la técnica de PCR, y se revela con la del dot blot reversa con oligonucleótidos específicos. Se utilizaron iniciadores o *primers* específicos para la amplificación de las regiones 3' y 5' del exon 2 del DRB1.

Posteriormente el DNA amplificado se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se hibridó con sondas de oligonucleótidos previamente marcadas con digoxigeninadideoxi-uridin-trifosfato. Para la lectura de las sondas positivas se utilizó el kit Dig de detección de ácidos nucleicos (Boehringer Mannheim Biochemical, Mannheim, Alemania).[19]

Se asignaron a los pacientes los números del estudio en forma secuencial, a medida que fueron considerados como elegibles para su inclusión. El número se anotó en la hoja de captura de datos.

Los datos epidemiológicos se analizaron mediante estadística descriptiva. En cuanto al HLA-DR, se emplearon pruebas no paramétricas para el análisis estadístico. Se compararon las frecuencias génicas de los pacientes con los controles sanos, y las diferencias se analizaron mediante las pruebas de chi cuadrada y exacta de Fisher.

Cuadro III. Frecuencias genéticas y antigénicas del HLA-DR en pacientes con pénfigo foliáceo y en individuos sanos

	Pacientes				Controles						
	n=7		N-14		n=96		N=152				
DR	n	fg	N	fag	n	fg	N	fag	p	RM	IC$^{95\%}$
1	5	0.357	4	0.571	10	0.052	10	0.104	0.0002	10.11	2.40-42.25
4	4	0.285	4	0.571	46	0.240	38	0.396	NS		
14(6)	2	0.142	2	0.285	21	0.109	20	0.208	0.004	3.17	1.38-7.27
8	2	0.142	2	0.285	32	0.167	26	0.271	NS		
11	1	0.071	1	0.142	18	0.094	17	0.177	NS		

fg=frecuencia génica, fag=frecuencia antigénica, RM=razón de momios

Resultados

Se incluyeron en el estudio 25 pacientes con pénfigo clínica e histológicamente documentado, 18 de ellos con pénfigo vulgar y 7 con pénfigo foliáceo.

De los pacientes con pénfigo, 18 fueron mujeres y siete fueron hombres, con una relación mujer-hombre de 2.5 a 1. La edad promedio al inicio de la presentación del pénfigo fue, en forma global, de 37.57 ± 17.53 años, pero al subdividirlos en vulgar y foliáceo, se encontró menor edad de presentación en los pacientes con pénfigo vulgar que en los de pénfigo foliáceo (31.72 ± 15.92 vs .54.28 ± 12.59 años).

Únicamente dos pacientes presentaron algún tipo de enfermedad autoinmune asociada: un paciente con pénfigo foliáceo y artritis reumatoide, y otro paciente con un familiar (su padre) con historia de artritis reumatoide, fallecido por causa no especificada.

En este estudio no se encontró relación alguna entre el pénfigo ya fuera vulgar o foliáceo y algún factor iniciador, exacerbador o promotor del mismo.

Al comparar los HLA-DR de la población general con los de los pacientes con pénfigo, se encontró que HLA-DR14 (DR6) se presenta con mayor frecuencia en pacientes con pénfigo (p=0.004,3.17, IC 95% 1.38-7.27) (Cuadro I). Cuando se hace la subdivisión, se torna más evidente la relación de HLA-DR14 (DR6) con el pénfigo vulgar, incrementándose tanto el significado estadístico de la asociación, como la razón de momios (p=0.001, RM 4.7, IC 95% 1.64- 10.05) (Cuadro II). Y se observó que el HLA-DR1 que de forma global no presenta un riesgo relativo mayor, sí lo es en el caso del pénfigo foliáceo (p=0.0002, RM 10.11, IC 95% 2.40-42.25) (Cuadro III).

En cuanto a los genotipos de presentación, se observa que la asociación DR14 (DR6) tiende a ser más común en los pacientes con pénfigo que en la población general, los resultados no alcanzaron significancia estadística por el tamaño de la muestra (Cuadro IV).

Discusión

Como el pénfigo (tanto vulgar como foliáceo) se ha relacionado con algunas otras enfermedades autoinmunes, se buscó este antecedente en los pacientes. Solamente se encontraron dos pacientes: una en la cual coexistieron el pénfigo seborreico y la artritis reumatoide y un segundo paciente en el cual se registró el antecedente de que su padre padeció de artritis reumatoide.

La asociación de una enfermedad autoinmune con dos diferentes alelos de HLA, o bien la asociación de dos enfermedades autoinmunes con un mismo alelo de HLA podría explicarse con base en la hipótesis del epítope compartido,[20] en la que una secuencia molecular corta puede ser compartida por alelos diferentes. En el caso de nuestra paciente con pénfigo seborreico y artritis reumatoide, será necesario conocer la secuencia de su alelo HLA-DR4 para puntualizar si es la misma determinada para el epítope reumatoideo.

En cuanto al análisis de los alelos HLA-DR, es claro el riesgo relativo conferido por la presencia de HLA- DR14 (DR6), para el desarrollo de pénfigo, y más aún, en los casos de pénfigo vulgar. Este hallazgo de la asociación de HLA- DR14 (DR6) en pacientes con pénfigo ya fue descrito en población judía, japonesa y española.[21-23] Existen diferencias con pacientes coreanos[24] y paquistaníes[25] en los alelos involucrados, que probablemente se deban a diferencias por la etnicidad.

El presente estudio muestra que también en pacientes mexicanos con pénfigo, el HLA-DR14 (DR6) está involucrado en la patogénesis de la enfermedad.

Llamó la atención que pese a ser un número pequeño de pacientes con pénfigo foliáceo, se

Cuadro IV. Genotipo asociados con pénfigo vulgar y foliáceo

	Pacientes n=25	Controles n=96
DR	n	n
DR4-DR6	9	2
DR6-DR8	4	6
DR4-DR8	3	3
DR1-DR4	2	0
DR2-DR4	1	6
DR6-DR7	1	3
DR1-DR1	1	0
DR7-DR4	1	8
DR4-DR11	1	4
DR7-DR4	1	8
DR1-DR8	1	2
DR8-DR11	1	1
DR4-DR4	0	8

edigraphic.com

observó que el alelo HLA-DR1 está fuertemente asociado con esa variedad clínica y representa un riesgo relativo muy elevado para la enfermedad, sugiriendo así que las bases genéticas de ambas variantes clínicas (vulgar y foliáceo) son diferentes. Este hallazgo es similar a lo encontrado en pacientes brasileños con la forma endémica del pénfigo foliáceo (*fogo selvagem*).[26]

En conclusión, en pacientes mexicanos con pénfigo existen genes ubicados dentro del MCH en el brazo corto del cromosoma 6 que influyen directamente en la susceptibilidad para desarrollar esta enfermedad. Sin embargo, dado que la edad de inicio no parece estar influida por los genes del MHC, es necesario estudiar otros factores, principalmente de tipo ambiental, para comprender la forma en que interactúan para matizar la expresión clínica de la enfermedad en pacientes genéticamente susceptibles.

Referencias

1. **Stanley JR.** Pemphigus. In: Freedberg MI, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB, editors. Fitzpatrick's Dermatology in general medicine. 5th ed. Nueva York: McGraw-Hill; 1999. p. 654-66.
2. **Naldi L, Bertoni M, Cainelli T.** Feasibility of registry of pemphigus in Italy: two years experience. Gruppo italiano Studi Epidemiologici in Dermatologia (GISED). Int J Dermatol 1993;32:424-7.
3. **Wilason CI, Wojnarowska F, Dean D, Pasricha JS.** IgG subclasses in pemphigus in Indian and UK populations. Clin Exp Dermatol 1993;18:226-30.
4. **Vega-Memije ME, Villatoro-Ugalde VG, Mosqueda-Taylor A.** Pénfigo vulgar, informe del manejo de 40 casos. Dermatol Rev Mex 1998;42:244-9.
5. **Alsaleh QA, Nanda A, Al Baghli NM, Dvorak R.** Pemphigus in Kuwait. Int J Dermatol 1999;38:351-56.
6. **Kowalczyk AP, Bomslaeger EA, Norvell SM, Palka HL, Green KJ.** Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. Int Rev Cytol 1999;185:237-302.
7. **Eyre RW, Stanley JR.** Identification of pemphigus vulgaris antigen extracted from normal human epidermis and comparison with pemphigus foliaceus antigen. J Clin Invest 1988;81:807-10.
8. **Anhalt GJ.** Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgC from patients with the disease. N Engl J Med 1982;306:1189-93.
9. **Amagai M.** Autoantibodies against the amino-terminal cadherin-like binding domain of pemphigus vulgaris antigen are pathogenic. J Clin Invest 1992;90:919-21.
10. **Rhodes DA, Trowsdale J.** Genetics and molecular genetics of the MHC. Rev Inmunogenet 1999;1:21-31.
11. **Granados J, Yamamoto-Furusho JK, Zuñiga J, Ramírez SE, Salgado N.** Las bases genéticas de las enfermedades reumáticas. Rev Mex Reumatol 1996;11:72-8.
12. **McCluskey J, Peh CA.** The human leukocyte antigens and clinical medicine; an overview. Rev Inmunogenet 1999;1:3-20.
13. **Parry SL, Hall FC, Olson J. Kamradt T, Sonderstruo G.** Autoreactivity versus autoaggression: a different perspective on human autoantigens. Curr Opin Immunol 1998;10:663-8.
14. **Lin MS, Swartz SJ, López A, Ding X, Fernández-Vina MA, Stastny P.** Fairley development and characterization desmoglein 3 specific T cell responses in pemphigus vulgaris patients and normals. J Invest Dermatol 1998;110:388-92.
15. **Hertl M, Kart RW, Amagai M, Katz SI.** Heterogeneous MHC II restriction pattern of autoreactive desmoglein 3 specific T cell responses in pemphigus vulgaris patients and normals J Invest Dermatol 110:388-92.
16. **Ruocco V, Sacerdoti G.** Pemphigus and bullous phemphigoid due to drugs. Int J Dermatol 1991;30:307-12.
17. **Tur E, Brenner S.** Diet and pemphigus. In pursuit of exogenous factors in pemphigus and *fogo selvagem*. Arch Dermatol 1998;134:1406-10.
18. **Davis RW, Thomas M, Cameron J, St John TP, Padgett RA.** Rapid DNA isolation for enzymatic and hybridization analysis. Methods Enzimol 1980;65:404-11.
19. Protocols from the 12th International Histocompatibility Workshop, Paris, France. June 1996.
20. **Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ.** The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1987;30:1205-12.
21. **Miyagawa S, Higashimine I, Lida T, Yamashina Y, Fukumoto T, Shirai T,** HLA-DRB*04 and DRB1*14 alleles are associated with susceptibility to pemphigus among Japanese. J Invest Dermatol 1997;109:615-18.
22. **Yamashina Y, Miyagawa S, Kawatsu Y, Lida T, Higashimine I, Shirai T, Kaneshige T.** Polymorphisms of HLA class II genes in Japanese patients with pemphigus vulgaris. Tissue Antigens 1998;52:74-7.
23. **González-Escribano MF, Jiménez G, Walter K, Montes M, Pérez Bernal AM, Rodríguez MR, Conejo-Mir SJ, Núñez Roldán A.** Distribution of HLA class II alleles among Spanish patients with pemphigus vulgaris. Tissue Antigens 1998,52:275-8.
24. **Lee CW, Yang HY, Kim SC, Jung JH, Hwang JJ.** HLA class II allele associations in Korean patients with pemphigus. Dermatology 1998;197:349-52.
25. **Delgado JC, Hameed A, Yunis JJ, Bhol K, Rojas Al, Rebman SB, Khan AA, Ahmad M, Alper CA, Ahmed Ar, Yunis EJ.** Pemphigus vulgaris autoantibody response is linked to HLA-DQB1*0503 in Pakistani patients. Hum Immunol 1997;57:110-9.
26. **Moraes ME, Fernández Vina M, Lazaro A, Díaz LA, Filho GH, Friedman H, Rivitti E, Aoki V. Stastny P, Moraes JR.** An epitope in the third hypervariable region of DRB1 gene is involved in the susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations. Tissue Antigens 1997;49:3.5-40.