



Tese de Doutoramento  
Facultade de Medicina e Odontoloxía  
Departamento de Medicina

# **Alelos HLA DRB1 no Lupus Eritematoso Incompleto**

Brenda Maure Noia

Decembro 2013



D. BERNARDO SOPEÑA PÉREZ-ARGÜELLES, Doutor en Medicina e Cirurxía e Profesor asociado do Departamento de Medicina da Facultade de Medicina da Universidade de Santiago de Compostela, D. ALBERTO RIVERA GALLEGO, Doutor en Medicina e Cirurxía e D. ARTURO GONZÁLEZ QUINTELA, Doutor en Medicina e Cirurxía e Catedrático do Departamento de Medicina da Facultade de Medicina da Universidade de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN:

Que o presente traballo de investigación titulado “Alelos HLA DRB1 no Lupus Eritematoso Incompleto” foi realizado baixo a nosa dirección por D<sup>a</sup>. BRENDA MAURE NOIA, e reúne as condicións de metodoloxía formal e orixinalidade para ser defendido ante un Tribunal para a obtención do grado de Doutor.

Para que así conste, a todos os efectos oportunos, expedimos e firmamos a presente certificación.

Santiago de Compostela, decembro de 2013.

Dr. B. Sopeña Pérez-Argüelles

Dr. A. Rivera Gallego

Dr. A. González Quintela





*A Camiño e Xulián*

*A Tiago e Pedro*

*A Jacobo*



## Agradecementos

Quero agradecer ós meus directores de tese a confianza que depositaron en min para a realización deste traballo e o apoio que recibín da súa parte.

Ó Dr. Bernardo Sopena, por estar sempre dispoñible, polas horas dedicadas e por contaxiarme a ilusión pola medicina e a investigación.

Ó Dr. Alberto Rivera, polo seu espírito crítico e por todo o que me aprendeu durante a miña formación.

Ó Dr. Arturo González Quintela, por saber transmitir o entusiasmo pola medicina xa dende a Facultade.

A Bea Fernández, porque sen a súa axuda este traballo no tería nin comezado.

A Lucía Constenla, por todo o que me aprendeu no laboratorio e polos bos momentos que pasamos xuntas.

Ós pacientes, por prestar a súa colaboración desinteresada.

A meus pais, por aprenderme o valor do esforzo e da constancia na investigación.

A Jacobo, por ser o meu maior apoio neste proxecto.





# ÍNDICE

TABOA DE ABREVIATURAS .....	15
GLOSARIO DE XENÉTICA .....	19
1 INTRODUCCIÓN.....	27
1.1 Epidemioloxía do LES .....	30
1.1.1 Estudos en Europa .....	32
1.1.2 Estudos en España .....	32
1.1.3 Disparidade de datos.....	34
1.2 Etioloxía do LES .....	36
1.2.1 Factores Ambientais.....	37
1.2.2 Factores Hormonais .....	41
1.2.3 Factores Xenéticos .....	43
1.3 Complexo Maior De Histocompatibilidade.....	46
1.3.1 Rexións do CMH .....	48
1.3.2 Moléculas HLA Clase I.....	49
1.3.3 Moléculas HLA Clase II .....	50
1.4 Rexión CMH no LES .....	52
1.4.1 HLA Clase II no LES.....	53
1.4.2 HLA Clase I no LES.....	56
1.4.3 HLA Clase III no LES .....	57
1.5 Lupus Eritematoso Incompleto.....	59
1.5.1 Criterios de clasificación do LES.....	62
1.5.2 Enfermidade Indiferenciada do Tecido Conectivo ou LEI .....	64
1.5.3 Estudos sobre LEI.....	65

1.5.4	Definición de LEI .....	65
1.5.5	Epidemioloxía do LEI.....	68
1.5.6	Patoxénese do LEI.....	69
1.5.7	Estudos xenéticos no LEI.....	70
1.5.8	Presentación clínica do LEI .....	72
1.5.9	Evolución do LEI.....	72
2	HIPÓTESE E OBXECTIVOS.....	75
2.1	Hipótese.....	77
2.2	Obxectivos.....	77
3	METODOLOXÍA.....	79
3.1	Selección de Pacientes.....	81
3.1.1	Fonte de suxeitos.....	81
3.1.2	Criterios de inclusión de pacientes e controis sans .....	82
3.2	Variables a Estudio.....	84
3.3	Estudio Xenético.....	87
3.3.1	Extracción de ADN.....	87
3.3.2	Realización da PCR .....	89
3.3.3	Electroforese dos produtos PCR.....	91
3.3.4	Interpretación de resultados .....	93
3.4	Recollida de Datos .....	93
3.5	Aspectos Éticos .....	93
3.6	Análise Estatística.....	94
3.7	Cronograma.....	95
4	RESULTADOS.....	97

4.1	Descrición das Series .....	99
4.1.1	Tempo de seguimento .....	99
4.1.2	Tempo de evolución dos pacientes con LEI.....	99
4.1.3	Tempo de evolución dos pacientes con LES.....	100
4.2	Características xenéticas: Alelos HLA DRB1.....	101
4.2.1	Estudio da frecuencia dos alelos HLA DRB1 en pacientes con LEI e LES.....	101
4.2.2	Comparación dos alelos HLA DRB1 co grupo de controis sans.....	103
4.3	Características Demográficas .....	108
4.3.1	Sexo .....	108
4.3.2	Idade de inicio da enfermidade.....	108
4.3.3	Idade de diagnóstico da enfermidade.....	109
4.4	Características Clínicas .....	110
4.4.1	Número de manifestacións de presentación.....	110
4.4.2	Tempo desde primeira manifestación ata o diagnóstico de LES.....	111
4.4.3	Manifestacións clínicas.....	114
4.4.4	Manifestacións de inicio.....	125
4.4.5	Estudio de regresión loxística das manifestacións clínicas.....	133
4.5	Estudio da Frecuencia de Alelos HLA DRB1 por Manifestacións Clínicas.....	135
4.6	Estudio da Frecuencia dos Alelos HLA DRB1 por Autoanticorpos .	137
5	DISCUSIÓN .....	139
5.1	Definición de LEI.....	141

5.2	Estudo da Frecuencia dos Alelos HLA DRB1 no Lupus .....	145
5.2.1	LES en relación con controis sans.....	145
5.2.2	Alelos HLA DRB1 no LEI .....	148
5.2.3	LEI en relación con controis sans .....	149
5.2.4	Diferenzas de alelos HLA DRB1 entre pacientes con LEI e pacientes con LES.....	150
5.3	Características Demográficas.....	156
5.4	Manifestacións Clínicas dos Pacientes con LEI e LES .....	157
5.4.1	Manifestacións mucocutáneas .....	158
5.4.2	Alteracións renais .....	159
5.4.3	Alteracións neurolóxicas.....	161
5.4.4	Alteracións hematolóxicas.....	162
5.4.5	Alteracións inmunolóxicas .....	162
5.4.6	Manifestacións de inicio .....	166
5.5	Asociación de Alelos HLA-DRB1 con Características Clínicas de Lupus .....	168
5.6	Asociación de Alelos HLA-DRB1 con Autoanticorpos Relacionados co Lupus .....	171
5.7	Limitacións .....	173
6	CONCLUSIÓN.....	175
	Conclusión.....	177
7	BIBLIOGRAFÍA .....	179
8	ANEXOS.....	203
8.1	Anexo 1. Cebadores Utilizados para o Tipado HLA DRB1.....	205
8.2	Anexo 2. Consentimento Informado .....	207

8.3 Anexo 3. Difusión de Resultados .....209





**TABOA DE ABREVIATURAS**

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANA	Anticorpos antinucleares, do inglés <i>Antinuclear antibodies</i>
ARN	Ácido ribonucleico
CD	Cúmulo de diferenciación, do inglés <i>Cluster of differentiation</i>
CMH	Complexo Maior de Histocompatibilidade
CMV	Citomegalovirus
csp	Cantidade suficiente para
DE	Desviación estándar
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
EBNA-1	Antíxeno nuclear do Ebstein Barr 1
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético, do inglés <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EEO	Electro endosmose
EITC	Enfermidade Indiferenciada do Tecido Conectivo

ELISA	Ensaio por inmunoabsorción ligado a enzimas, del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ENA	Antíxeno nuclear extraíble, do inglés <i>Extractable Nuclear Antigen</i>
ERK	Quinasa regulada por sinal extracelular, do inglés <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
GWAS	Estudio de asociación do xenoma completo, do inglés <i>Genome-Wide Association Study</i>
hGH	Hormona de Crecemento Humana, do inglés <i>Human Growth Hormone</i>
HLA	Antíxeno leucocitario humano, do inglés <i>Human Leucocyte Antigen</i>
IC	Intervalo de confianza
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
IQR	Rango intercuartil ( <i>Interquartil range</i> )
Kb	Quilobases (1.000 pares de bases)
kDa	Quilo Dalton



LEI	Lupus eritematoso incompleto
LES	Lupus eritematoso sistémico
LFA1	Antíxeno asociado á función do linfocito 1, do inglés <i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LIF	Lupus Inducido por Fármacos
MAP	Proteína activada por mitóxeno
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Mb	Megabases (1.000.000 pares de bases)
mM	Milimoles
NK	<i>Natural Killer</i>
NZB/NZW F1	Rato Híbrido <i>New Zealand Black/New Zealand White</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	Reacción en cadea da polimerasa, do inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGB	Fendedura de unión ó péptido, do inglés <i>peptide-binding groove</i>
RM	Resonancia Magnética

SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismo de nucleótido único, do inglés <i>single nucleotide polymorphism</i>
TBE	Solución tampón Tris-Borato-EDTA
TCR	Receptor das células T, do inglés <i>T cell receptor</i>
TNF	Factor de necrose tumoral
UV	Ultravioleta
UVB	Ultravioleta B
V	Voltio
VCN	Variación do número de copias
VEB	Virus Epstein-Barr
xCMH	Complexo Maior de Histocompatibilidade ampliado, do inglés <i>Extended MHC</i>

## GLOSARIO DE XENÉTICA

- **Agregación familiar:** Ocorrencia dun trazo en máis membros dunha familia do que pode ser facilmente explicado polo azar.
- **Alelos:** Cada unha das diferentes formas dun xene que poden darse nun único locus.
- **Cebador (*Primer*):** Oligonucleótido, sintetizado a pedido e de acordo cunha secuencia preestablecida, de 17-25 bases e que é utilizado como iniciador da copia de segmentos de ADN na reacción en cadea da polimerasa. Cebador dianteiro é o que se sitúa ó principio e cebador posterior ou traseiro o que se sitúa ó final do fragmento a copiar. A secuencia dos cebadores é complementaria á dos extremos 3' do fragmento a replicar, pero en cadeas diferentes, e esas secuencias deben coñecerse previamente. Cada cebador prové un extremo 3' cun oxhidrilo libre para a polimerasa.
- **Concordancia xenética:** Presenza do mesmo trazo fenotípico nunha parella de xemelgos monocigotos, ou nunha parella calquera de individuos dentro dun grupo no que se está a estudar o trazo.
- **Desequilibrio de ligamento:** Presenza dunha asociación entre dous ou máis alelos de loci diferentes, en proporcións distintas das causadas só polo azar.

- **Epistase:** Efecto polo cal a acción dun xene enmascara ou interfere a expresión doutro ou outros xenes herdados de forma independente.
- **Estudo de asociación de xenoma completo (*Genome-Wide Association Studies (GWAS)*):** Tipo de estudo utilizado na investigación xenética para asociar variacións xenéticas específicas con certas enfermidades. O método implica a análise dos xenomas de moitas persoas diferentes e a busca de marcadores xenéticos que se poden utilizar para predicir a presenza dunha enfermidade. Unha vez que se identifican os marcadores xenéticos, pódense utilizar para entender como os xenes contribúen á enfermidade e desenvolver mellores estratexias de prevención e tratamento.
- **Estudo ou Análise de ligamento (*Linkage analysis*):** Estudo dos polimorfismos das secuencias de ADN que están próximos ou dentro dun xene de interese (ligamento) para identificar, nunha mesma familia, a segregación dunha mutación patolóxica nun xene determinado.
- **Fenotipo:** Manifestación externa observable dun xenotipo.
- **Haplotipo:** Conxunto de variacións do ADN, ou polimorfismos, que tenden a ser herdados xuntos. O termo haplotipo pódese referir a unha combinación de alelos ou a un conxunto de polimorfismos de nucleótido sinxelo (SNPs) que se atopan no mesmo cromosoma.

- **Herdanza complexa ou multifactorial:** Tipo de herdanza non mendeliana dos trazos que son determinados por unha combinación de múltiples factores xenéticos e ambientais.
- **Ligamento (*Linkage*):** Asociación de xenes ou outras secuencias do ADN que están no mesmo cromosoma durante a transmisión hereditaria. Canto máis preto están dous xenes no cromosoma, maior é a posibilidade de que se herden xuntos.
- **Locus:** Lugar específico do cromosoma onde está localizado un xene ou outra secuencia de ADN, coma o seu enderezo xenético. O plural de locus é "loci".
- **Marcador xenético:** Segmento de ADN que ten unha localización física coñecida nun cromosoma e que serve como fito para a localización doutras secuencias ou outros xenes na confección de mapas xenéticos. Os segmentos de ADN que están próximos nun cromosoma tenden a herdarse xuntos, por iso se utilizan os marcadores xenéticos para rastrexar a herdanza dun xene próximo que aínda non foi identificado pero do que se coñece a súa localización aproximada. O marcador xenético pode ser parte dun xene ou pode non ter ningunha función coñecida.
- **Mecanismos epixenéticos:** Procesos que provocan cambios na expresión dun xene durante o desenvolvemento do organismo, sen que interveñan mutacións que alteren o xenoma. Os efectos

epixenéticos poden ser producidos por metilación, que inhibe a expresión do xene, ou pola presenza de proteínas activadoras ou represoras.

- **Microsatélite:** Secuencias repetitivas de ADN de dous a cinco pares de bases de lonxitude, espaxadas polo xenoma en rexións non codificantes entre xenes ou dentro dos xenes. A miúdo se utilizan como marcadores xenéticos para estudos de ligamento.
- **Nulo:** Aquel xene ou alelo que non é funcional por efecto dunha mutación ou por unha delección.
- **Par de bases:** Unidade formada por dous nucleótidos opostos e complementarios nas cadeas de ADN ou ARN que están conectados por pontes de hidróxeno.
- **Patrón mendeliano simple:** Patrón de transmisión hereditaria que segue as regras establecidas por G. Mendel e que se refire a trazos codificados por un único xene.
- **Penetrancia:** Proporción de individuos cun xenotipo concreto que manifestan devandito xenotipo ó nivel fenotípico.
- **Polimorfismo:** Presenza na poboación humana de variantes inocuas, e en número significativo, de secuencias de ADN nun locus determinado.

- **Polimorfismos de nucleótido único (SNPs):** Os polimorfismos de nucleótido único son un tipo de polimorfismo que se produce pola variación nun só par de bases.
- **Polixénico:** Trazo ou enfermidade orixinado pola acción de varios xenes normais ou mutados e que ten un patrón non mendeliano de herdanza.
- **Promotor:** Secuencia reguladora dun xene, colocada en sentido 5' con respecto ó xene, e sobre a cal se asocia a ARN polimerasa para iniciar a transcrición
- **Pseudoxene:** Secuencia moi similar á dun xene e orixinada por unha duplicación deste, pero que non é funcional debido a mutacións, perdas ou duplicacións na súa secuencia.
- **Quilobase:** Mil pares de bases
- **Reacción en cadea da polimerasa (PCR):** Método que permite a amplificación de tramos concretos de ADN. Replica unha ou mais moléculas de ADN que serven de molde, en millóns de copias idénticas.
- **Recombinación xenética:** Producción de novas combinacións de xenes ligados por entrecruzamento. A recombinación típica ocorre na profase meiótica (recombinación meiótica) e consiste nun proceso complexo, polo cal dúas moléculas de ADN, unha materna e outra paterna, intercambian reciprocamente segmentos.

- **Recombinante:** Individuo ou célula que teñen un xenotipo que se produciu mediante recombinación.
- **Segregación xenética:** Separación dun par de alelos presentes nun individuo, ó examinar a súa proxenie.
- **Sinatura do Interferón (*Interferon signature*):** Conxunto de xenes regulados polo Interferón.
- **Taxa de concordancia:** Proporción de parellas de xemelgos nas que ambos presentan o trazo estudado (é dicir, que son concordantes) respecto do total de parellas.
- **Tipado (xenético):** Ver **Xenotipado**.
- **Variación no número de copias (VCN) (*Copy number variations (CNV)*):** O número de copias dun xene particular pode cambiar dun individuo a outro. Observouse que algunhas enfermidades están asociadas co aumento do número de copias de xenes específicos.
- **Xene candidato:** Secuencia xenética de función previamente descoñecida que, pola súa posición no cromosoma ou algunha outra propiedade, se converte en candidato para ser responsable dunha función determinada, tal coma o desenvolvemento dunha enfermidade.
- **Xenoma:** Totalidade do ADN nuclear dunha célula e conxunto da información xenética que leva ese ADN.



- **Xenotipado:** Proba que mostra os alelos específicos herdados por un individuo.
- **Xenotipo:** Composición alélica específica dunha célula, ben referida ó total do seu xenoma, ou máis comunmente, a un xene determinado ou a un conxunto de xenes.

Fontes:

- Glosario Hablado de Términos Genéticos, National Human Genome Research Institute. En <http://www.genome.gov/GlossaryS/index.cfm> (accedido 10/12/2012)
- Nussbaum R. L., McInnes R. R., *et al.* (2008). Thompson & Thompson genética en medicina (7ª ed). Barcelona, Masson/Elsevier España.
- Anthony J. F.Griffiths (2002) Genética (7ª ed) Madrid, McGraw-Hill Interamericana.





# **1. INTRODUCCIÓN**



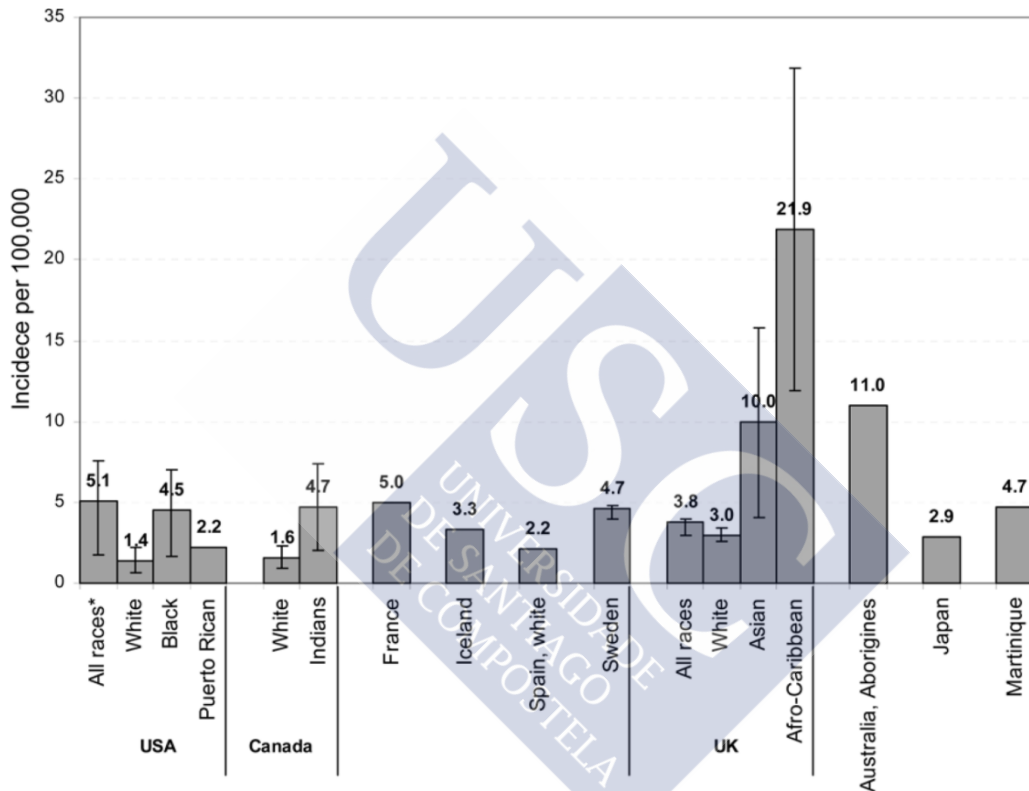
O lupus eritematoso sistémico (LES) é o prototipo de enfermidade autoinmune. Cursa de forma crónica con exacerbacións e pode afectar a case calquera órgano. A prevalencia varía moito dun país a outro, e nos países onde é máis frecuente pode superar os 70 casos por 100.000 [1]. Afecta fundamentalmente a mulleres en idade fértil, aínda que hai casos en idade pediátrica e outros que se inician na terceira idade [2].

O LES é unha enfermidade cun amplo espectro de manifestacións clínicas e que produce graos variables de morbilidade. Pode ser unha enfermidade relativamente leve, limitada a manifestacións cutáneas pero tamén pode afectar a órganos importantes como o ril, producindo insuficiencia renal crónica e chegando incluso a comprometer a vida do paciente.

Malia ser unha enfermidade moi estudada, aínda non está clara a súa patoxenia.

## 1.1 Epidemioloxía do LES

O LES é unha das enfermidades autoinmunes máis frecuentes. Asóciase a miúdo con morbilidade grave e as taxas de mortalidade entre os pacientes con LES son maiores que as da poboación xeral [3].

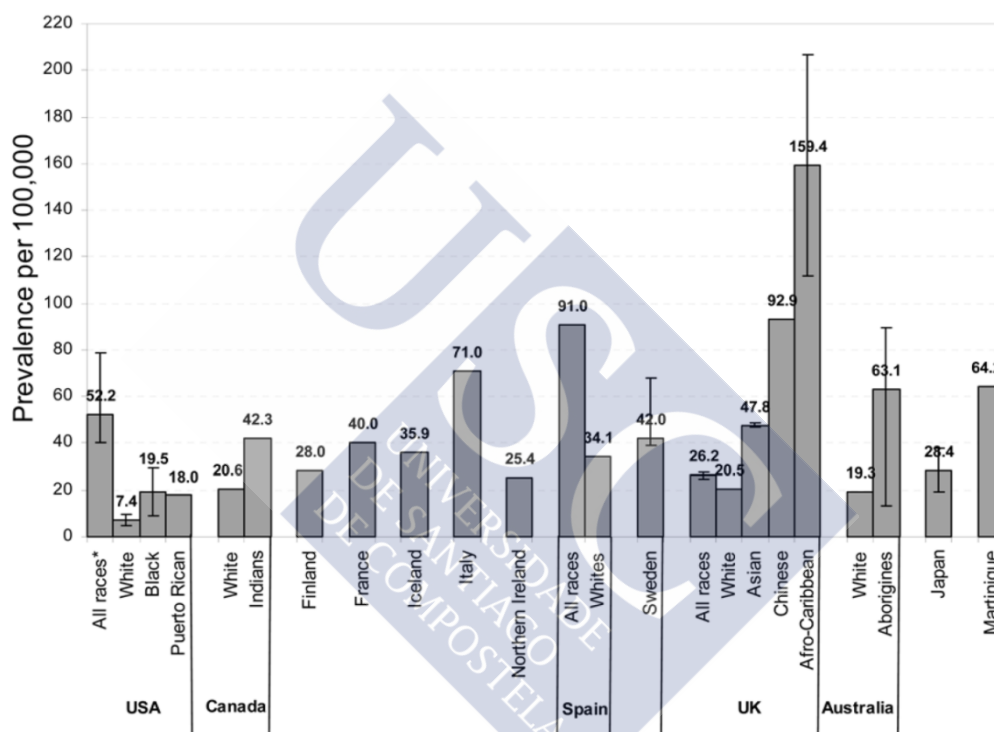


**Figura 1. Incidencia do LES no mundo.** Obsérvanse importantes diferenzas na incidencia do LES entre as distintas poboacións, con maior incidencia naquela de raza non caucásica. De Danchenko *et al.*, 2006 [1].

Ten unha distribución universal, aínda que é máis frecuente nos continentes europeo, americano e asiático. Ata hai poucos anos só había estudos dispoñibles sobre a incidencia e prevalencia do LES en poboacións europeas

e estadounidenses, pero recentemente comezaron a publicarse estudos epidemiolóxicos realizados en Asia e Oceanía (Figuras 1 e 2).

Os primeiros estudos epidemiolóxicos de LES feitos en EEUU son da década de 1950. En 1951 Siegel *et al.* comezaron un estudo en New York co que



**Figura 2. Prevalencia do LES no mundo.** Do mesmo xeito que a incidencia, a prevalencia do LES é maior nas poboacións non caucásicas. En Europa obsérvase maior prevalencia nos países do sur que nos máis setentrionais. De Danchenko *et al.*, 2006 [1].

calcularon unha incidencia de 0,7 casos/100.000 habitantes e ano en poboación branca (1,2 en mulleres) e de 2,4 en poboación negra (3,9 en mulleres) [4]. Ó mesmo tempo en Rochester, Minnesota, Michet *et al.* iniciaban outro estudo que se prolongou máis no tempo e que permitiu

calcular unha incidencia xeral de 1,8 casos /100.000 habitantes e ano, combinando tódalas razas, e unha incidencia en mulleres de 2,5 casos /100.000 habitantes e ano [5]. Neste caso calcularon tamén a prevalencia, que foi de 40,0/100.000 habitantes, e de 53,8 en mulleres. Os estudos máis recentes, como o de Naleway *et al.* en Wisconsin, calcularon unha incidencia xeral de 5,1 casos/100.000 habitantes e ano (8,2 en mulleres) e unha prevalencia xeral de 78,5 casos/100.000 habitantes (131,5 en mulleres e 24,8 en homes) [6].

### **1.1.1 Estudos en Europa**

En Europa non se iniciaron os primeiros estudos epidemiolóxicos do LES ata finais dos anos 70. Dende entón fixéronse estudos en Suecia, Finlandia, Francia, Italia, Alemaña e Reino Unido ademais de en España [1, 7]. As incidencias calculadas variaron dende 2,2/100.000 habitantes e ano en España en 2003 [8] a 5,0/100.000 habitantes e ano en Francia en 2004. En mulleres, as incidencias foron dende 3,6 a 7,6/100.000 habitantes e ano.

### **1.1.2 Estudos en España**

En España fixéronse dous estudos que avaliaron a incidencia e a prevalencia do LES. O primeiro fíxose en 2003 en Asturias, e o máis recente estudou a poboación de Lugo.



O estudio de López *et al.* [8], realizado entre xaneiro de 1992 e decembro de 2002, incluía toda a poboación de Asturias, que era de algo máis dun millón de habitantes. No tempo que durou o estudio identificaron 367 pacientes que cumprían criterios de LES, dos que 324 eran mulleres, polo o que a ratio muller:home foi de 7,5:1. Entre 1998 e 2002 calcularon unha incidencia xeral de 2,15 casos por 100.000 habitantes e ano, que entre as mulleres era de 3,64 casos por 100.000 mulleres e ano. A prevalencia puntual ó final do estudio foi de 34,2 casos /100.000 habitantes, sendo de 57,91 entre as mulleres.

O segundo estudio, publicado en 2011, foi realizado entre xaneiro de 1987 e decembro de 2006 sobre unha poboación de case 250.000 habitantes, que era a poboación de referencia do hospital Xeral-Calde de Lugo [9]. Neste período identificaron 150 casos de LES, dos que 127 eran mulleres (ratio muller:home 5,5:1). A incidencia anual foi de 3,6 casos/100.000 habitantes e de 5,9/100.000 entre as mulleres. Observaron unha maior incidencia nas mulleres cando se diagnosticaba o LES antes dos 60 anos. Nos casos diagnosticados a partir desta idade as diferenzas entre homes e mulleres non eran significativas. A prevalencia a 31 de decembro de 2006 foi de 17,5/100.000 habitantes de 15 ou máis anos de idade (IC 95% 12,6-24,1), e de 29,2 (IC 95% 20,0-40,7) entre as mulleres.

Un terceiro estudio que aportou datos sobre a prevalencia do LES en España é o estudio EPISER [10]. Trátase dun estudio epidemiolóxico realizado pola Sociedade Española de Reumatoloxía en 2001 no que avaliaron, entre outras

cousas, a prevalencia de diferentes enfermidades reumatolóxicas entre as que está o LES. Obtiveron unha prevalencia de 9 casos por 100.000 habitantes maiores de 20 anos.

### 1.1.3 Disparidade de datos

Chama a atención a diferenza tanto na incidencia coma na prevalencia que hai entre as diferentes poboacións e mesmo entre os diferentes estudos realizados nun mesmo país. Isto pode ter varias explicacións.

Os países con maior incidencia de LES son Francia e EEUU, mentres que Xapón e Islandia teñen as taxas máis baixas [1]. Esta variabilidade pode deberse a diferenzas reais entre os países ou a diferenzas metodolóxicas dos estudos.

Un factor importante é a composición racial da poboación e a súa estabilidade. Hai unha maior prevalencia de LES en grupos raciais non caucásicos, polo que cabe esperar que a menor proporción de individuos caucásicos na poboación, maior frecuencia de LES. Por outra banda hai rexións con fortes fluxos migratorios, polo que os resultados dos estudos epidemiolóxicos poden verse afectados.

Outro factor que pode explicar as diferenzas de frecuencia do LES entre rexións son os factores medio ambientais, fundamentalmente a exposición á luz ultravioleta.

Ademais, o sistema sanitario do país inflúe tanto na incidencia coma na prevalencia do LES. Dependendo da accesibilidade ó sistema de saúde e da dispoñibilidade de medios persoais e técnicos (persoal médico especializado, técnicas de laboratorio sensibles) poden diagnosticarse máis ou menos casos, influíndo polo tanto na incidencia calculada. E un sistema sanitario de calidade e accesible, fai que os pacientes diagnosticados estean mellor controlados, diminuíndo así a mortalidade e aumentando a prevalencia [11].

Por último, outra explicación da variabilidade dos datos entre os estudos epidemiolóxicos do LES poden ser as diferenzas metodolóxicas. En primeiro lugar está a identificación de casos, xa que pode haber diferenzas nos criterios diagnósticos da enfermidade dependendo do momento da realización do estudo, o que pode aumentar ou diminuír a sensibilidade e a especificidade. Por outra banda están as fontes de pacientes. Non é o mesmo recoller pacientes a partir dos ingresos dun hospital, que deixaría fóra a todos aqueles pacientes que nunca precisaron ingreso, que facer un estudio poboacional. Por último o método de análise dos resultados tamén pode influír, xa que o axuste por idade, por exemplo, e os métodos de captura-recaptura de datos afectan ó resultado.

Polo tanto a variabilidade na incidencia e na prevalencia entre os distintos países pode atribuírse a unha ampla gama de diferenzas reais entre as rexións xeográficas e poboacións, así coma a artefactos, como son o acceso ó sistema sanitario e o deseño dos estudos, por exemplo.

## 1.2 Etioloxía do LES

Considérase que o LES é una enfermidade multifactorial, cunha evidente base xenética sobre a que actúan un ou máis factores ambientais. Esa base xenética é complexa, con múltiples loci de predisposición e un patrón de herdanza non mendeliano [12].

A patoxénese do LES é igual de complexa e implica múltiples anormalidades inmunolóxicas. Sábese que a función das células B e T está alterada nos pacientes con LES, facendo que se perpetúe a produción de autoanticorpos por parte das células B e xerando células T autorreactivas [13-15]. Tamén está descrita unha alteración na depuración dos inmunocomplexos, que acaban depositándose nos tecidos e así activando do complemento [16]. Por outra banda, os defectos na apoptose celular detectado nos paciente con LES provocan a exposición de antíxenos propios previamente ocultos a células do sistema inmunitario [17]. O resultado destes procesos é a indución de inflamación e o conseguinte dano dos diferentes órganos, como son articulacións, riles, pel, corazón e sistema nervioso entre outros.

## 1.2.1 Factores Ambientais

Os factores ambientais poderían estar relacionados coa posta en marcha do proceso autoinmune en pacientes xeneticamente predispostos. Estes factores inclúen fármacos, luz ultravioleta (UV), metais pesados, axentes químicos e virus.

### 1.2.1.1 Fármacos

No caso de que o axente “causante” da enfermidade fose un fármaco falaríamos do lupus inducido por fármacos (LIF). Este é o exemplo máis claro de lupus producido por un axente causal externo. Habitualmente no LIF a enfermidade (a clínica e os autoanticorpos) desaparece ó retirar o fármaco implicado. Son moitos os fármacos sospeitosos de inducir LES, pero ata o momento poucos demostraron unha relación causal consistente [18]. Os mellor estudados son a Procainamida e a Hidralazina, xa que hai máis de 50 anos que se describiu a súa asociación co LIF [19].

Dende a primeira descrición do LIF consideráronse diferentes mecanismos de actuación, pero os estudos máis recentes demostraron que os fármacos indutores de lupus actúan modificando os mecanismos epixenéticos, como a metilación do ADN, que controlan a expresión xenética nos linfocitos T [20, 21].

### **1.2.1.2 Radiación ultravioleta (UV)**

A exposición solar é un factor de risco clásico e amplamente recoñecido para o LES. Pode provocar o inicio da enfermidade ou desencadear brotes. A pesares de que hai anos que se coñece a relación entre a exposición solar e o LES, aínda non está claro cal é o mecanismo preciso polo que pode desencadear o proceso autoinmune. Sábese que a radiación UVB induce a apoptose dos queratinocitos, e iso podería iniciar o proceso autoinmune ó desenmascarar autoantíxenos [22]. Tamén hai evidencia de que a luz UV pode actuar alterando a metilación do ADN a través da diminución na sinalización da vía ERK [23].

### **1.2.1.3 Axentes químicos e metais pesados**

Hai descritos casos de lupus asociado á exposición a diversas sustancias, pero as que contan con maior apoio dos estudos epidemiolóxicos son o mercurio e o sílice (dióxido de silicio) [24]. Pénsase que o sílice podería desencadear a autoinmunidade por distintos mecanismos. En primeiro lugar inducendo a apoptose, coa consecuente exposición de autoantíxenos e produción de autoanticorpos. Por outra banda, observouse que tamén aumenta a produción de citoquinas proinflamatorias, como o TNF $\gamma$  e a IL1, e máis recentemente a IL17 [25, 26].

Pola súa parte, o mercurio demostrou en modelos animais que é capaz de inducir a produción de autoanticorpos e glomerulonefrite por

inmunocomplexos, así coma unha activación policlonal transitoria das células B [27, 28].

#### 1.2.1.4 Infeccións

Entre os numerosos axentes infecciosos que se pensa que poden contribuír ó desenvolvemento do lupus, o máis estudado é o virus Epstein-Barr (VEB).

Nos pacientes con LES demostrouse unha maior prevalencia de seropositividade para o VEB que entre controis sans apareados por idade e sexo [29], así coma unha maior frecuencia de ADN do VEB no sangue periférico [30].

Hai varios mecanismos polos que este virus podería inducir a autoinmunidade, como o mimetismo molecular e a alteración da resposta inmunolóxica entre outros [31].

A infección polo VEB dá lugar á produción do antíxeno nuclear do VEB-1 (EBNA-1). Nos pacientes con LES, os anticorpos que se producen fronte este antíxeno teñen reactividade cruzada con autoantíxenos relacionados co lupus, como son Ro, Sm B/B' e Sm D1. E posteriormente, por un proceso de diseminación de epítomos, estes anticorpos reaccionan fronte a outros autoantíxenos diferentes, dando lugar a unha resposta autoinmune máis complexa [32].

Durante a infección aguda por este virus sintetízanse proteínas virais semellantes a moléculas do hóspede, como a IL10 e bcl-2, que poden alterar a resposta inmune [33, 34].

Tamén se demostrou que as células T CD8+ específicas para o VEB dos pacientes con LES teñen menor capacidade para segregar citoquinas e quimioquinas. Isto fai que teñan tamén menor capacidade para controlar a viremia do VEB, xa que non conseguen aumentar o número de receptores de morte programada 1 (PD-1), necesarios para eliminar as células infectadas polo VEB [35].

Ademais de VEB, tamén se documentou o inicio do LES coincidindo coa infección aguda por outros virus [36], pero os datos dispoñibles na actualidade non son suficientes para pensar na súa participación na patoxenia da enfermidade.



### 1.2.2 Factores Hormonais

O feito de que o LES predomine nas mulleres durante a idade fértil, e que a prevalencia en homes e mulleres se iguale antes da puberdade e despois da menopausa, fai pensar que os estróxeos e os andróxeos poden estar implicados na súa etioloxía. Nos estudos realizados en modelos murinos hai máis de 30 anos xa se demostrou a participación das hormonas sexuais e os seus receptores no inicio e desenvolvemento do LES [37, 38]. Nestes ratos NZB/NZW F<sub>1</sub>, observaron que o nivel de estróxeos estaba relacionado coa nefrite lúpica, e que os andróxeos retrasaban o inicio da enfermidade e disminuían a morbilidade e mortalidade do LES [39, 40].

En humanos, está demostrado que os pacientes con LES teñen maior nivel de estróxeos e menor de andróxeos cós controis [41].

Con todo, non se atopou relación entre o número de embarazos e o desenvolvemento de LES, nin entre o uso de anticonceptivos orais e a enfermidade [42, 43].

Hai diversos mecanismos polos que os estróxeos poden influír na patoxénese do LES. Os estróxeos actúan pola vía dos receptores ER  $\alpha$  e  $\beta$ , que se expresan nas células T e B [44]. O estróxeo ademais pode unirse directamente ó ADN e alterar a transcrición dalgúns xenes. Tamén pode modular a transcrición de forma indirecta ó asociarse con outros activadores ou represores, ou a través da estimulación da MAP quinasa. Dentro dos xenes

modulados polos estróxenos hai xenes que codifican citoquinas e moléculas relacionadas coa apoptose [44, 45].

Por outra banda, os estróxenos poden tamén controlar a prolactina, e a prolactina estimula a actividade da enfermidade, a proliferación das células T e a maduración das células B [46].



### 1.2.3 Factores Xenéticos

A observación da existencia de agregación familiar no LES foi clave para pensar nunha causa xenética subxacente [47]. A taxa de concordancia no LES é 10 veces maior para xemelgos homocigóticos que para os dicigóticos (24-56% fronte a 2-5% respectivamente) e o risco de padecer a enfermidade entre os irmáns dun paciente con LES é entre 8 e 29 veces maior que na poboación xeral [47, 48].

Exceptuando casos illados de LES con déficit de complemento, o patrón de herdanza non é un patrón Mendeliano simple, como serían o autosómico dominante, autosómico recesivo ou ligado a X recesivo. De calquera xeito, nalgúns estudos de familias con varios individuos afectados, podería cadrar ben un patrón Mendeliano autosómico dominante con penetrancia variable ou un patrón polixénico aditivo [47, 49].

#### 1.2.3.1 Métodos xenómicos

Nas enfermidades polixénicas coma o LES hai dous métodos para identificar os factores de susceptibilidade xenética: os estudos de asociación e os estudos de ligamento [50-52].

Os estudos de asociación de casos e controis son os chamados estudos de xenes candidatos. Estes estudos valoran se un marcador xenético en concreto está presente cunha maior frecuencia en pacientes con LES que en controis sans apareados por etnia. Os xenes candidatos, que poden ser alelos,

haplotipos ou calquera polimorfismo do ADN, escóllense baseándose na súa relevancia funcional na patoxénese da enfermidade. Se se demostra asociación entre o xene e a enfermidade, quere dicir que ou ben ese mesmo xene está relacionado coa enfermidade ou ben que o xene relacionado está moi preto do estudado.

Os estudos de ligamento (*linkage analysis*, en inglés) realízanse en familias con varios membros afectados e avalían a herdanza conxunta de marcadores xenéticos, como son os microsátélites de ADN, co fenotipo da enfermidade. Se o marcador e a enfermidade se herdan de forma conxunta, significa que o marcador está preto do xene responsable e que pode estar ligado a el. Polo tanto, este tipo de estudos aporta evidencia da participación xenética na enfermidade pero, comparado cos estudos de xenes candidatos, é menos útil á hora de discriminar cal é o xene relacionado.

Fixéronse estudos de ligamento de xenoma completo (*genome-wide linkage analysis*, en inglés), nos que se buscan marcadores microsátélites a intervalos xenómicos de 10-15 kb para identificar rexións cromosómicas de risco compartidas entre varios membros afectados dunha familia. No LES fixéronse 12 estudos de familias que identificaron varios loci de suposta susceptibilidade e tamén contribuíron ó descubrimento de novos xenes de risco.

Máis recentemente realizáronse estudos de asociación do xenoma completo baseados en familias (GWAS, do ingles *Genome Wide Association Study*). Os avances técnicos permitiron o xenotipado de máis de medio millón de SNPs en cada individuo, facilitando así a realización dun mapa xenómico dos loci nas enfermidades complexas [50, 53, 54].

Os xenes do CMH foron os primeiros que se consideraron como factor de susceptibilidade xenética ó LES. Por ese motivo son os máis estudados, xunto cos xenes dos compoñentes do complemento, receptores Fc e citoquinas [55]. Hoxe en día coñécense máis de 30 asociacións xenéticas co LES, que inclúen xenes HLA e, en maior medida, xenes de fóra do CMH [50].

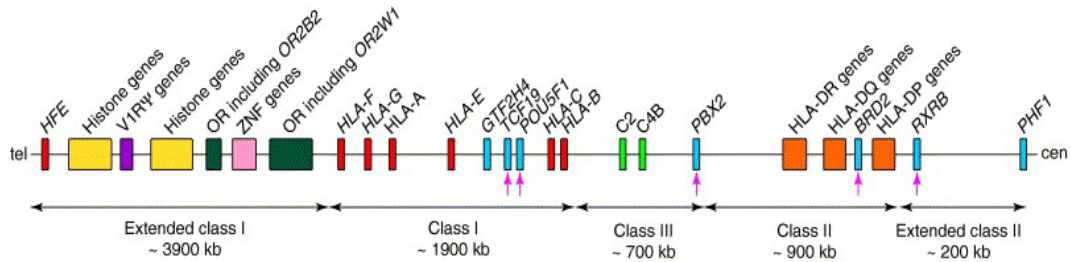
O risco individual de provocar LES de cada variante xenética asociada non é demasiado alto, cunha *odds ratio* (OR) entre 1.1 e 2.3, pero a susceptibilidade xenética ó LES depende de múltiples xenes, e calcúlase que poderían ser ata 100 xenes diferentes [50, 52]. De calquera xeito a herdanza do lupus tampouco se pode explicar unicamente polos loci de susceptibilidade que hai descritos xa que, entre outras cousas as taxas de concordancia entre xemelgos monocigóticos non son do 100%. Polo tanto debe haber outros mecanismos (ambientais, epixenéticos) que actúen sobre esa carga xenética. Por exemplo, hai evidencia de que no LES existen interacción entre xenes (epistasis), é dicir, que a presenza dun alelo de risco pode influír na presenza ou ausencia doutros alelos de risco en diferentes loci [56].

### 1.3 Complexo Maior De Histocompatibilidade

O complexo maior de histocompatibilidade está situado no brazo curto do cromosoma 6 (6p21.3) e é unha das rexións máis estudadas no xenoma humano [57]. As variantes neste locus asócianse con enfermidades autoinmunes, con enfermidades infecciosas e inflamatorias, así coma coa compatibilidade dos transplantes. O CMH contén máis de 200 xenes, entre os que están os xenes do antígeno leucocitario humano (HLA) e outros moitos xenes que son fundamentais na regulación do sistema inmunolóxico. Concretamente, as moléculas do HLA de clase I e de clase II son fundamentais na mediación das respostas de defensa, xa que participan na presentación de antígenos e na tolerancia inmunolóxica, a través do recoñecemento de antígenos propios [58].

O CMH clásico abrangue aproximadamente 3,6 mega pares de bases (Mb) e divídese en tres rexións: a clase I (telomérica), a clase III e a clase II (centromérica). Dos 239 xenes que hai nesta rexión, o 54% (130 xenes) son expresados e destes, o 40% teñen funcións inmunorreguladoras [57]. Debido ó desequilibrio de ligamento e ós xenes relacionados co CMH que existen fóra do locus classicamente definido, hai uns anos que se introduciu o concepto do CMH ampliado (xCMH). Este xCMH mide aproximadamente 7,6 Mb e divídese en cinco rexións, as tres clases clásicas maila clase I ampliada e a clase II

ampliada (Figura 3). Unha característica particular do xCMH é a agrupación de xenes inmunes e non inmunes [59].



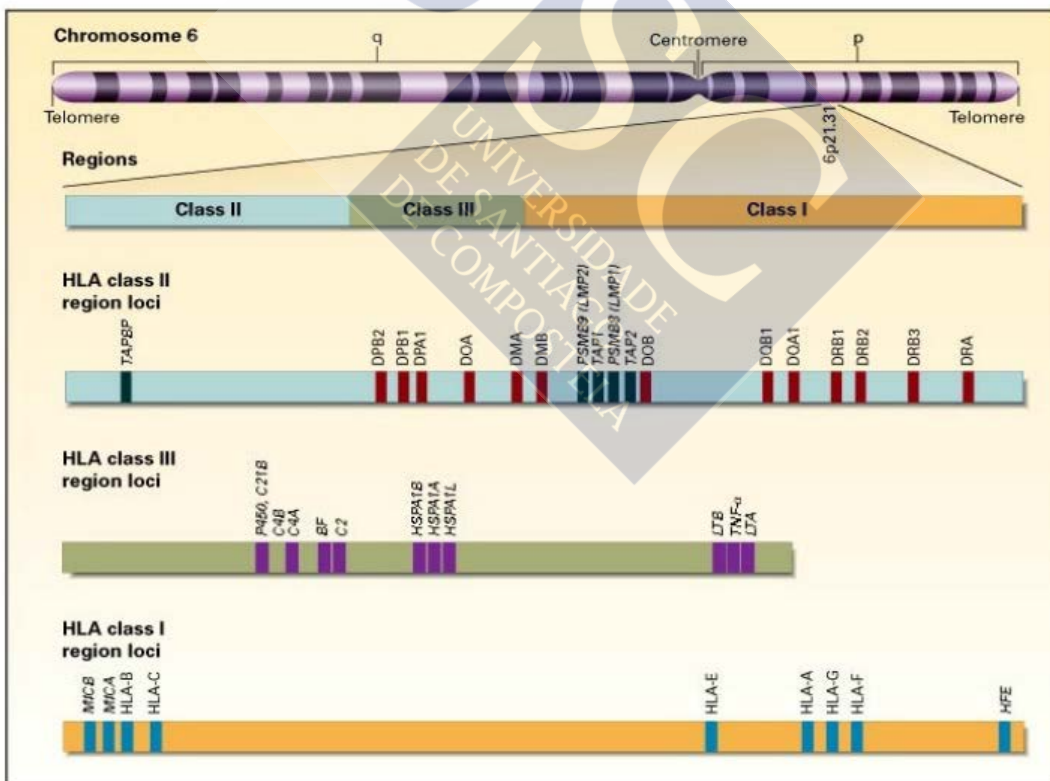
**Figura 3. Complexo Maior de Histocompatibilidade Ampliado.** Inclúe a clase I ampliada e a clase II ampliada, ademais das tres rexións clásicas do Complexo Maior de Histocompatibilidade: clase I, II e III. De Ziegler *et al.*, 2005 [60].

Hai máis de 40 anos que se demostrou a asociación non aleatoria (ou desequilibrio de ligamento) na herdanza de alelos en múltiples loci dentro do CMH. Trala determinación do tamaño físico da rexión, verificouse que o desequilibrio de ligamento se estendía nalgúns casos máis alá de 2 Mb. Isto é diferente dos patróns de desequilibrio de ligamento descritos noutras rexións do xenoma, nas que o desequilibrio de ligamento afecta a segmentos de aproximadamente 22 kb [61]. Este desequilibrio de ligamento ampliado pode constituír un obstáculo importante na investigación do CMH, xa que se se identifica unha asociación da enfermidade cunha variante na rexión, pode non ser posible determinar se a variante é causal ou se a súa asociación simplemente reflicte o desequilibrio de ligamento coa verdadeira variante causal.

### 1.3.1 Rexións do CMH

As rexións clase I e clase II do CMH codifican os xenes HLA (HLA-A, B, C, -DR, -DQ e -DP) que clasicamente están implicados na presentación de antíxenos a células T. A rexión clase I contén ademais outros xenes que non teñen unha función inmunolóxica evidente.

A rexión clase III é a rexión do xenoma con maior densidade de xenes e codifica diferentes tipos de moléculas, incluíndo os compoñentes do complemento C2, Factor B e C4, así coma o TNF entre outros [62] (Figura 4).



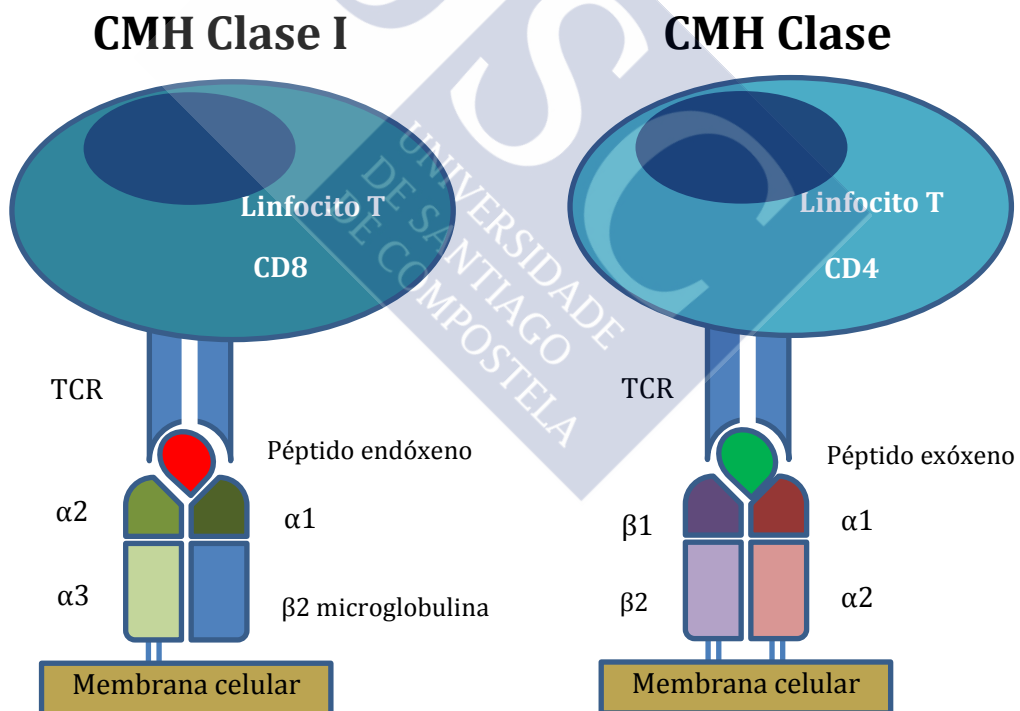
**Figura 4. Rexión HLA no cromosoma 6.** O complexo maior de histocompatibilidade humano sitúase no brazo curto do cromosoma 6 e divídese en tres rexións: clase II, clase III e clase I. De Klein, 2000 [58].



### 1.3.2 Moléculas HLA Clase I

As moléculas clásicas clase I (HLA-A, B, e C) son responsables da presentación de antíxenos endóxenos ás células T CD8+. Tamén participan xunto cos xenes non clásicos clase I, HLA-E e G, na inmunidade innata como mediadores das respostas das células NK. Practicamente tódalas células nucleadas expresan as moléculas da clase I clásica [58].

As proteínas de clase I son altamente polimórficas, de feito HLA-B é o xene máis polimórfico coñecido no xenoma humano con máis de 1100 alelos



**Figura 5. Moléculas HLA clase I e clase II.** As moléculas HLA están compostas por 4 rexións. No caso das moléculas HLA clase I, son tres rexións alfa que se unen á beta2 microglobulina; entre a rexión alfa1 e a alfa 2 alóxase o péptido, que será presentado ós linfocitos CD8. As moléculas HLA clase II están constituídas por dúas rexións alfa e dúas rexións beta; a fendedura de unión ó péptido está formada neste caso polas rexións beta 1 e alfa 1, que presentan o péptido ós linfocitos CD4.

caracterizados ata o momento.

Tanto as proteínas clase I clásicas (HLA-A, B, C) coma as non clásicas (HLA-E, F, G e HFE) son heterodímeros que comprenden unha cadea pesada e unha lixeira. A cadea pesada é unha glicoproteína transmembrana polimórfica, de aproximadamente 45 kDa, codificada dentro da rexión MHC de clase I. Esta cadea está composta por tres dominios extracelulares ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ ), un dominio transmembrana e outro citoplasmático. A cadea lixeira é a  $\beta 2$ -microglobulina, unha proteína invariable hidrosoluble de 12 kDa, común a todas as isoformas e codificada no cromosoma 15. As dúas cadeas mantéñense xuntas por unións non covalentes [58]. E entre os dominios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  fórmase a fendedura de unión ó péptido ou PBG (do inglés, *peptide binding groove*) (Figura 5).

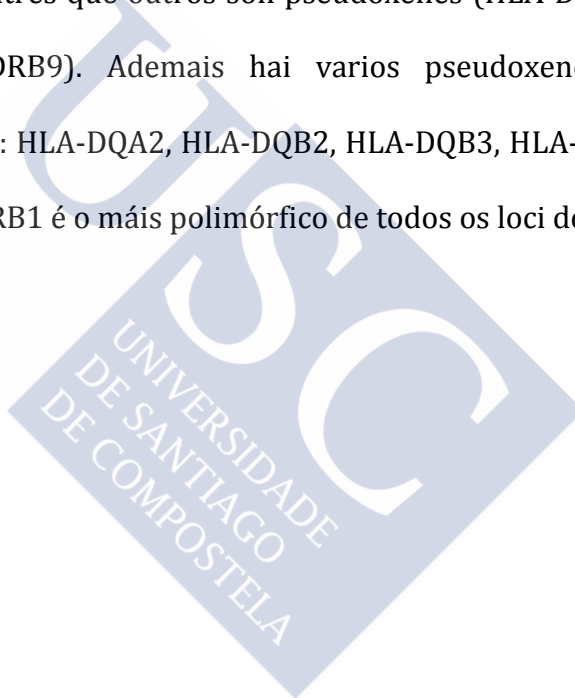
### 1.3.3 Moléculas HLA Clase II

As moléculas clase II presentan péptidos esóxenos ás células T CD4+. A diferenza das moléculas de clase I, as moléculas de clase II só se expresan nalgunha células do sistema inmunolóxico. Estas inclúen as células B, células T activadas, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais do timo, aínda que en presenza do IFN  $\gamma$  tamén poden expresalas outros tipos celulares [58].

As proteínas do CMH clase II están formadas por dúas cadeas polimórficas, a cadea  $\alpha$  (33-35 kDa) e a cadea  $\beta$  (26-28 kDa). Ámbalas dúas cadeas posúen

dous dominios extracelulares ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  e  $\beta 2$ ), un dominio transmembrana e outro citoplasmático (Figura 5). Entre os dominios  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  fórmase a fendedura de unión ó péptido. Igual que na clase I, os xenes de clase II poden dividirse en clásicos (HLA-DR, -DQ e -DP), e non clásicos (HLA-DM e -DO).

Esta é unha rexión complexa, xa que os xenes HLA-DRB mostran variacións do número de copias, e algúns son xenes funcionais (HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4, e -DRB5), mentres que outros son pseudoxenes (HLA-DRB2, -DRB6, -DRB7, -DRB8, e -DRB9). Ademais hai varios pseudoxenes adicionais codificados na rexión: HLA-DQA2, HLA-DQB2, HLA-DQB3, HLA-DPA2, e HLA-DPB2. O xene HLA-DRB1 é o máis polimórfico de todos os loci de clase II.



## 1.4 Rexión CMH no LES

A primeira vez que se demostrou a asociación entre o CMH humano e o LES foi en 1971 [63]. Utilizando métodos serolóxicos, viuse que, comparados con controis sans, os pacientes con lupus tiñan unha maior frecuencia dos alelos clase I HL-A8 (agora coñecido como HLA-B8) e W15 (agora coñecido como HLA-B15). Pronto comezaron a publicarse máis estudos sobre a asociación do LES cos antíxenos de histocompatibilidade, coñecidos daquela como HL-A, e pouco despois observouse a asociación do LES coas deficiencias dos compoñentes do complemento [64].

Despois destas observacións iniciais, fixéronse numerosos estudos de casos e controis que demostraron a asociación de variantes do CMH co LES e que aportaron evidencia da participación do CMH na susceptibilidade ó LES.

Con todo, só se estudaron algúns dos moitos xenes do locus, fundamentalmente os xenes HLA de clase I e clase II clásicos, polo seu papel na presentación de antíxenos ás células T, e os alelos do compoñente C4 do complemento, xa que a súa deficiencia produce un síndrome semellante ó lupus.

### 1.4.1 HLA Clase II no LES

As asociacións máis consistentes do HLA co LES residen nos alelos clase II. O HLA DRB1 foi estudado como xene candidato en numerosos estudos de asociación, e mediante estudos de ligamento demostrouse a contribución da rexión HLA ó LES [65]. As asociacións atopadas cos alelos DRB1 varían segundo a poboación estudada.

En poboacións caucásicas de orixe europea, as asociacións máis consistentes atopáronse co HLA-DR3 (DRB1 \* 0301) e, en menor medida, co alelo HLA-DR2 (DRB1 \* 1501) e cos seus respectivos haplotipos. As asociacións máis fortes observáronse cos haplotipos HLA-DR3, HLA-B8-DRB1\*0301 e HLA-B18-DRB1\*0301 (odds ratio (OR) 1.5-2.5), mentres que o haplotipo HLA-DR2-DRB1\*1501 presentou un OR de aproximadamente 1,7 [61]. En particular, os alelos que contén o haplotipo "autoinmune" 8,1 (HLA-A1 B8 Cw\*07 308A TNFA C4AQ0 C4B1 C2\*C B\*fS DRB1\*0301 DQA1\*0501 DQB1\*0201) mostran unha forte asociación coa enfermidade.

Nas poboacións non caucásicas os estudos mostran resultados menos homoxéneos. Por exemplo, dentro do estudo LUMINA investigouse o locus HLA-DR [66]. Este estudo incluía pacientes con LES caucásicos, hispanos de Texas, hispanos de Puerto Rico e afroamericanos. Ó comparalos con controis sans, atoparon unha maior frecuencia do alelo DRB1\*0301 nos pacientes

caucásicos e hispanos de Texas, do DRB1\*0801 en hispanos de Texas e do DRB1\*1503 (DR2) nos pacientes afroamericanos.

Outros estudos amosaron tamén asociación entre o LES e o alelo DRB1\*15 en pacientes do leste asiático, México, Túnez, e Tailandia, DRB1\*16 en mexicanos mestizos, tailandeses e búlgaros, e co DR4 en pacientes da India, mexicanos mestizos e hispanos.

Hai outros dous alelos clase II asociados ó LES, o HLA-DQA1\*0401 e o HLA-DQB1\*0402. Ambos alelos están incluídos nun haplotipo HLA-DR8 que é pouco frecuente en poboacións caucásicas [61].

Os alelos HLA clase II participan na presentación de antíxenos ás células T e na posterior estimulación das células B para producir autoanticorpos. Por este motivo estudouse a asociación destes alelos cos autoanticorpos presentes no LES, e atopouse con algúns alelos HLA-DR e -DQ. As asociacións máis fortes demostráronse entre os anticorpos anti-Ro e anti-La e os alelos HLA-DR3 e HLA-DQ2 (DQB1\*0201), que están en forte desequilibrio de ligamento. Ademais viuse que o haplotipo DR2 (DRB1\*1501/DQB1\*0602) aumenta a posibilidade de presentar anticorpos anti-Sm e que os anticorpos anti-ADN se asocian co DRB1\*15, DR3 e cos alelos HLA-DQ ligados a eles [67-69].

Os estudos realizados en pacientes con LES e síndrome antifosfolípido ou anticorpos antifosfolípido demostraron asociación cos alelos de clase II

DRB1\*04, DRB1\*07, DRB1\*13, DQA1\*0201, DQA1\*0301 e DQB1\*0302 [70, 71]. Ademais de asociarse á presenza de anticorpos antifosfolípido, tanto o DRB1\*04 coma o DRB1\*13 amosaron asociación coa ocorrencia de eventos vasculares en pacientes con LES [72].

Pero o forte desequilibrio de ligamento que existe dentro do CMH fai moi difícil identificar que xene ou xenes son os máis relevantes no LES. Para intentar restrinxir un pouco máis as rexións asociadas ó LES, Graham *et al.* estudaron o CMH nun conxunto de 334 familias con LES de predominio caucásico [73]. Utilizaron microsatélites como marcadores para haplotipos HLA-DRB1-DQB1 e identificaron tres haplotipos de risco: DRB1\*1501/DQB1\*0602, DRB1\*0301/DQB1\*0201 e DRB1\*0801/DQB1\*0402. A análise dos recombinantes ancestrais nos haplotipos de DRB1\*1501 e DRB1\*0801 conseguiron delimitar a rexión asociada á enfermidade a unha área de aproximadamente 500 kb que abrangue dende o xene *C6orf10* ata HLA-DQA1 e que contén as subrexións DRB1 e DQB1. No haplotipo DRB1\*0301 o desequilibrio de ligamento é moito máis amplo que nos haplotipos DRB1\*1501 e DRB1\*0801, o que dá lugar a un menor número de recombinantes ancestrais. En consecuencia, a rexión de risco de enfermidade do haplotipo DRB1\*0301 só puido delimitarse a unha área de preto de 1 Mb do xenoma, que contén gran parte das rexións clase II e clase III.

Pero nun traballo posterior, Fernando *et al.* conseguiron localizar mellor a asociación cos haplotipos DRB1\*0301, restrinxíndoa a una rexión de 180 kb, que só contén tres xenes expresados, DRB1, DQA1 e DQB1 [74].

Recentemente conseguiron delimitar un pouco máis a rexión asociada á enfermidade no alelo DRB1\*15, a un tamaño de entre 375 kb en poboacións do norte de Europa e 87 kb na poboación filipina. Isto foi posible grazas a técnicas de cartografía xenética transancestral da rexión do CMH utilizando SNPs [75].

#### **1.4.2 HLA Clase I no LES**

As especificidades do CMH clase I, A1 e B8 tamén se asociaron co LES. Con todo, estes alelos están incluídos no haplotipo “autoimmune” B8-DR3, e este efecto probablemente sexa o resultado do desequilibrio de ligamento [63, 76].

Os estudos máis recentes demostraron que hai outros xenes clase I que se asocian ó LES, como son o *MICB*, cun efecto que é independente do alelo HLA-DRB1\*0301, e o *OR2H2*, localizado na rexión clase I ampliada e con asociación independente dos haplotipos DRB1 [77].



### 1.4.3 HLA Clase III no LES

Na rexión clase III do CMH están localizados os xenes dos compoñentes do complemento C2, C4A, C4B e o Factor B. Hai diferentes alelos destes tres compoñentes que están ligados a haplotipos HLA particulares e que se herdan como haplotipos ampliados do HLA ou complotipos. As deficiencias completas de C2 ou C4 son raras e están asociadas a un alto risco de desenvolver LES. Máis do 75% dos pacientes con deficiencia de C4 e sobre o 20% dos que teñen deficiencia de C2, desenvolverán un cadro lúpico [50].

A deficiencia parcial de C4 tamén demostrou asociación co LES. Esta deficiencia parcial pode deberse a variacións no número de copias do xene *C4* ou a mutacións que dean lugar a alelos *C4* non expresados (*C4AQ0* e *C4BQ0*).

Os xenes *C4A* e *C4B* codifican as proteínas do complemento C4A e C4B respectivamente, e teñen diferentes características funcionais. A proteína C4A do complemento ten unha maior afinidade polos inmunocomplexos e unha maior evidencia de asociación xenética co LES cá proteína C4B. O alelo *C4A null* (*C4AQ0*) asociouse coa susceptibilidade ó LES en varios grupos étnicos [78].

A variación no número de copias de *C4* determina os niveis basais da proteína do complemento C4 circulante, e esta proteína actúa na depuración de inmunocomplexos, que doutra forma poderían promover a autoinmunidade. Nun estudio realizado nunha poboación americana de orixe

europaea, observouse que os individuos sans presentaban unha variación no número de copias de *C4* total que ía dende 2 a 6 copias do xene, e que a diminución no número de copias de *C4A*, pero non de *C4B*, predispoñía a desenvolver LES, mentres que ter tres ou máis copias de *C4A* protexía fronte ó LES [79].

Con todo, aínda non se puido atribuír de forma definitiva un papel causal á deficiencia parcial de *C4* no LES, e isto é consecuencia do amplo desequilibrio de ligamento existente en todo o CMH. A maior frecuencia de LES nos pacientes co alelo *C4A null* pode deberse a outros xenes incluídos no haplotipo ampliado A\*01-B\*08-(*C4A*\*Q0)-*C4B1*-*DRB1*\*03:01 (B8), que é o haplotipo HLA-*DRB1*\*0301 máis frecuente en poboacións europeas e que ademais se asocia ó LES. De feito, hai pouco que se demostrou que a deficiencia xenética parcial de *C4* non era un factor de risco independente para o LES nalgúns poboacións europeas [78].

Dentro da clase III tamén se atopou asociación entre un SNP na rexión promotora do TNF e a susceptibilidade ó LES, pero en posteriores estudos de asociación realizados en familias, esta variación foi excluída como factor de risco independente [50, 74]. Os que si demostraron asociación co LES de forma independente dos loci clase II son o *SKIV2L* [74], o *MSH5* [75], e o *CREBL1* [77].

## 1.5 Lupus Eritematoso Incompleto

Existe un grupo de pacientes que presentan manifestacións clínicas e autoanticuerpos suxestivos de LES pero que non cumpren criterios de clasificación. Estes pacientes poden ser casos de LES que aínda non desenvolveron a enfermidade completa pero que a desenvolverán máis adiante, ou casos de lupus eritematoso incompleto (LEI), que se manterán estables ó longo do tempo.

O LES é unha enfermidade que se desenvolve de forma gradual e son unha minoría os pacientes nos que se presenta de forma aguda con catro ou máis criterios do ACR. Na cohorte do estudo LUMINA só un 15% dos pacientes debutaron coa enfermidade definida [80]. O período de tempo medio dende o inicio dos síntomas ata o diagnóstico do LES foi de máis de 3 anos para os pacientes que debutaron cun só criterio, mentres que foi de 2,5 anos para os que o fixeron con 2 e de 1 ano naqueles pacientes nos que a enfermidade se iniciaba con 3 criterios.

Tamén no traballo poboacional realizado en Dinamarca por Voss *et al.* [81] observaron que no 61% dos pacientes con LES a enfermidade comezaba cun só criterio, e que só no 7% se presentaba con 5 ou máis. Dende a aparición da primeira manifestación tardaban unha media de 4,8 anos en reunir os criterios diagnósticos.

Outro exemplo do desenvolvemento gradual do LES é un estudo publicado en 2003 e realizado coas mostras de soro almacenadas das Forzas Armadas dos EEUU, recolleitas e conxeladas no momento de incorporación dos militares ó exército [82]. Neste traballo só analizáronse as mostras de soro daqueles que posteriormente desenvolveron LES, e observaron que no 88% dos casos había autoanticorpos relacionados co LES ata 9,4 anos antes do diagnóstico. Ademais, un 80% presentaban un ou máis criterios xa antes do diagnóstico.

Polo tanto, a maior parte dos pacientes con LES pasan antes do diagnóstico por un período no que son indistinguibles clinicamente do LEI. E aínda que son unha minoría, existen casos de LES que tardan moitos anos en facerse definidos.

Ante un paciente cun cadro suxestivo de lupus pero que non cumpre criterios de clasificación sería importante poder determinar se se trata de LEI ou de LES, xa que esta diferenciación ten implicacións de prognóstico. Sábese que os pacientes con LEI xeralmente presentan unha enfermidade menos grave que o LES pero ó non poder diferenciarlos de forma precoz, as pacientes con LEI son seguidas durante longas tempadas, con revisións periódicas que inclúen custosas probas de autoinmidade. Ademais son pacientes xeralmente novas e laboralmente activas, ás que a incerteza de saber que poden desenvolver unha enfermidade crónica grave causa unha mingua considerable na súa calidade de vida. Ante a posibilidade de padecer LES, estas pacientes poden presentar un elevado nivel de estrés con maior

utilización dos servizos sanitarios. Se existise a posibilidade dunha diferenciación precoz dos casos con LEI dos LES de desenvolvemento lento, poderíamos por unha banda, evitar este custo económico e persoal nos pacientes con LEI, e por outra facer un seguimento máis estrito nos casos de LES.



### 1.5.1 Criterios de clasificación do LES

Os criterios de clasificación do LES foron deseñados para diminuír a heteroxeneidade nas cohortes de pacientes con LES e así facer comparables os estudos realizados sobre esta enfermidade [83]. Aínda que estes criterios non foron deseñados para o diagnóstico, son amplamente utilizados na práctica clínica, de xeito que se considera necesaria a presenza de catro destes criterios para diagnosticar a un paciente de LES.

Pero os criterios propostos en 1982 [83] son demasiado limitados e non abranguen todas as manifestacións da enfermidade. Isto fíxose necesariamente así debido á baixa sensibilidade e especificidade dalgunhas das manifestacións, e coa idea de facilitar a clasificación dos pacientes non se incluíron nos criterios as biopsias cutáneas ou renais.

Por outra banda as manifestacións mucocutáneas teñen demasiado peso nestes criterios. Os demais criterios van agrupados por órganos, pero estes non se agruparon para non diminuír a precisión. Ademais hai algunhas manifestacións do LES que son interdependentes. Exemplo disto son a presenza de anticorpos anti-ADN e ANA, entre os que hai unha forte correlación, así coma a erupción malar e a fotosensibilidade [84, 85].

Polo tanto, se se utilizan os criterios do ACR para o diagnóstico de LES, hai unha cantidade variable de pacientes que malia presentar un cadro clínico compatible coa enfermidade non terían diagnóstico definitivo de LES. De aí a

importancia do LEI, que agruparía todos estes casos como entidade clínica [85] e que doutro xeito quedarían sen diagnóstico.



### 1.5.2 Enfermidade Indiferenciada do Tecido Conectivo ou LEI

O termo enfermidade indiferenciada do tecido conectivo (EITC) foi introducido nos anos 80 do século pasado, cando aumentou a dispoñibilidade da determinación de ANA [86]. Este grupo estaba composto polos pacientes con ANA positivos e algunha manifestación compatible con enfermidade autoimune. Aínda que se propuxeron criterios de clasificación específicos, a día de hoxe a EITC segue sen considerarse unha entidade establecida [87].

Existe unha importante confusión entre os termos LEI e EITC, e isto dificulta a análise da literatura. Nas revisións publicadas sobre a EITC, mestúranse series de LEI con series de EITC [88, 89], comparando estudos con criterios de inclusión moi variados. E mentres algúns autores consideran o LEI e a EITC a mesma entidade [87], outros intentan buscar a forma de diferenciarlos [90, 91].

En xeral o termo EITC engloba a un grupo de pacientes moi heteroxéneo, entre os que hai LEI, artrite reumatoide, esclerose sistémica, síndrome de Sjögren, polimiosite/dermatomiosite ou síndrome antifosfolípido [89, 92-94]. Estas patoloxías comparten algunhas características clínicas, pero son entidades diferenciadas con diferente evolución. Os pacientes con EITC poden desenvolver enfermidade definida e entre as anteriormente mencionadas, a máis frecuente é o LES [95], o que pode ser motivo de confusión entre EITC e LEI.



Neste momento pódese considerar o LEI coma un subgrupo de pacientes dentro da EITC que presentan características que indican que poden desenvolver LES [85]. A diferenza fundamental entre a EITC e o LEI é que este último termo é máis restritivo e preciso có de EITC, polo que selecciona a un grupo de pacientes máis homoxéneo.

### 1.5.3 Estudos sobre LEI

Dende a introdución dos criterios do ACR en 1982, só se publicaron 9 series de pacientes con LEI [81, 96-103]. Unha das series [99] é a continuación da cohorte de Voss et al. [81] polo que parte dos pacientes están duplicados. Tendo isto en conta, o total de pacientes é de 338, dos que máis da metade pertencen a dous únicos estudos, mentres que os 6 traballos restantes inclúen entre 15 e 38 pacientes cada un. Nestas series estúdanse as manifestacións clínicas e analíticas que presentan os pacientes con LEI, comparándoas nalgúns casos coas que presentan pacientes con LES.

### 1.5.4 Definición de LEI

As definicións utilizadas nos estudos publicados van dende a presenza de 1 a 3 criterios de clasificación do LES ata a positividade de ANA máis a afectación dun órgano. Na maioría dos casos requírese a presenza de dous ou tres criterios de clasificación para o LES.

**Táboa 1.** Series publicadas de pacientes con LEI dende a introdución dos criterios de clasificación de LES do ACR.

	Greer [98]	Ganczarzyk [97]	Calvo Alén [103]	Voss [81]	Vilá [102]	Swaak [101]	Stahl-Hallengren [100]	Al Attia [96]	Lastrup [99]
<b>Ano de publicación</b>	1989	1989	1995	1998	2000	2001	2004	2006	2010
<b>Ámbito estudio</b>	Hospitalario	Hospitalario	Hospitalario	Poboacional	Hospitalario	Multicéntrico	Poboacional	Hospitalario	Poboacional
	EEUU	Canada	EEUU	Dinamarca	Puerto Rico	Europa	Suecia	Emiratos árabes	Dinamarca
<b>Criterios inclusión (criterios ACR)</b>	2 a 3	1-2+ criterio menor	1 a 3	1 a 3	1 a 3	ANA con afectación de 1 órgano	1 a 3	1 a 3	1 a 3
		≥ 5 anos evolución	< 5 anos de evolución						
<b>Número de pacientes incluídos</b>	38	22	22	20	87	100	28	15	26
<b>Anos seguimento (media)</b>	1,6	8	0	2,8	2,2	3	13	1,8	ND

ND: Non dispoñible

Ademais da presenza de criterios de clasificación, as definicións de LEI inclúen nalgúns casos a sospeita de LES por parte do clínico. Nalgúns series [100, 101, 103] é o propio clínico que o inclúe no estudo quen debe considerar se está ante un paciente que pode desenvolver LES, pero na de Greer *et al.* [98] a sospeita parte dun nivel menos especializado, xa que inclúen todos aqueles pacientes remitidos á consulta de reumatoloxía (por exemplo dende atención primaria) con sospeita de LES. Tamén a definición da cohorte de Voss e Lastrup [81, 99] fan o diagnóstico de LES segundo os criterios de Fries e Holmes, que inclúen “a ausencia dun diagnóstico mellor”, e posteriormente clasifícanos como LES ou LEI segundo o número de criterios de clasificación do ACR.

En cambio no traballo de Ganczarczyk *et al.* [97] ademais da presenza dun ou dous criterios de clasificación requiren que haxa algunha outra manifestación de LES, que denominan criterio menor. Pero dentro desta lista de criterios menores inclúen manifestacións tan pouco específicas como a cefalea ou o aumento de a velocidade de sedimentación globular. Inclúen tamén o síndrome de Sjögren como criterio menor, cando noutras series é criterio de exclusión [101, 102].

Outro punto importante na definición do LEI son os criterios de exclusión. As series máis amplas exclúen todos aqueles pacientes que cumpren criterios doutras enfermidades autoinmunes [101, 102], mentres que noutros

traballos exclúen unicamente os casos de lupus inducido por fármacos, síndrome *overlap* [96] e síndrome antifosfolípido [99].

O único estudo que inclúe dentro da definición de LEI un período de seguimento previo é o de Greer *et al.* [98]. Consideran necesario un seguimento previo de 5 anos nos que a enfermidade ha de permanecer estable para incluílos como LEI, e así evitar os casos de LES que se poidan desenvolver nese período.

No traballo de Swaak *et al.* [101] non existen un seguimento mínimo previo ó estudo, pero dos 122 paciente iniciais, 22 presentaban LES na primeira revisión anual e foron excluídos do seguimento. Polo tanto podemos considerar que os pacientes con LEI desta serie necesitaban manterse estables polo menos durante un ano para ser incluídos.

Chama a atención que na serie de Calvo Alén *et al.* [103], que realizan un estudo retrospectivo, inclúen unicamente aqueles pacientes con LEI que teñen menos de 5 anos de evolución, sen realizar seguimento posterior para valorar evolución.

### **1.5.5 Epidemioloxía do LEI**

Só hai un traballo publicado que aporte datos sobre a incidencia e a prevalencia [104]. Trátase de un estudo poboacional realizado en Dinamarca, na rexión de Funen, cunha poboación de case 400.000 habitantes e no que

utilizaron técnicas de captura-recaptura. A incidencia anual calculada de LEI foi de 0,36/100.000 habitantes e ano e a prevalencia puntual en 2003 de 7,53/100.000 habitantes, mentres que a incidencia de LES nesa rexión foi de 1,04/100.000 habitantes e ano e a prevalencia de 28,3/100.000 habitantes.

### 1.5.6 Patoxénese do LEI

Debido ás semellanza existentes entre o LES e o LEI, é moi probable que compartan mecanismos patoxénéticos comúns, pero no grupo do LEI hai algo que fai que a enfermidade sexa máis leve. Nas dúas entidades se producen os mesmos autoanticorpos [105], e nos pacientes con LES estes autoanticorpos poden estar presentes anos antes de que aparezan as manifestacións suficientes para poder facer o diagnóstico [82, 106]. Algúns autores suxeriron que os autoanticorpos producidos nos pacientes con LEI poderían non ser tan patóxenos coma os que se producen no LES. Isto puido demostrarse en parte nun estudo realizado en pacientes con LES, pacientes con LEI e familiares de primeiro grado de pacientes con LES, no que se analizaban os autoanticorpos presentes no soro [107]. Atoparon que tanto no grupo de LES coma no de LEI había niveis altos de autoanticorpos IgG dirixidos fronte a 50 autoantíxenos diferentes e de autoanticorpos IgM dirixidos fronte a 12 autoantíxenos. A diferenza entre os dous grupos estaba na ratio IgG:IgM, predominando os anticorpos IgM no grupo LEI. Isto podería representar un paso previo ó LES, antes do cambio de clase dos autoanticorpos, ou ben deberse á actuación de

mecanismos de regulación que deterían o proceso antes da maduración por afinidade e a formación polo tanto de autoanticorpos IgG. En xeral, os autoanticorpos IgG son máis patoxénicos cós IgM, polo que se podería explicar o mellor prognóstico dos pacientes con LEI. Ademais os autoanticorpos IgM poden protexer fronte o desenvolvemento de autoinmunidade, xa que estimulan a capacidade das células dendríticas inmaturas para fagocitar as células apoptóticas, evitando así a exposición de autoantíxenos.

### **1.5.7 Estudos xenéticos no LEI**

Ó contrario que no LES, no que se realizaron múltiples estudos xenéticos, no LEI practicamente non hai traballos. Os alelos HLA-DRB1 foron estudados con profundidade no LES dende fai anos, pero no LEI a única aproximación foi o estudo dos antíxenos HLA nunha das series publicadas [97]. Trátase dun estudo serolóxico que incluía unicamente 22 pacientes con LEI. Estes autores atoparon unha maior frecuencia do serotipo DR3 en pacientes tanto con LES coma con LEI ó comparalos con controis sans. Ademais observaron menor frecuencia do serotipo DR1 nos pacientes con LEI que desenvolveron LES ca naqueles que permaneceron como LEI. O antíxeno DR3, correspondente ó alelo HLA-DRB1\*03, asociouse ó desenvolvemento de LES de forma consistente en múltiples poboacións, e o antíxeno DR1, que corresponde ó alelo HLA-DRB1\*01, pódese considerar protector. Este estudo

tiña un número tan escaso de pacientes que malia atopar datos que podían orientar cara á existencia de diferenzas entre o LEI e o LES non puideron sacar conclusións definitivas. Dende 1989, ano da publicación dese traballo, non houbo novos intentos de caracterizar os HLA-DRB1 no LEI.

Recentemente, Li *et al.* deron un paso máis no estudo xenético do LEI [108]. Estudaron os niveis de expresión xenética en pacientes con LEI e en pacientes con LES, e observaron que o número de xenes que se expresan de forma diferente entre os pacientes dun e doutro grupo é menor que entre os pacientes con LEI e os controis sans. Ademais, centrándose nos xenes da “sintura do interferón” (*interferon signature genes* en inglés) (63 xenes), atoparon que o nivel de expresión destes xenes correlacionaba co número de criterios clínicos da enfermidade presentes e cos niveis de ANA (por ELISA). Por outra banda o nivel de expresión dos xenes da “sinatura do interferón” correlacionou positivamente coa presenza de autoanticorpos IgG e inversamente cos IgM. Pero ó analizalo por grupos, viuse que parte dos pacientes con LEI amosaban patróns de expresión xenética inducida por interferón semellantes ós de pacientes con LES activo. O que non se estudou é se na evolución deses pacientes con LEI algúns desenvolvían LES.

### **1.5.8 Presentación clínica do LEI**

Malia que os criterios de inclusión varían entre os diferentes estudos do LEI, a distribución de sexo e idade de diagnóstico foron similares ás dos pacientes das cohortes de LES.

As manifestacións clínicas máis frecuentes foron as cutáneas, articulares e hematolóxicas, mentres que a afectación neurolóxica e renal foi excepcional no LEI.

Os ANA normalmente non mostraron especificidade, e cando o fixeron foi máis frecuente encontrar anticorpos anti-SSA e anti-SSB que anti-ADN ou anti-Sm.

### **1.5.9 Evolución do LEI**

A tendencia do LEI é a manterse estable ó longo do tempo. Pódese considerar que os pacientes que desenvolven enfermidade definida eran pacientes con LES de evolución lenta.

Nas series publicadas, a porcentaxe de pacientes con LEI que desenvolveron LES variou entre o 5% e o 57%, o que depende en gran medida do tempo de seguimento (a maior tempo de seguimento, maior porcentaxe de desenvolvemento de LES). Tamén os criterios de LEI utilizados inflúen na porcentaxe de casos de LES, xa que a serie con maior porcentaxe de



desenvolvemento de LES inclúe pacientes cunha evolución curta, mentres que no estudo que inclúe un seguimento previo á inclusión de 5 anos, só un 5% desenvolven LES. Ó analizar o total de pacientes con LEI publicados ata a data, menos dun 14% dos pacientes con LEI desenvolveron LES. Pero o risco de desenvolver LES non se mantén constante ó longo do tempo, é maior nos catro primeiros anos e posteriormente vai diminuíndo [85].

**Táboa 2.** Desenvolvemento de LES entre os pacientes con LEI das series publicadas

	Greer 1989	Ganczarzyk 1989	Voss 1998	Vilá 2000	Swaak 2001	Stahl-Hallengren 2004	Al Attia 2006
<b>Anos seguimento, media</b>	1,6	8	2,8	2,2	3	13	1,77
<b>Pacientes que desenvolveron LES, n (%)</b>	2 (5)	7 (32)	0	8 (9)	3 (3)	16 (57)	0
<b>Tempo ata desenvolvemento LES, anos</b>	1,5	>5		4,3 (± 4)	2,3	5,3 (1-10)	
<b>Nº pacientes con 4 criterios no 1º ano</b>	1	-		ND	-	8	
<b>Nº pacientes con 4 criterios en &lt; 5 anos</b>	2	-		ND	3	16	

Algunhas das características clínicas como a presenza de eritema malar [100, 102] e inmunolóxicas como a positividade de anticorpos anti-ADN, antifosfolípido e a diminución do complemento, asociáronse con maior risco de LES [96, 100, 102]





## **2. HIPÓTESE E OBXECTIVOS**



## 2.1 Hipótese

Existen diferenzas xenéticas nos alelos HLA DRB1 entre os pacientes de raza caucásica con lupus eritematoso incompleto e os pacientes con lupus eritematoso sistémico definido.

## 2.2 Obxectivos

- Determinar a prevalencia dos diferentes alelos HLA-DRB1 en pacientes con LEI e comparalos con pacientes con LES.
- Comparar a prevalencia dos diferentes alelos HLA-DRB1 en pacientes con LEI e LES cun grupo de controis sans.
- Estudar as manifestacións clínicas e analíticas nos pacientes con LEI e comparalas coas dos pacientes con LES.
- Estudar se existe asociación entre os alelos HLA-DRB1 e as manifestacións clínicas e os anticorpos do lupus.





### **3. METODOLOXÍA**





## 3.1 Selección de Pacientes

Os suxeitos do estudio foron pacientes con LES e con LEI.

### 3.1.1 Fonte de suxeitos

O estudio realizouse no Hospital Xeral-Cíes de Vigo, pertencente ó Complexo Hospitalario Universitario de Vigo (CHUVI), que atende unha poboación de raza caucásica, metade rural e metade urbana duns 400.000 habitantes.

Os pacientes recolléronse a partir dos datos do Laboratorio de Inmunoloxía do CHUVI. Da súa base de datos informatizada seleccionáronse os pacientes que presentaron un resultado de ANA positivo a un título maior ou igual a 1/160 entre o 1 de xaneiro de 2007 e o 31 de decembro de 2010. De todos eses pacientes, revisáronse os historiais clínicos dos que tiñan seguimento activo nas consultas da Unidade de Trombose e Vasculite ou de Reumatoloxía do Hospital Xeral-Cíes de Vigo. Trala revisión de historias clínicas, seleccionáronse os pacientes que presentaban, ademais da presenza de ANA, un ou máis criterios de clasificación do LES.

Contactouse telefonicamente cos pacientes seleccionados explicando a natureza do estudio e solicitando a súa colaboración. Os pacientes que aceptaron foron citados para asinar o consentimento informado para

participar no estudio e o específico para estudos xenéticos, realizar a entrevista clínica e a extracción de sangue.

### **3.1.2 Criterios de inclusión de pacientes e controis sans**

#### **3.1.2.1 Criterios de inclusión de pacientes con LEI**

- Presenza de ANA positivos cun título igual ou maior a 1/160 en dúas determinacións separadas no tempo.
- Presenza de ó menos outro criterio de clasificación do LES sen chegar en total a cumprir 4 criterios de clasificación da ACR para LES [83].
- Seguimento en consulta superior a 2 anos antes da inclusión.

#### **3.1.2.2 Criterios de exclusión de pacientes con LEI**

- Cumprir criterios de clasificación doutras enfermidades do tecido conxuntivo e vasculite: Artrite reumatoide [109], Esclerose sistémica [110], Síndrome de Sjögren [111], Polimiosite/Dermatomiosite (definida, probable ou posible) [112], Enfermidade mixta do tecido conectivo [113], Espondilite anquilopoiética [114], Síndrome antifosfolípido [115], Enfermidade de Behçet [116] e vasculites sistémicas (Granulomatose de Wegener [117], Síndrome de Churg-Strauss [118], Polianxeíte microscópica [119], Poliarterite nodosa

[120], Púrpura de Henoch-Schönlein [121], Enfermidade de Takayasu [122] e Vasculite por hipersensibilidade [123]).

- Presenza doutras enfermidades e fármacos que poidan provocar resultados falsos positivos de ANA.
- Raza non caucásica.
- Enfermidade psiquiátrica ou neurolóxica que impida comprender a natureza do estudio e a súa participación nel.
- Negativa a participar no estudio e non asinar o consentimento informado.

### **3.1.2.3 Criterios de inclusión de pacientes con LES**

Recolléronse todos os pacientes de raza caucásica diagnosticados de LES, é dicir, aqueles que cumprían 4 criterios ou máis de clasificación de LES da ACR do ano 1982 [83], seguidos nas consultas da Unidade de Trombose e Vasculite e de Reumatoloxía do Hospital Xeral-Cíes de Vigo.

### **3.1.2.4 Criterios de exclusión de pacientes con LES**

- Raza non caucásica.
- Enfermidade psiquiátrica ou neurolóxica que impida comprender a natureza do estudio e a súa participación nel.
- Negativa a participar no estudio e non asinar o consentimento informado.

### 3.1.2.5 Criterios de inclusión de controis poboacionais sans

Os controis sans foron escollidos, unha vez dado o seu consentimento para participar no estudo, entre doantes de sangue e persoal sanitario apareados por idade e sexo cos pacientes con LES.

### 3.1.2.6 Criterios de exclusión de controis poboacionais sans

- Raza non caucásica.
- ANA positivo  $\geq 1/80$ .
- Historia persoal de enfermidade autoinmune.
- Enfermidade psiquiátrica ou neurolóxica que impida comprender a natureza do estudo e a súa participación nel.
- Negativa a participar no estudo e non asinar o consentimento informado.

## 3.2 Variables a Estudio

Revisáronse detalladamente as historias clínicas e os resultados analíticos dispoñibles para cada paciente. Ademais, todo e cada un dos paciente con LEI e LES foron citados na área de policlínica para realizar unha entrevista clínica en profundidade e dirixida ás manifestacións autoinmunes, revisando en cada caso a validez do diagnóstico ou clasificación previamente establecido. Antes da consulta realizouse a extracción de sangue para o estudo xenético.

Por esta vías recolléronse as seguintes variables:

- Data de nacemento
- Idade
- Sexo
- Data da primeira determinación ANA positiva
- Data da primeira manifestación de lupus
- Data de diagnóstico do LES
- Criterios do ACR de LES presentes ó inicio da enfermidade
- Criterios do ACR de LES aparecidos durante a evolución da enfermidade

No sangue extraído realizáronse estudos analíticos que incluiron:

- Hemograma completo
- Estudio básico de coagulación
- Perfil bioquímico
- Autoanticorpos (ANA, anti-ADN, ENAs)
- Velocidade de sedimentación globular
- Proteína C reactiva
- Complemento (C3 e C4)
- Inmunoglobulinas
- Vitamina D

Os estudos analíticos foron feitos no Laboratorio de Hematoloxía e no Laboratorio Central do Hospital Xeral-Cíes de Vigo.

O estudo de autoanticorpos realizouse no Laboratorio de Inmunoloxía do Hospital Xeral-Cíes de Vigo.

- A determinación de ANA realizouse por inmunofluorescencia indirecta sobre células HEp2.
- Os anticorpos anti ADNdc determináronse por inmunofluorescencia indirecta usando *Crithidia luciliae*.
- O estudo de anticorpos anti-ENA fíxose mediante ELISA.



### 3.3 Estudio Xenético

Recolléronse mostras de sangue por punción venosa periférica en tubos con EDTA 6 ml.

#### 3.3.1 Extracción de ADN

A extracción de ADN efectuouse mediante o kit Flexigene DNA de Qiagen® (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) co seguinte protocolo:

1. Pipetear 25 ml do tampón de lise nun tubo para centrifugar de 50 ml. Engadir os 6 ml de sangue periférico e mesturar invertendo o tubo 5 veces.
2. Centrifugar durante 5 minutos a 2000 x g nunha centrífuga
3. Rexeitar o sobrenadante e deixar o tubo invertido sobre papel secante durante 2 minutos, tendo coidado de que o precipitado non caia do tubo.
4. Engadir 5 ml da mestura tampón de desnaturalización/Proteasa, preparada con antelación segundo as seguintes indicacións:

- Reconstituír a proteasa liofilizada en tampón de hidratación.
- Calcular o volume total de sangue que se vai procesar, por cada 4 ml de sangue hai que preparar 2 ml de tampón de desnaturalización e 20  $\mu$ l da proteasa reconstituída.

- Esta mestura debe utilizarse na seguinte hora á súa preparación.

Pechar o tubo e poñer no vórtex inmediatamente ata que o precipitado se homoxeneice totalmente (3–4 pulsos de vórtex a alta velocidade de 5 segundos). Revisar o tubo para asegurarse da correcta homoxeneización.

5. Inverter o tubo 3 veces e colocalo no baño, incubar a 65°C durante 10 minutos.

6. Engadir 5 ml de isopropanol (100%) e mesturar ben invertendo o tubo ata que o precipitado de ADN sexa visible en forma de febras ou dun novelo.

7. Centrifugar durante 3 minutos a 2000 x *g*.

8. Rexeitar o sobrenadante e inverter o tubo sobre papel secante, tendo coidado novamente de que o precipitado non saia do tubo.

9. Engadir 5 ml de etanol ó 70% e poñer no vórtex durante 5 segundos.

10. Centrifugar durante 3 minutos a 2000 x *g*.

11. Rexeitar o sobrenadante e deixar o tubo invertido sobre papel secante polo menos 5 minutos, tendo coidado unha vez máis de que o precipitado non caia do tubo.

12. Deixar secar o precipitado de ADN ó aire ata que se evapore todo o líquido.



13. Engadir 1 ml de tampón de hidratación, poñer no vórtex durante 5 segundos a baixa velocidade e disolver o ADN incubándoo durante unha hora a 65°C no baño.

O ADN obtido cuantificouse por espectrofotometría e posteriormente foi almacenado a -20 ° ata a realización da PCR.

### 3.3.2 Realización da PCR

Realizouse un experimento para cada alelo HLA-DRB1 estudado. Utilizáronse os cebadores descritos por Olerup *et al.* en 1992 [124] (Anexo 1).

A amplificación mediante PCR realizouse segundo o seguinte protocolo:

1. Desconxelar reactivos a temperatura ambiente: tampón de PCR 10x, mestura de dNTPs e solucións de cebadores e conservar en fríos. Mesturar ben utilizando vórtex antes de usar para evitar diferenzas na concentración de sal.
2. Preparar unha mestura de reactivos con todos os compoñentes necesarios para a PCR, agás o ADN (Táboa 3). Calcular o volume necesario para o total de ensaios de PCR a efectuar, incluíndo un control negativo, e preparar un 10% máis. Manter en frío.
3. Mesturar os reactivos mediante vórtex e centrifugar uns segundos para recuperar todo o volume. Pipetear 24 µl da mestura de reactivos en tubos para PCR de 1 ml. De seguido, engadir 1 µl de ADN a cada

tubo e posteriormente centrifugar a baixa velocidade uns segundos para recuperar todo o volume. Colocar no termociclador e programar segundo o protocolo descrito na táboa 4. A temperatura de anelamento varía en función do alelo estudado (Anexo 1).

**Táboa 3.** Composición da mestura de reactivos para a PCR

<b>Compoñentes</b>	<b>Volume por reacción</b>
Tampón de PCR 10x	2,5 µl
Mestura de dNTPs (10 mM de cada)	0,8 µl
Cebador alelo F	0,5 µl
Cebador alelo R	0,5 µl
Cebador control interno F*	0,5 µl
Cebador control interno R*	0,5 µl
Taq ADN Polimerasa	0,1 µl
Auga destilada	c.s.p. 24 µl
<b>Volume total</b>	<b>24 µl</b>
ADN	1 µl
<b>Volume final</b>	<b>25 µl</b>

---

\* Engadimos na mestura un control interno que amplifica unha secuencia de 434 pb do xene *hGH* (human Groth Hormone), para comprobar o éxito da reacción nos casos negativos.

---

**Táboa 4.** Duración e temperatura dos diferentes pasos da PCR

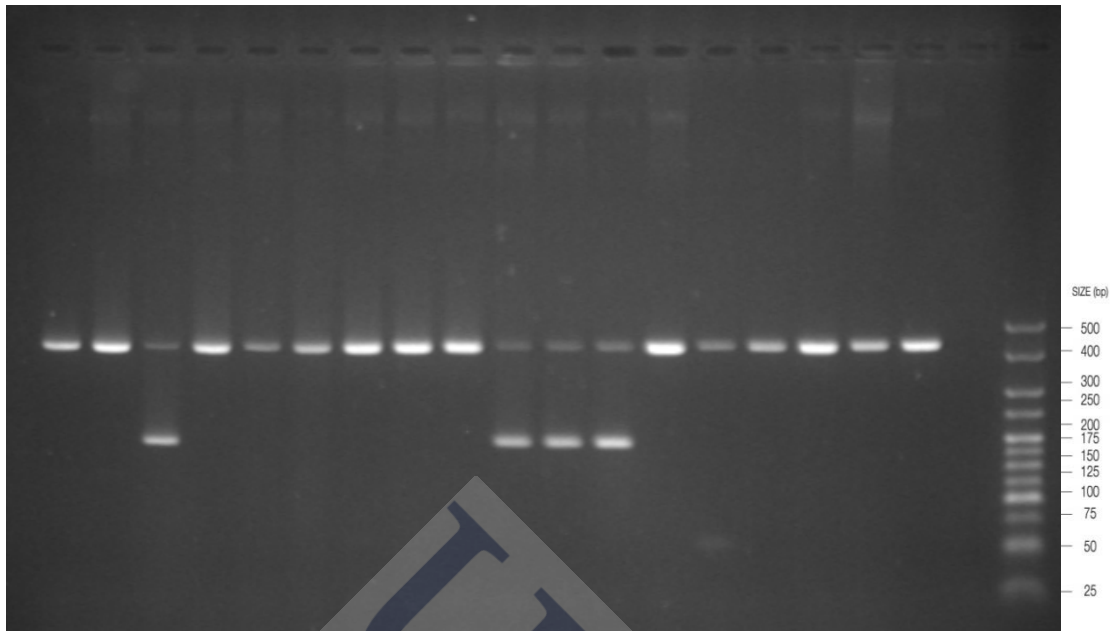
	<b>Tempo</b>	<b>Temperatura</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	2'	94°C
<b>Ciclo de 3 pasos</b>		
<b>(30 ciclos)</b>		
Desnaturalización	20''	94°C
Anelamento	50''	50–68°C*
Extensión	20''	72°C
<b>Extensión final :</b>	5'	72°C

\*A temperatura de anelamento varía dependendo do alelo amplificado (Anexo 1)

### 3.3.3 Electroforese dos produtos PCR

Preparar xel con TBE 0,4% e agarosa de baixa electroendosmose (Low EEG) ó 2% na bandexa de electroforese. Cargar os produtos PCR e correr na cubeta de electroforese a 250 V durante 60 minutos. Engadir na última cubeta marcador de peso molecular (HyperLadder™ 25bp (Bioline Ltd, UK)).

Posteriormente ver resultado na cámara baixo luz UV (Figuras 6 e 7).



**Figura 6. Visualización do xel de agarosa baixo luz UV tras electroforese dos produtos PCR correspondentes ó alelo HLA DRB1\*15, de 197 pb.** A banda de 434 pb corresponde ó control interno que amplifica un fragmento do xene da hGH. A primeira columna pola dereita corresponde ó marcador de peso molecular (HyperLadder™ 25bp, Bioline Ltd., UK) e a segunda ó control negativo.



**Figura 7. Visualización do xel de agarosa baixo luz UV tras electroforese dos produtos PCR correspondentes ó alelo HLA DRB1\*01, de 255 pb.** A banda de 434 pb corresponde ó control interno que amplifica un fragmento do xene da hGH. A primeira columna pola dereita corresponde ó marcador de peso molecular (HyperLadder™ 25bp, Bioline Ltd., UK) e a segunda ó control negativo.

### 3.3.4 Interpretación de resultados

Almacenouse unha foto en papel e outra en formato dixital dos produtos PCR vistos baixo luz UV de cada experimento. Os resultados das PCRs analizáronse en función dos tamaños descritos por Olerup e Zetterquist [124] para os diferentes alelos HLA-DRB1. Estes resultados foron lidos de forma independente por dous investigadores.

### 3.4 Recollida de Datos

Creouse unha base de datos informática (no programa Microsoft Excel® 2010) con tódalas variables cuantitativas e cualitativas recollidas. A cada paciente asignóuselle un código numérico, coñecido unicamente por dous dos investigadores, co fin de preservar a intimidade dos suxeitos do estudo.

### 3.5 Aspectos Éticos

- O estudo foi aprobado polo Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (código de rexistro CEIC Galicia 2011/175).
- Todos os suxeitos incluídos no traballo foron debidamente informados e asinaron o consentimento informado segundo a Lei 41/2002, do 14 de novembro, básica reguladora da autonomía do paciente e de dereitos e deberes en materia de información e documentación clínica: os dereitos da

información sanitaria e da intimidade, e a Lei 3/2001, do 28 de maio, reguladora do consentimento informado e da historia clínica dos pacientes.

- Tódalas mostras biolóxicas obtidas foron procesadas e almacenadas a  $-20^{\circ}$  en alícuotas de 1 ml rotuladas cun código numérico co fin de impedir a súa identificación, manipulación e divulgación, cumprindo coa Lei Orgánica 15/1999, do 13 de decembro, de Protección de Datos de Carácter Persoal.

### **3.6 Análise Estatística**

As variables incluídas na folla de cálculo, foron exportadas ó programa IBM SPSS Statistics versión 19.0 (IBM Inc, 2010), co que se realizou a análise estatística.

Para as variables cualitativas calculáronse as proporcións cos seus intervalos de confianza. As posibles asociacións de caracteres analizáronse utilizando a proba de Chi cadrado e alternativamente o test exacto de Fisher.

Para a descrición das variables cuantitativas utilizáronse a media e a desviación estándar se a distribución era normal, e a mediana e o rango intercuartil (entre o cuartil 25 e o 75) para as variables moi asimétricas.

E para a comparación utilizáronse as correspondentes probas de diferenzas de medias, paramétricas ou non paramétricas, dependendo de se as variables se axustaban ou non á normalidade.

Despois do estudo bivariado fíxose un estudo de regresión loxística binaria co obxectivo de avaliar de xeito simultáneo os factores que presumiblemente están relacionados coa variable dependente (grupo LEI/LES) para coñecer o seu efecto de forma axustada. Utilizouse o método de introdución de covariables, introducindo unha por unha todas as variables que alcanzaran significación estatística no estudo bivariado.

Calculouse o correspondente *odds ratio* para cada variable asociada e o seu intervalo de confianza.

Considerouse significativa unha  $p < 0,05$ , e nas comparacións múltiples aplicouse a corrección de Bonferroni.

### 3.7 Cronograma

A selección de pacientes e revisión de historias clínicas comezou en outubro de 2009 e prolongouse ata marzo de 2011.

En novembro de 2010 comezaron as entrevistas clínicas e as extraccións de sangue, que remataron en xaneiro de 2012.

A análise xenética iniciouse en xaneiro de 2011 e rematou en marzo de 2012.

O estudo estatístico e redacción da tese comezou en abril de 2012.





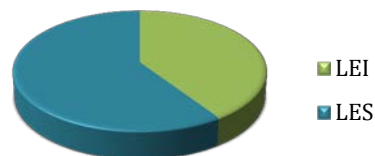


## **4. RESULTADOS**



## 4.1 Descrición das Series

Dun total de 196 pacientes seguidos na consulta da Unidade de Trombose e Vasculites e de Reumatoloxía con máis dunha determinación de ANA positiva a



título  $\geq 1/160$  entre o 1 de xaneiro de 2009 e o 31 de decembro de 2010, seleccionáronse 107 que cumprían criterios de inclusión no estudo. Deses 107 pacientes descartáronse 6 (4 no quixeron participar no estudo e 2 tiñan nese momento domicilio fóra de Galicia). Incluíronse no estudo un total de 101 pacientes, dos que 41 foron clasificados como LEI e 60 como LES (Figura 8).

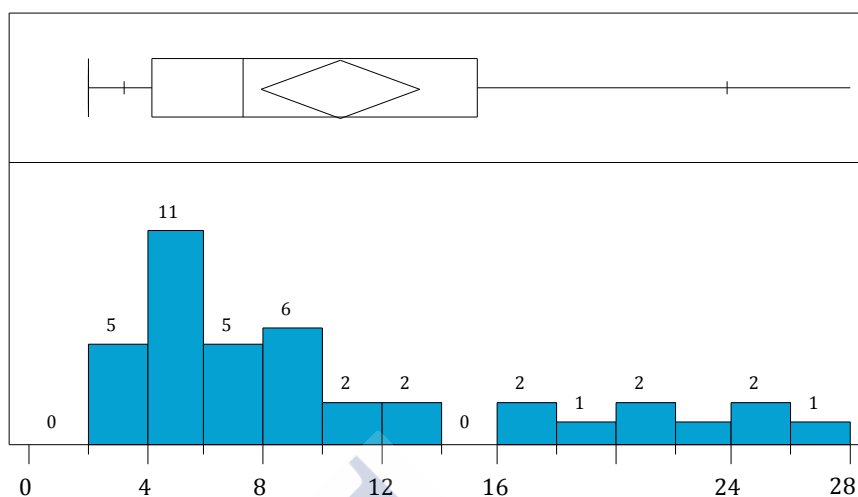
**Figura 8.** Distribución de pacientes por grupos

### 4.1.1 Tempo de seguimento

No momento da inclusión de pacientes, a mediana do tempo de seguimento na consulta era de 11,8 anos (IQR 6,3-20,3).

### 4.1.2 Tempo de evolución dos pacientes con LEI

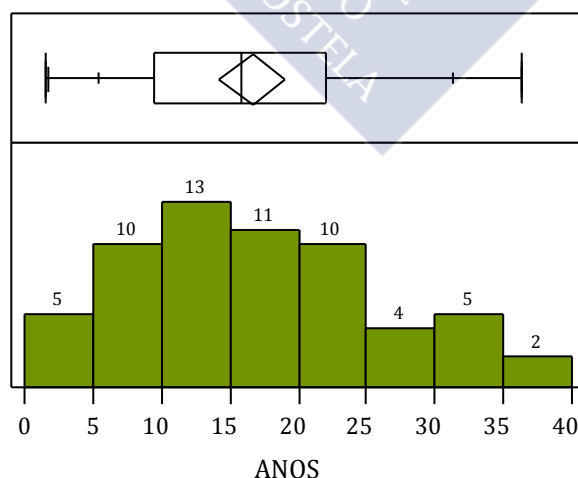
No momento da inclusión, o tempo de evolución dende a primeira manifestación era de 7,3 anos (IQR 4,3-15,3). Había 13 pacientes entre 2 e 5 anos de evolución, e os 28 restantes tiñan polo tanto máis de 5 anos de evolución (entre 5 e 26 anos) (Figura 9).



**Figura 9. Tempo de evolución dos pacientes con LEI.** O tempo de evolución dende o inicio da enfermidade era de máis de dous anos en tódolos pacientes con LEI, e de máis de cinco anos no 73 % deles.

### 4.1.3 Tempo de evolución dos pacientes con LES

Nos pacientes con LES, o tempo de evolución da enfermidade estaba entre 2 e 36 anos, cunha mediana de 15,3 anos (IQR 8,8-21,3) (Figura 10).



**Figura 10. Tempo de evolución dos pacientes con LES.** A maior parte dos pacientes con LES presentaban un tempo de evolución da enfermidade entre 5 e 25 anos, cunha mediana en 15,3 anos.

## 4.2 Características xenéticas: Alelos HLA DRB1

### 4.2.1 Estudio da frecuencia dos alelos HLA DRB1 en pacientes con LEI e LES

Estudouse a frecuencia dos diferentes alelos HLA DRB1 comparando os resultados entre os dous grupos de pacientes (Táboa 5).

**Táboa 5.** Comparación de frecuencias dos distintos alelos HLA DRB1 entre o grupo de pacientes con LEI e o grupo de LES.

DRB1	LEI n=41 (%)	LES n=60 (%)	p
*01	3 (7)	6 (10)	ns
*03	18 (44)	32 (53)	ns
*04	6 (15)	6 (10)	ns
*07	10 (24)	13 (22)	ns
*08	3 (7)	4 (7)	ns
*09	0	1 (2)	ns
*10	1 (2)	0	ns
*11	11 (27)	5 (8)	0,0136
*12	0	2 (3)	ns
*13	12 (29)	15 (25)	ns
*14	1 (2)	3 (5)	ns
*15	3 (7)	15 (25)	0,0167
*16	0	5 (8)	ns

Unha vez analizadas as frecuencias dos alelos HLA DRB1 estudados, vemos que tanto no grupo de LEI como no de LES, o máis frecuente é o HLA DRB1\*03, seguido do HLA DRB1\*13. Detéctanse diferenzas significativas nos alelos HLA DRB1\*11 e DRB1\*15, o primeiro máis frecuente entre os pacientes con LEI e o segundo entre os pacientes con LES (Táboas 5 e 6).

**Táboa 6.** Alelos HLA DRB1 diferentes entre grupo LEI e LES

<b>Alelo DRB1</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
<b>*11</b>	4,033	1,281-12,699
<b>*15</b>	0,237	0,064-0,880

Na análise de regresión loxística binaria, vemos que o alelo HLA DRB1\*11 mantén a significación estatística, mentres que as diferenzas no HLA DRB1\*15 deixan de ser significativas (Táboa 7).

**Táboa 7.** Regresión loxística: Comparación alelos HLA DRB1 entre LEI e LES

<b>Alelo DRB1</b>	<b>p</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
<b>*15</b>	0,053	3,725	0,983-14,107
<b>*11</b>	0,032	0,279	0,087-0,897

#### 4.2.2 Comparación dos alelos HLA DRB1 co grupo de controis sans

Comparamos as frecuencias dos diferentes alelos HLA DRB1 no total dos 101 pacientes con lupus (LEI e LES) coas observadas nun grupo de 59 individuos sans (apareados por idade e sexo co grupo de LES). Detectamos diferenzas significativas na frecuencia do alelo HLA DRB1\*03, máis frecuente nos pacientes con LES e LEI, e do alelo HLA DRB1\*01, máis frecuente no grupo de individuos sans (Táboa 8).

**Táboa 8.** Alelos HLA DRB1 en lupus e en individuos sans

DRB1	LEI + LES n=101 (%)	Controis n=59 (%)	p
<b>*01</b>	9 (9)	15 (25)	0,0056
<b>*03</b>	45 (45)	8 (14)	<0,0001
<b>*04</b>	12 (12)	10 (17)	ns
<b>*07</b>	13 (13)	16 (27)	ns
<b>*08</b>	7 (7)	4 (7)	ns
<b>*09</b>	1 (1)	0	ns
<b>*10</b>	1 (1)	2 (3)	ns
<b>*11</b>	16 (16)	14 (24)	ns
<b>*12</b>	0	2 (3)	ns
<b>*13</b>	27 (27)	18 (31)	ns
<b>*14</b>	4 (4)	6 (10)	ns
<b>*15</b>	18 (18)	8 (14)	ns
<b>*16</b>	5 (5)	6 (10)	ns

Ó separar os pacientes por grupos e comparalos co grupo de individuos sans, atopamos as mesmas diferenzas nos alelos HLA DRB1\*01 e DRB1\*03. Pero ademais, a frecuencia do alelo HLA DRB1\*16 é significativamente maior no grupo de individuos sans comparado co grupo de LEI (Táboa 9).

**Táboa 9.** Comparación dos alelos HLA DRB1 entre controis sans e LEI

<b>DRB1</b>	<b>LEI n=41 (%)</b>	<b>Controis n=59 (%)</b>	<b>p</b>
<b>*01</b>	3 (7)	15 (25)	0,0150
<b>*03</b>	18 (44)	8 (14)	0,0008
<b>*04</b>	6 (15)	10 (17)	ns
<b>*07</b>	10 (24)	16 (27)	ns
<b>*08</b>	3 (7)	4 (7)	ns
<b>*09</b>	0	0	ns
<b>*10</b>	1 (2)	2 (3)	ns
<b>*11</b>	11 (27)	14 (24)	ns
<b>*12</b>	0	2 (3)	ns
<b>*13</b>	12 (29)	18 (31)	ns
<b>*14</b>	1 (2)	6 (10)	ns
<b>*15</b>	3 (7)	8 (14)	ns
<b>*16</b>	0	6 (10)	0,0378

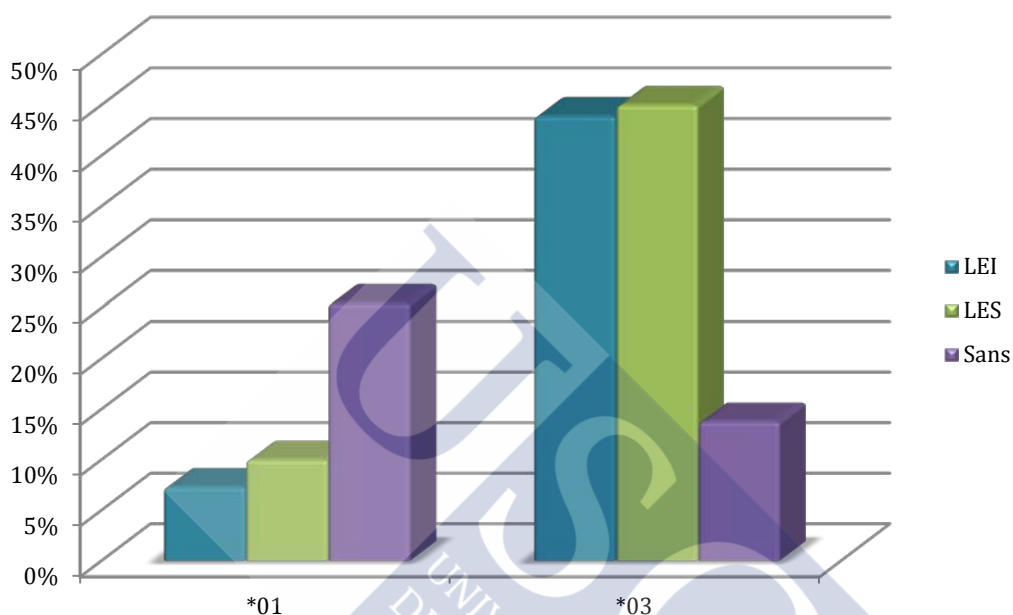


Doutra banda, comparando o grupo de pacientes con LES co de individuos sans, ademais das diferenzas antes sinaladas nos alelos HLA DRB1\*01 e HLA DRB1\*03, obsérvase unha frecuencia significativamente menor do alelo HLA DRB1\*11 nos pacientes con LES (Táboa 10).

**Táboa 10.** Comparación dos alelos HLA DRB1 entre controis sans e LES

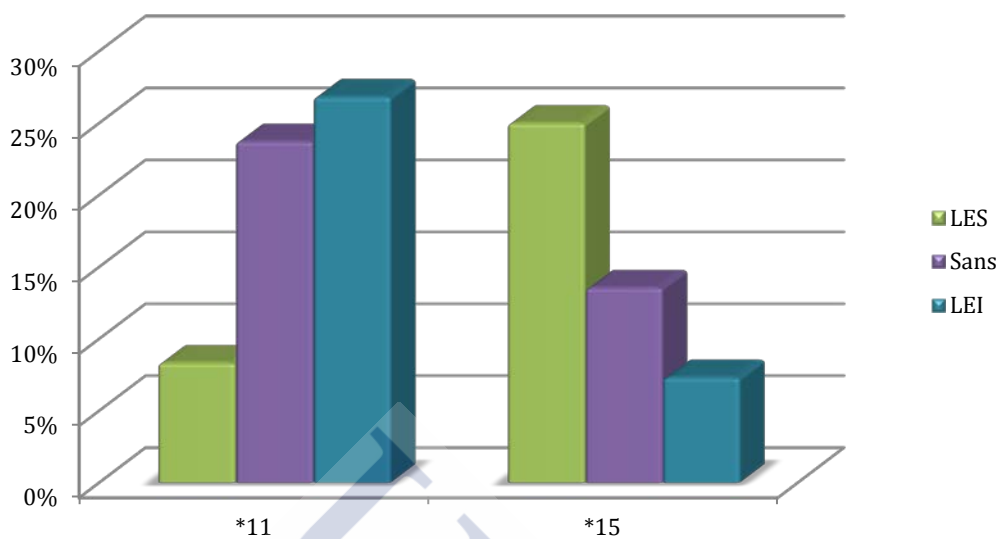
DRB1	LES n=60 (%)	Controis n=59 (%)	p
*01	6 (10)	15 (25)	0,0254
*03	27 (45)	8 (14)	0,0002
*04	6 (10)	10 (17)	ns
*07	13 (22)	16 (27)	ns
*08	4 (7)	4 (7)	ns
*09	1 (2)	0	ns
*10	0	2 (3)	ns
*11	5 (8)	14 (24)	0,0198
*12	2 (3)	2 (3)	ns
*13	15 (25)	18 (31)	ns
*14	3 (5)	6 (10)	ns
*15	15 (25)	8 (14)	ns
*16	5 (8)	6 (10)	ns

Polo tanto tódolos pacientes con lupus (LEI e LES) teñen un comportamento semellante fronte ós individuos sans, cunha maior frecuencia do alelo HLA DRB1\*03 e menor do DRB1\*01 (Figura 11).



**Figura 11. Frecuencia dos alelos HLA DRB1\*01 e DRB1\*03 nos tres grupos estudados.** O alelo HLA DRB1\*01, considerado protector fronte ó LES, ten unha frecuencia significativamente menor nos grupos de lupus (LEI e LES) que no de controis sans ( $p = 0,0056$ ). O alelo HLA DRB1\*03, que é o que se asociou ó LES de forma máis consistente, presenta maior frecuencia nos grupos de lupus (LEI e LES) ca no grupo control san, sendo esa diferenza estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ).

Os alelos HLA DRB1\*11 e DRB1\*15, cunhas frecuencias que amosan diferenzas significativas entre os grupos de LEI e de LES, parecen mostrar un gradiente ó engadir o grupo de controis sans (Figura 12).



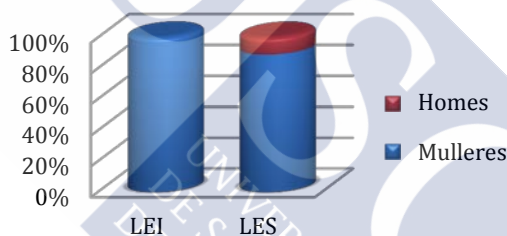
**Figura 12. Frecuencia dos alelos HLA DRB1\*11 e DRB1\*15 nos tres grupos estudados.**

A frecuencia do alelo HLA DRB1\*11, considerado protector fronte ó LES, forma un gradiente inverso ó presentado pola frecuencia do alelo DRB1\*15, asociado ó desenvolvemento de LES. O alelo HLA DRB1\*11 é significativamente máis frecuente entre os pacientes con LEI ca no grupo de LES (0,0136), quedando o grupo control san en medio. En cambio o alelo DRB1\*15 é menos frecuente no grupo de LEI ca no de LES (p 0,0167), quedando outra vez o grupo control cunha frecuencia intermedia.

### 4.3 Características Demográficas

#### 4.3.1 Sexo

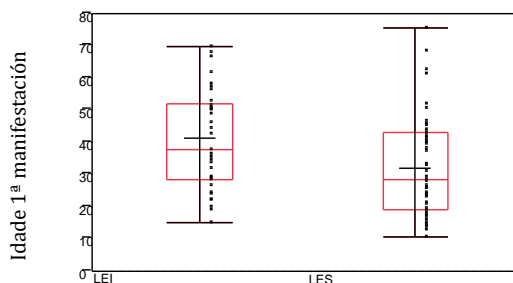
Dos 101 pacientes, 95 eran mulleres e 6 homes, o que dá unha ratio muller:home de 15,8:1. No grupo de LEI non había ningún home, mentres que no de LES eran 54 mulleres e 6 homes (ratio de 9:1) (Figura 13). A proporción muller:home foi significativamente maior no grupo de LEI ca no de LES (p 0,0395).



**Figura 13. Distribución por sexos en ambos grupos.** No grupo de LES a ratio muller:home foi de 9:1, mentres que no grupo de LEI non houbo ningún home.

#### 4.3.2 Idade de inicio da enfermidade

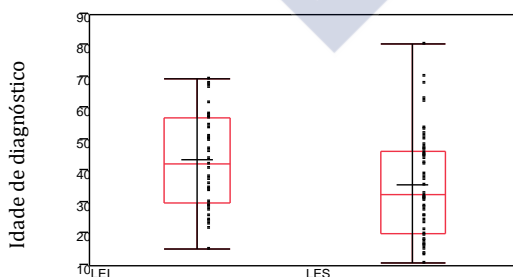
No total de pacientes a idade de inicio da enfermidade foi de 35,6 anos, cunha DE de 15,8. No grupo de LEI a idade de aparición da primeira manifestación da enfermidade foi de 41,2 anos (DE 15,2), e de 31,8 anos no grupo de LES (DE 15,1), diferenza que acadou significación estatística, cunha p 0,0015 (Figura 14).



**Figura 14. Idade da primeira manifestación.** Nos pacientes con LEI, a idade de inicio da enfermidade foi maior ca nos pacientes con LES (p 0,0015)

#### 4.3.3 Idade de diagnóstico da enfermidade

Algo semellante aconteceu coa idade de diagnóstico, que no total de pacientes foi de 39,0 anos (DE 16,1). No grupo de LEI a idade no momento do diagnóstico foi de 43,7 anos (DE 15,1) (Figura 15), mentres que no de LES foi de 35,7 anos (DE 16,1) (p 0,0063).



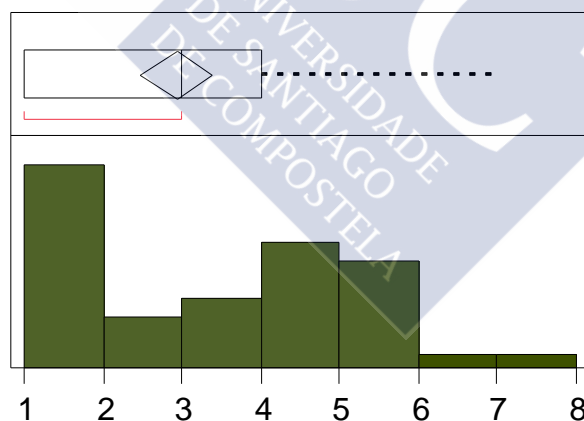
**Figura 15. Idade de diagnóstico da enfermidade.** No grupo de LEI a idade de diagnóstico da enfermidade foi maior ca no grupo de LES (p 0,0063)

## 4.4 Características Clínicas

### 4.4.1 Número de manifestacións de presentación

A maior parte dos pacientes, de ambos grupos, desenvolveron a enfermidade de forma gradual. É dicir, había pacientes que ó comezo da enfermidade presentaban entre un e tres criterios.

Dos 60 pacientes con LES, 34 (57%) debutaron con menos de 4 criterios, e a maior parte deles fixérono cun só criterio (Figura 16). Polo tanto, menos da metade dos pacientes con LES presentaban catro ou máis criterios de clasificación ó comezo da enfermidade.



**Figura 16. Número de criterios de presentación pacientes LES.** Un 57% dos pacientes con LES debutaron con menos de 4 criterios, mentres que o resto presentaban enfermidade definida dende o primeiro momento.

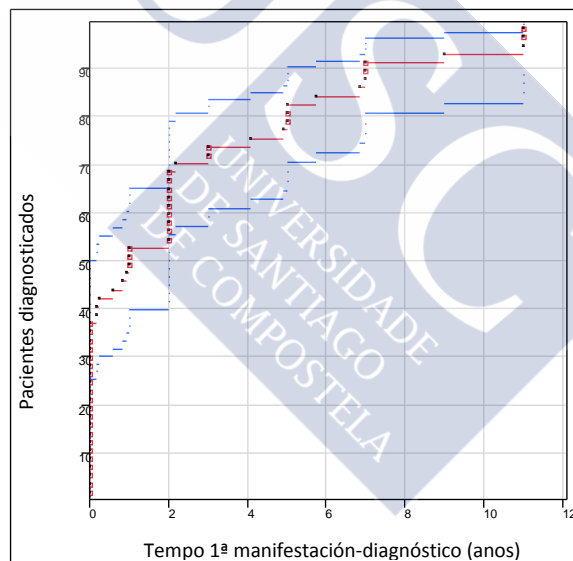
#### 4.4.2 Tempo desde primeira manifestación ata o diagnóstico de LES

Nos 60 pacientes con LES definido, o tempo transcorrido entre a aparición da primeira manifestación e o diagnóstico estaba entre 1 e 44 anos, cunha mediana de 1,5 anos (IQR 0-5). Entre estes pacientes detectáronse tres casos extremos nos que pasaran entre 19 e 44 anos desde o inicio da enfermidade ata o diagnóstico. Ó revisar caso por caso vemos que quizais estes intervalos non fosen reais:

- A primeira paciente presentara erupción malar no ano 1951. Naquel momento non había evidencia de ningunha outra alteración. Foi xa no ano 1995 cando consultou novamente pola presenza de aftas orais e alopecia. Nesa ocasión detectáronse ANA e anti-ADN e foi diagnosticada de LES.
- A segunda paciente fora diagnosticada en 1975 de lupus eritematoso discoide con ANA negativo. En 1991, os autoanticorpos seguiron sendo negativos. Catro anos máis tarde comeza a notar aftas orais, e en 2007, cando consulta por artralgias, realízase unha determinación de autoanticorpos que é positiva para ANA e anti-ADN.
- A terceira paciente debutou con artrite, aftas orais e alopecia en 1980. A determinación de ANA foi negativa nese momento. En 1998 presentou un cadro de pleurite e os ANA xa eran positivos.

Nos tres casos hai un lapso de tempo importante entre a determinación de autoanticorpos negativa e a positiva. Podemos pensar que se trate de tres casos de atraso diagnóstico máis ca de evolución extremadamente lenta da enfermidade, xa que os autoanticorpos poderían ser positivos anos antes do diagnóstico.

Considerando o total de pacientes con LES e excluindo estes tres casos extremos, a mediana do tempo transcorrido entre a aparición da primeira manifestación e o diagnóstico de LES foi de 1,0 ano (IQR 0-4,5). Ós 5 anos estaban diagnosticados o 75% dos pacientes, e o 90% ós 9 anos (Figura 17).



**Figura 17. Tempo de evolución dende o inicio da enfermidade ata o diagnóstico de LES.** O 50% dos pacientes estaban diagnosticados no primeiro ano dende o inicio da clínica e o 75% ós cinco anos.

Segundo o número de criterios de presentación, o tempo ata o diagnóstico variou, sendo menor naqueles pacientes nos que a enfermidade se presentou con tres criterios ca nos que se presentou cun (p 0,0063) (Táboa 11).



**Táboa 11.** Tempo de evolución ata o diagnóstico de LES segundo o número de criterios de inicio

<b>Tempo ata diagnóstico</b>	<b>Nº criterios de inicio</b>		
	1	2	3
<b>Mediana Anos (IQR)</b>	5,0 (2,0-7,0)*	4,9 (2,0-8,9)	2 (0-2,2)
<b>N</b>	22	5	7
<b>%</b>	37	8	12

\*Excluíndo os tres casos atípicos; IQR rango intercuartil

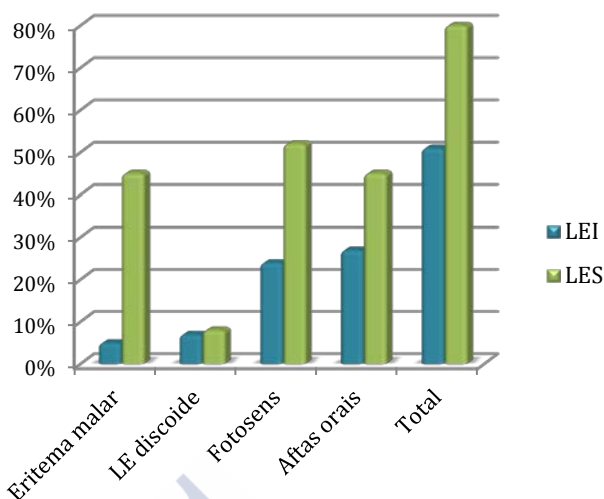


### **4.4.3 Manifestacións clínicas**

As manifestacións clínicas máis frecuentes no grupo de LEI foron as manifestacións hematolóxicas, a artrite, as aftas orais e a fotosensibilidade. No grupo de LES, as manifestacións inmunolóxicas (presenza de anticorpos anti-ADN e/ou anti-Sm) foron as máis frecuentes, seguidas das hematolóxicas, artrite, fotosensibilidade, erupción malar e aftas orais. En xeral, como era esperable, tódalas manifestacións clínicas reflectidas nos criterios de clasificación da enfermidade foron máis frecuentes no grupo de LES ca no grupo de LEI.

#### **4.4.3.1 Manifestacións muco-cutáneas**

En conxunto, os criterios de afectación cutánea foron significativamente máis frecuentes nos pacientes con LES ca nos pacientes con LEI (Figura 18 e táboa 12).



**Figura 18. Manifestacións mucocutáneas en LEI e LES.**

En conxunto, as manifestacións mucocutáneas son as máis frecuentes en ambos grupos de pacientes. As diferenzas principais entre LEI e LES están na presenza de eritema malar ( $p$  0,0001) e fotosensibilidade ( $p$  0,0054).

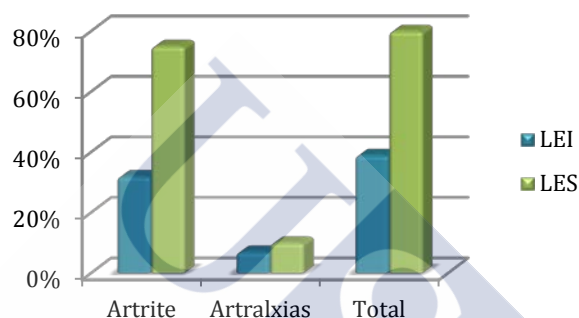
Valoradas individualmente, só acadaron significación estatística as diferenzas na frecuencia de fotosensibilidade e de erupción malar.

**Táboa 12.** Manifestacións mucocutáneas en LEI e LES

	LEI n=41 (%)	LES n=60 (%)	p	OR (IC 95%)
<b>Erupción malar</b>	2 (5)	27 (45)	0,0001	15,95 (3,53-72,17)
<b>Lupus discoide</b>	3 (7)	5 (8)	ns	
<b>Fotosensibilidade</b>	10 (24)	31 (52)	0,0054	3,31 (1,38-7,94)
<b>Aftas orais</b>	11 (27)	27 (45)	ns	
<b>Total Cutáneas</b>	<b>21 (51)</b>	<b>48 (80)</b>	<b>0,0023</b>	<b>3,81 (1,58-9,19)</b>

#### 4.4.3.2 Manifestacións articulares

Malia que a artrite é unha das manifestacións máis frecuentes entre os pacientes con LEI, só un terzo deles a presentaban. Tamén se valorou a presenza de artralxias naqueles pacientes que non presentaban artrite (Figura 19).



**Figura 19. Manifestacións articulares no LEI e no LES.** Malia que a artrite é unha das manifestacións máis frecuentes nos pacientes con LEI, a frecuencia observada no grupo de LES foi o dobre da observada entre os pacientes con LEI (p 0,0001).

A frecuencia de artrite tamén foi maior entre os pacientes con LES ca entre os pacientes con LEI (Táboa 13).

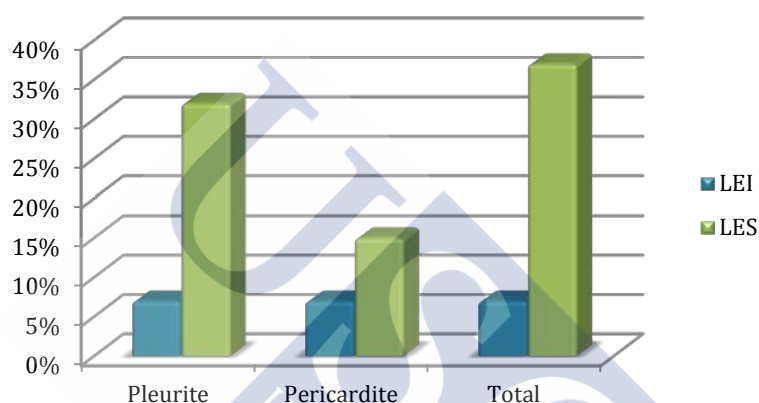
**Táboa 13.** Manifestacións articulares en LEI e LES

	LEI n=41 (%)	LES n=60 (%)	p	OR (IC 95%)
<b>Artrite</b>	13 (32)	45 (75)	0,000	6,46 (2,68-15,78)
			1	
<b>Artralxias*</b>	3 (7)	6 (10)	ns	
<b>Total Articulares</b>	16 (39)	51 (85)	ns	

\*Artralxias SEN artrite (% sobre o total de pacientes)

#### 4.4.3.3 Serosite

Dos 22 pacientes con LES que presentaron serosite, 6 sufriron tanto pleurite coma pericardite, de xeito simultáneo ou non, e o resto só presentaron unha das afectacións. No grupo de LEI, os tres pacientes afectados de serosite presentaron afectación pleural e pericárdica (Figura 20).



**Figura 20. Serosite en LEI e LES.** A pleurite e a pericardite foron máis frecuentes no grupo de LES, pero só a pleurite mostrou unha diferenza estatisticamente significativa (p 0,0021).

Só a diferenza na frecuencia de pleurite acadou significación estatística entre grupos. (Táboa 14).

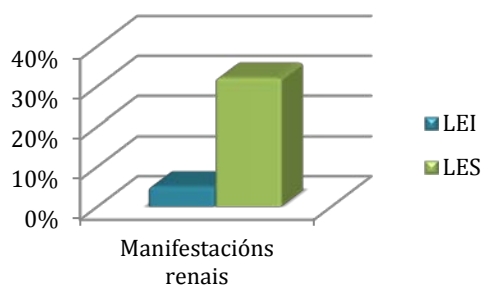
**Táboa 14.** Serosite en LEI e LES

	LEI n=41 (%)	LES n=60 (%)	p	OR (IC 95%)
<b>Pleurite</b>	3 (7)	19 (32)	0,0021	5,87 (1,60-21,43)
<b>Pericardite</b>	3 (7)	9 (15)	ns	
<b>Total Serosites</b>	<b>3 (7)</b>	<b>22 (37)</b>	<b>0,0004</b>	<b>7,33 (2,02-26,57)</b>

#### 4.4.3.4 Manifestacións renais

Dos 21 pacientes con afectación renal só se fixo biopsia en 16, todos eles con LES. Unha das biopsias non foi concluínte porque a mostra era insuficiente. Das 15 restantes, unha foi mesanxial mínima (tipo I), outra proliferativa mesanxial (tipo II), unha focal segmentaria (tipo III), 11 proliferativas difusas (tipo IV) e unha membranosa (tipo V).

Os dous pacientes con LEI e manifestacións renais non necesitaron tratamento a maiores de corticoides e hidroxicloquina, e a súa función renal no momento do estudo era normal. Dada a boa evolución en ausencia de tratamento específico, é probable que as alteracións renais que presentaron estes pacientes (alteración do sedimento urinario e/ou proteinuria) fosen doutra causa e non por nefropatía lúpica. De calquera xeito, dado que a recolleita de datos se realizou de forma retrospectiva, considerouse que cumprían criterio de afectación renal xa que o clínico responsable así o recollía na historia clínica.



**Figura 21. Manifestacións renais en LEI e LES.** Só dous dos pacientes do grupo de LEI mostraron alteracións renais (alteración do sedimento urinario e/o proteinuria), mentres que no grupo de LES estaban presentes nun terzo dos pacientes (p 0,0004).

Entre os pacientes con LEI a presenza de manifestacións renais foi menor ca entre os pacientes con LES, cunha OR de 9,04 (Figura 21 e táboa 15).

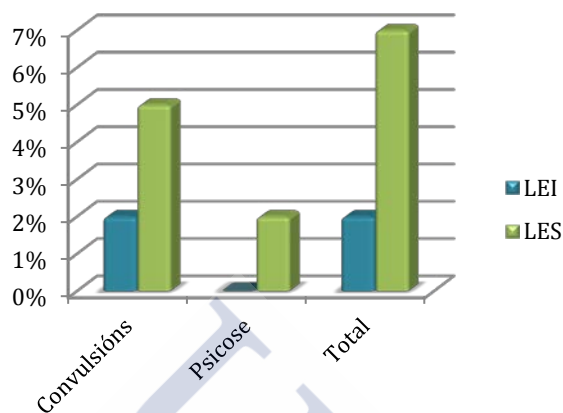
**Táboa 15.** Manifestacións renais en LEI e LES

	LEI n=41 (%)	LES n=60 (%)	p	OR (IC 95%)
<b>Manifestacións renais</b>	2 (5)	19 (32)	0,0004	9,04 (1,97-41,38)

#### 4.4.3.5 Manifestacións neurolóxicas

A frecuencia de afectación neurolóxica, establecida en función dos criterios neurolóxicos de lupus (convulsións e/ou psicose) foi baixa en ambos grupos, aínda que cómpre destacar que unha paciente no grupo de LEI presentou convulsións (Figura 22). Esta enferma presentaba ademais afectación hematolóxica, con trombopenia e leucopenia, ademais de ANA. Realizouse RM cerebral na que non se apreciaban alteracións e os anticorpos

antifosfolípido foron negativos. Dado que non se atopou outra causa das crises comiciais, o cadro foi atribuído ó lupus.



**Figura 22. Manifestacións neurolóxicas en LEI e LES.** O número de pacientes afectados foi moi baixo, polo que malia de seren máis frecuentes no grupo de LES non se demostraron diferenzas significativas.

No estudo comparativo non se detectaron diferenzas entre ambos grupos de pacientes (Táboa 16).

**Táboa 16.** Manifestacións neurolóxicas en LEI e LES

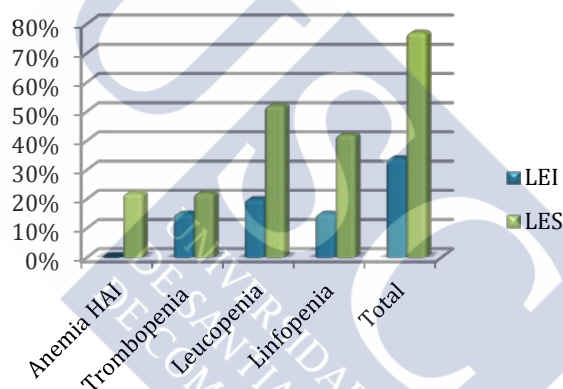
	LEI n=41 (%)	LES n=60 (%)	p
<b>Convulsións</b>	1 (2)	3 (5)	ns
<b>Psicose</b>	0	1 (2)	ns
<b>Total Neurolóxicas</b>	<b>1 (2)</b>	<b>4 (7)</b>	<b>ns</b>



#### 4.4.3.6 Manifestacións hematolóxicas

Das 14 pacientes do grupo de LEI con manifestacións hematolóxicas, 8 só presentaban unha alteración, mentres que o resto presentaban dúas.

No grupo de LES, unha paciente recibiu Rituximab, outra IgIV e outra Rituximab e IgIV polas alteracións hematolóxicas, fundamentalmente trombopenia. O resto de pacientes foron adecuadamente controladas con corticoides e/ou hidroxiclороquina.



**Figura 23. Manifestacións hematolóxicas en LEI e LES.** Tódalas alteracións hematolóxicas foron máis frecuentes nos pacientes con LES ca no grupo de LEI, e esa diferenza foi estatisticamente significativa en tódolos casos agás na trombopenia.

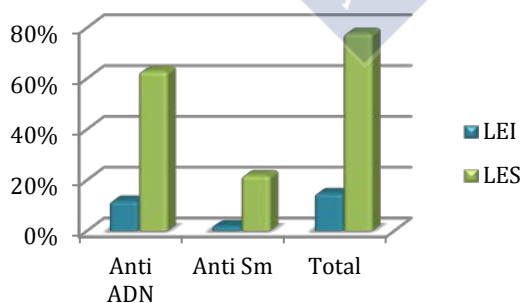
En conxunto, as manifestacións hematolóxicas foron máis frecuentes nos pacientes con LES, e detectáronse diferenzas en tódalas alteracións hematolóxicas agás na trombopenia (Figura 23 e táboa 17).

Táboa 17. Manifestacións hematolóxicas en LEI e LES

	LEI n=41 (%)	LES n=60 (%)	p	OR (IC 95%)
<b>Anemia HAI</b>	0	13 (22)	0,0001	-
<b>Trombopenia</b>	6 (15)	13 (22)	ns	
<b>Leucopenia</b>	8 (20)	31 (52)	0,0008	4,41 (1,75-11,10)
<b>Linfopenia</b>	6 (15)	25 (42)	0,0028	4,17 (1,52-11,40)
<b>Total hematolóxicas</b>	<b>14 (34)</b>	<b>46 (77)</b>	<b>0,0001</b>	<b>6,34 (2,63-15,28)</b>

#### 4.4.3.7 Manifestacións inmunolóxicas

Entre as pacientes con LEI había 5 con determinacións positivas para anticorpos anti-ADN nalgún momento da enfermidade (Figura 24). Nestas pacientes, os anticorpos anti-ADN e ANA ían acompañados de trombopenia e leucopenia en dous casos, artraxias nun caso, lupus discoide noutro e artrite no restante. A paciente con anticorpos anti Sm presentaba unicamente criterios inmunolóxicos.



**Figura 24. Manifestacións inmunolóxicas en LEI e LES.** A presenza de autoanticorpos anti-DNA e anti-Sm foron significativamente máis frecuentes no grupo de LES ca no de LEI (p 0,0001 para anti-DNA e p 0,0025 para anti-Sm).

As diferenzas no conxunto de manifestacións inmunolóxicas foron claras, cunha OR de 21,09 (Táboa 18). Por separado, a frecuencia dos autoanticorpos anti-ADN e anti-Sm, tamén amosaron diferenzas significativas.

**Táboa 18.** Manifestacións inmunolóxicas en LEI e LES

	LEI n=41 (%)	LES n=60 (%)	p	OR (IC 95%)
<b>Anti ADN</b>	5 (12)	38 (63)	0,0001	12,44 (4,25-36,36)
<b>Anti Sm</b>	1 (2)	13 (22)	0,0025	11,06 (1,39-88,31)
<b>Total Inmunolóxicas</b>	6 (15)	47 (78)	0,0001	21,09 (7,29-60,98)

Polo deseño do estudo, o 100% dos pacientes en ámbolos dous grupos presentaban ANA positivos.



**Figura 25. Outros autoanticorpos en LEI e LES.** Os autoanticorpos asociados a LES que non forman parte dos criterios de clasificación de LES tamén foron máis frecuentes entre os pacientes con LES ca entre os pacientes con LEI, aínda que só a diferenza de frecuencia de anti-RNP acadou significación estatística (p 0,02).

Entre os outros autoanticorpos estudados (aqueles que non forman parte dos criterios de clasificación), só o anticorpo anti-RNP foi significativamente máis frecuente nos pacientes con LES (Figura 25 e táboa 19).

**Táboa 19.** Outros autoanticorpos en LEI e LES

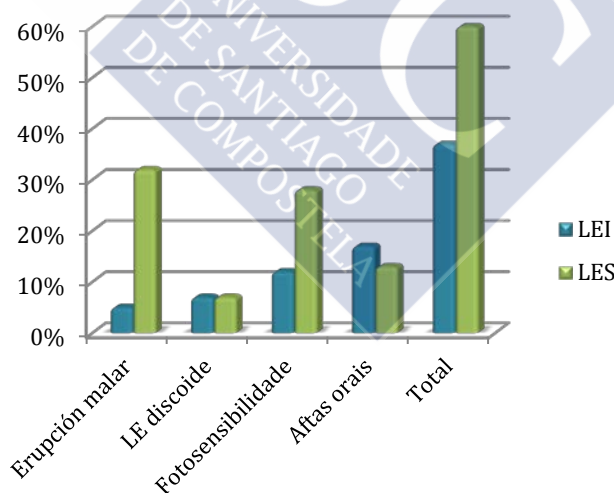
	LEI n=41 (%)	LES n=60 (%)	p	OR (IC 95%)
<b>Anti RNP</b>	1 (2)	10 (17)	0,02	8,16 (1,00-66,50)
<b>Anti SSA</b>	8 (20)	22 (37)	ns	
<b>Anti SSB</b>	3 (7)	9 (15)	ns	



#### 4.4.4 Manifestacións de inicio

Como primeira manifestación tanto no grupo de LEI como no de LES, sacando a presenza de ANA, as máis frecuentes foron a artrite e as alteracións hematolóxicas, das que no grupo de LEI a máis frecuente foi a trombopenia e no grupo de LES foron a anemia e a leucopenia.

Se se valoran en conxunto, as manifestacións mucocutáneas foron as máis frecuentes ó comezo da enfermidade nos dous grupos. Dentro delas, as máis frecuentes nos pacientes con LES foron a erupción malar e a fotosensibilidade, mentres que nos pacientes con LEI foron as aftas orais (Figura 26).



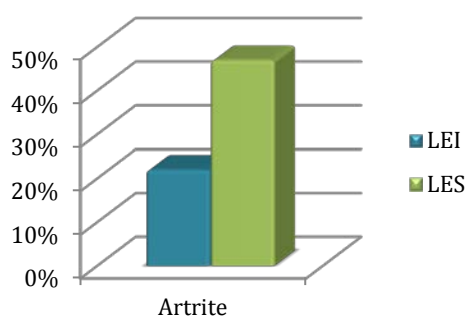
**Figura 26. Manifestacións mucocutáneas como 1ª manifestación de lupus en LEI e LES.** La presenza de aftas orais ó inicio da enfermidade foi a única manifestación mucocutánea máis frecuente entre os pacientes con LEI ca entre os LES. As únicas manifestacións que mostraron diferenzas significativas entre grupos foron a erupción malar ( $p$  0,0004) e a fotosensibilidade ( $p$  0,0471).

Só as diferenzas na frecuencia de erupción malar e fotosensibilidade acadaron significación estatística (Táboa 20).

**Táboa 20.** Manifestacións mucocutáneas como primeira manifestación en LEI e LES

	LEI n=41	LES n=60 (%)	P	OR (IC 95%)
<b>Erupción malar</b>	2 (5)	19 (32)	0,0004	9,04 (1,97-41,38)
<b>LE discoide</b>	3 (7)	4 (7)	ns	
<b>Fotosensibilidade</b>	5 (12)	17 (28)	0,0471	2,85 (0,96-8,47)
<b>Aftas orais</b>	7 (17)	8 (13)	ns	
<b>Total mucocutáneas</b>	15 (37)	36 (60)	0,020	2,6 (1,15-5,9)

No tocante ás manifestacións articulares, as artralxias non puideron ser valoradas como primeira manifestación porque só se recolleu o dato de artralxias en calquera momento da enfermidade.



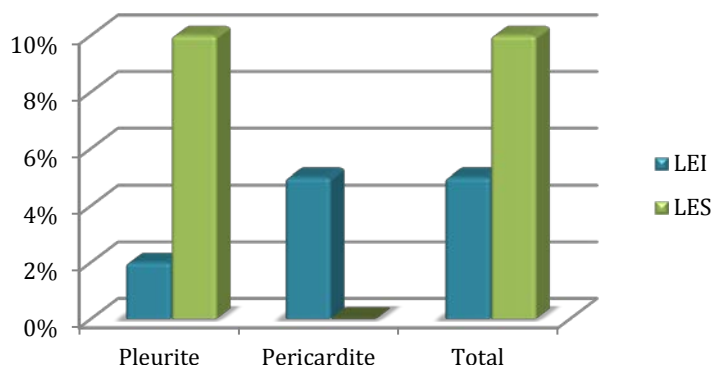
**Figura 27. Artrite como 1ª manifestación de lupus en LEI e LES.** A artrite ó inicio da enfermidade foi significativamente máis frecuente entre os pacientes con LES ca no grupo de LEI.

A artrite foi máis frecuente entre os pacientes con LES ó inicio da enfermidade (Figura 27 e táboa 21).

**Táboa 21.** Artrite como primeira manifestación en LEI e LES

	LEI n=41 (%)	LES n=60 (%)	p	OR (IC 95%)
<b>Artrite</b>	9 (22)	28 (47)	0,010	3,11 (1,27-7,63)

As serosites foron pouco frecuentes como manifestacións de inicio (Táboa 22), aparecendo na maioría dos casos durante a evolución clínica.



**Figura 28. Serosite como 1ª manifestación de lupus en LEI e LES.** As serosites foron pouco frecuentes en ambos grupos e non se demostraron diferenzas significativas entre LEI e LES ó inicio da enfermidade.

No grupo de pacientes con LES non houbo ningún caso de pericardite (Figura 28), e non se detectaron diferenzas significativas entre grupos.

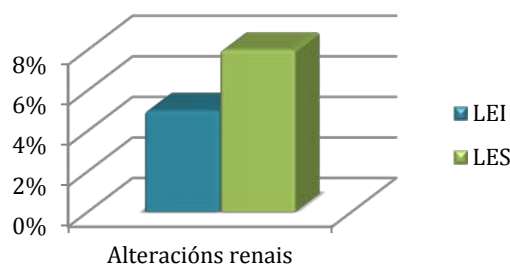
**Táboa 22.** Serosite como primeira manifestación en LEI e LES

	LEI n=41 (%)	LES n=60 (%)	p
<b>Pleurite</b>	1 (2)	6 (10)	ns
<b>Pericardite</b>	2 (5)	0	ns
<b>Total serosite</b>	2 (5)	6 (10)	ns

As alteracións renais e do SNC foron incluso menos frecuentes cás serosites como primeira manifestación da enfermidade (Figuras 29 e 30).

Entre os pacientes con LES aproximadamente un 25% dos casos de nefropatía ocorreron ó inicio da enfermidade. No grupo de LEI os dous únicos pacientes que presentaron alteracións renais fixérono tamén ó inicio da enfermidade.





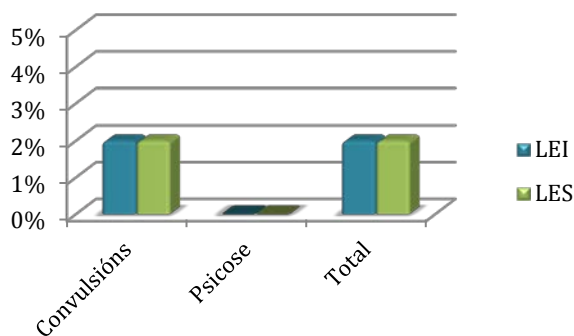
**Figura 29. Alteracións renais como 1ª manifestación de lupus en LEI e LES.** Os dous únicos pacientes que presentaron alteracións renais no grupo de LEI fixérono ó comezo do cadro. No grupo de LES, un 25% dos pacientes con alteración renal presentárona como primeira manifestación. Non se demostraron diferenzas significativas entre grupos na frecuencia de alteracións renais ó comezo do cadro.

Non se demostraron diferenzas entre LEI e LES na presenza de alteracións renais ó comezo da enfermidade (Táboa 23).

**Táboa 23.** Alteracións renais como primeira manifestación en LEI e LES

	LEI n=41 (%)	LES n=60 (%)	p
<b>Manifestacións renais</b>	2 (5)	5 (8)	ns

Só houbo dous casos de afectación neurolóxica ó comezo da enfermidade, e ambos foron episodios de convulsións (Figura 30).



**Figura 30. Manifestacións neurolóxicas como 1ª manifestación de lupus en LEI e LES.** Un único paciente en cada grupo presentou convulsións ó comezo do cadro que foron atribuídas ó lupus. Non se demostraron diferenzas significativas entre grupos.

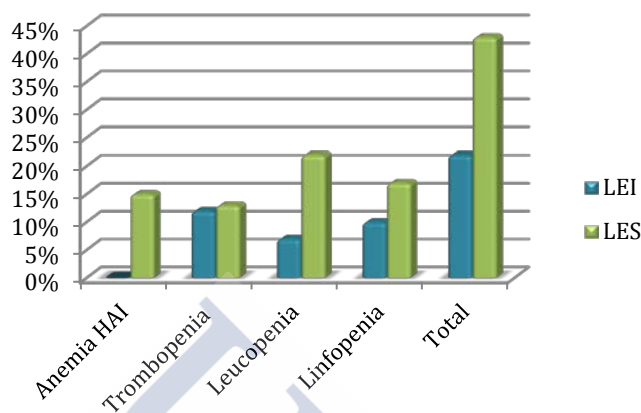
Non houbo ningún caso de psicose nin no grupo de LES nin no grupo de LEI. Coma nos casos de nefropatía, o único paciente con LEI con alteracións neurolóxicas presentounas ó comezo da enfermidade. Non se demostraron diferenzas entre grupos ( $p$  0,786) (Táboa 24).

**Táboa 24.** Manifestacións neurolóxicas como primeira manifestación en LEI e LES

	LEI n=41 (%)	LES n=60 (%)	p
<b>Convulsións</b>	1 (2)	1 (2)	ns
<b>Psicose</b>	0	0	ns
<b>Total neurolóxicas</b>	<b>1 (2)</b>	<b>1 (2)</b>	<b>ns</b>

As manifestacións hematolóxicas foron frecuentes ó comezo da enfermidade tanto no grupo de LEI como no de LES (Figura 31). Entre os pacientes con

LEI, había fundamentalmente casos de trombopenia e linfopenia, e entre os pacientes con LES eran máis frecuentes a leucopenia e a linfopenia.



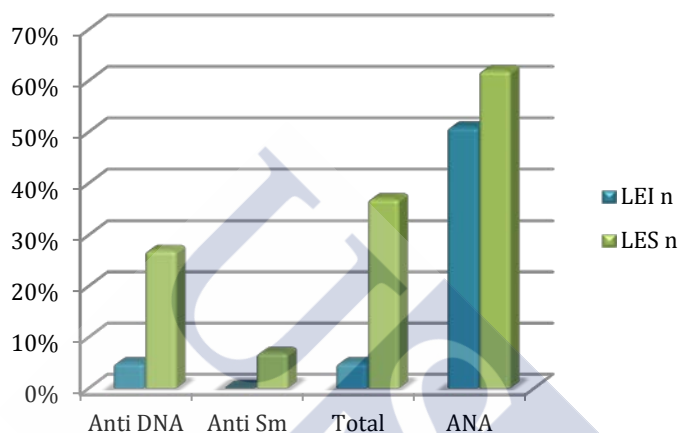
**Figura 31. Manifestacións hematolóxicas como 1ª manifestación de lupus en LEI e LES.** Aínda que tódalas alteracións hematolóxicas foron máis frecuentes entre os pacientes con LES ó inicio da enfermidade, só a anemia hemolítica autoinmune e a leucopenia mostraron diferenzas significativas co grupo de LEI (p 0,0071 e p 0,043 respectivamente).

En conxunto, as manifestacións hematolóxicas son significativamente máis frecuentes nos pacientes con LES, do mesmo xeito que a anemia HAI e a leucopenia (Táboa 25).

**Táboa 25.** Manifestacións hematolóxicas como primeira manifestación en LEI e LES

	LEI n=41 (%)	LES n=60 (%)	p	OR (IC 95%)
<b>Anemia HAI</b>	0	9 (15)	0,0071	-
<b>Trombopenia</b>	5 (12)	8 (13)	ns	
<b>Leucopenia</b>	3 (7)	13 (22)	0,043	3,5 (0,93-13,20)
<b>Linfopenia</b>	4 (10)	10 (17)	ns	
<b>Total Hematolóxicas</b>	9 (22)	26 (43)	0,0242	2,72 (1,11-6,68)

Para rematar, as manifestacións inmunolóxicas, sen contar a presenza de ANA, foron pouco frecuentes no grupo de pacientes con LEI. En cambio, máis dun terzo dos pacientes con LES presentaba estas alteracións ó comezo da enfermidade (Figura 32).



**Figura 32. Manifestacións inmunolóxicas como 1ª manifestación de lupus en LEI e LES.** Só a diferenza na presenza de autoanticorpos anti-DNA ó inicio da enfermidade foi estatisticamente significativa ( $p$  0,0026).

As diferenzas na presenza de anticorpos anti-ADN son significativas, pero non é así para os anticorpos anti-Sm (Táboa 26). A presenza doutros autoanticorpos ó comezo da enfermidade non puido ser analizada xa que este dato non se recolleu de forma cronolóxica.

**Táboa 26.** Manifestacións inmunolóxicas como primeira manifestación de LEI e LES

	LEI n=41 (%)	LES n=60 (%)	P	OR (IC 95%)
<b>Anti ADN</b>	2 (5)	16 (27)	0,0026	7,09 (1,53-32,8)
<b>Anti Sm</b>	0	4 (7)		
<b>Total Inmunolóxicas</b>	2 (5)	22 (37)	0,0001	11,29 (2,48-51,36)
<b>ANA</b>	21 (51)	37 (62)		

#### 4.4.5 Estudio de regresión loxística das manifestacións clínicas

Tralo estudo bivariado realizouse unha análise de regresión loxística binaria.

En primeiro lugar analizáronse as manifestacións clínicas ó longo da enfermidade nos grupos de LEI e de LES. As diferenzas clínicas que mantiveron significación estatística son as amosadas na táboa 27.

**Táboa 27.** Regresión loxística binaria: Manifestacións clínicas en LEI e LES

	p	OR	IC 95%
<b>Erupción malar</b>	0,001	1168,896	17,309-78938,900
<b>Fotosensibilidade</b>	0,009	158,516	3,593-6993,027
<b>Artrite</b>	0,004	91,449	4,309-1940,863
<b>Pleurite</b>	0,002	1585,145	13,602-184731,357
<b>Leucopenia</b>	0,015	97,468	2,409-3943,977
<b>Linfopenia</b>	0,018	21,269	1,690-267,644
<b>Anti-ADN</b>	0,005	127,433	4,418-3675,293

Ó analizar as manifestacións de inicio da enfermidade en ambos grupos, vemos que só a erupción malar e a artrite mantiveron a significación estatística (Táboa 28).

**Táboa 28.** Regresión loxística: Características de inicio en LEI e LES

	<b>p</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
<b>Erupción malar inicio</b>	0,003	10,779	2,279-50,975
<b>Artrite inicio</b>	0,006	3,726	1,447-9,597



## 4.5 Estudio da Frecuencia de Alelos HLA DRB1 por Manifestacións Clínicas

Realizouse en primeiro lugar un estudo bivariado para avaliar a relación entre as diferentes manifestacións clínicas do lupus e os alelos HLA DRB1. Para iso incluíronse os 101 pacientes con lupus (LEI e LES) do estudo. Nalgúns casos houbo asociación de alelos HLA DRB1 coa presenza de características clínicas (Táboa 29) e noutros coa ausencia (Táboa 30).

**Táboa 29.** Asociacións positivas de alelos HLA DRB1 con manifestacións clínicas de lupus

DRB1	Manifestación clínica	P
<b>*04</b>	Aftas orais	0,031
	Lupus discoide	0,006
<b>*15</b>	Erupción malar	0,031
	Aftas orais	0,023
<b>*01</b>	Anemia HAI	0,015
	Serosite	0,039

Posteriormente realizouse o estudo de regresión loxística binaria. Neste estudo multivariado mantivéronse tódalas asociacións agás a do alelo HLA DRB1\*13 coas aftas orais. Ademais mostrou asociación entre o alelo HLA DRB1\*12 e o lupus discoide (Táboa 31).

**Táboa 30.** Asociacións negativas de alelos HLA DRB1 con manifestacións clínicas de lupus

<b>DRB1</b>	<b>Manifestación clínica</b>	<b>P</b>
<b>*04</b>	Artrite	0,016
<b>*13</b>	Aftas orais	0,017

**Táboa 31.** Regresión loxística binaria: Alelos HLA DRB1 segundo manifestacións clínicas

<b>DRB1</b>	<b>Manifestación clínica</b>	<b>P</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
<b>*01</b>	Anemia HAI	0,022	9,052	1,378-59,440
	Serosite	0,009	11,440	1,83-71,494
<b>*04</b>	Lupus discoide	0,003	10,625	2,224-50,765
	Aftas orais	0,017	6,475	1,388-30,206
	Artrite	0,023	0,168	0,036-0,779
<b>*12</b>	Lupus discoide	0,020	118,72	2,120-6648,92
<b>*15</b>	Aftas orais	0,038	4,637	1,087-19,779
	Eritema malar	0,028	5,544	1,204-25,538



## 4.6 Estudio da Frecuencia dos Alelos HLA DRB1 por Autoanticorpos

Analizando a presenza dos diferentes autoanticorpos segundo os alelos HLA DRB1, atopamos asociación entre o anticorpo anti-ADN e o alelo HLA DRB1\*16 (p 0,0122). Ademais demostrouse asociación positiva do anticorpo anti-SSA co alelo HLA DRB1\*15 (p 0,0289) e asociación negativa co alelo HLA DRB1\*11 (p 0,0179). Así mesmo, o anticorpo anti-SSB asociouse ó alelo HLA DRB1\*03 (p 0,0272) (Táboa 32).

**Táboa 32.** Asociación entre alelos HLA DRB1 e autoanticorpos relacionados co lupus

Autoanticorpos	Alelos asociados	p
Anti ADN	*16	0,012
Anti Sm	Ningún	
Anti SSA	*15	0,029
	*11	0,011
Anti SSB	*03	0,015
Anti RNP	Ningún	

Ó realizar o estudio multivariado, só a asociación do anti-SSA co alelo HLA DRB1\*11 mantivo a significación estatística (Táboa 33).

**Táboa 33.** Regresión loxística: Asociación de autoanticorpos e alelos HLA DRB1 en LEI e LES

	p	OR	IC 95%
Anti-SSA/DRB1*11	0,024	0,074	0,008-0,713





## **5. DISCUSIÓN**



O lupus eritematoso incompleto (LEI) é unha entidade pouco estudada, aínda que relativamente frecuente na práctica clínica [104]. A introdución dos criterios de clasificación do LES supuxo un avance á hora de homoxeneizar grupos de pacientes, aínda sabendo que algúns casos podían quedar fóra. A sensibilidade dos criterios propostos polo ACR rolda o 90% (entre o 72 e o 97% segundo os diferentes estudos [125-130]), e o seu uso para o diagnóstico da enfermidade deu lugar a un grupo de pacientes que, malia ter datos claros de enfermidade, non entraban na definición. De aí a necesidade de agrupalos baixo outra denominación como a de LEI [101, 102]

## 5.1 Definición de LEI

Como se comentou anteriormente, as definicións de LEI presentes na literatura son moi variadas. Neste traballo utilizamos a nosa propia definición, que recolle os elementos das anteriores que a fan máis rigorosa, concreta e homoxénea.

Consideramos que, ademais da presenza de menos de 4 criterios de clasificación de LES, a definición de LEI debe incluír tres puntos fundamentais:

- Presenza de ANA
- Exclusión doutras enfermidades autoinmunes
- Período de seguimento previo á inclusión de polo menos 2 anos

Do mesmo xeito que Swaak *et al.* [101], na nosa definición de LEI incluímos como necesaria a positividade dos ANA, presentes en máis do 99% dos pacientes con LES [131]. Co fin de diminuír ó máximo a posibilidade de falsos positivos, no noso estudo, e a diferenza da definición de Swaak *et al.* [101] na que non especificaban ningún título de ANA, estableceuse un título de corte para os ANA de 1/160, que ten unha sensibilidade e unha especificidade do 95% para o LES [132].

Doutra banda, se se inclúsen os pacientes cun só criterio de clasificación, aínda que ese fose a presenza de ANA, aumentaría o risco de incluír falsos positivos, xa que ata un 5% dos individuos con ANA a título 1/160 poden ser considerados sans. Por iso acordamos que para a súa inclusión no grupo de LEI os pacientes deberían ter polo menos dous criterios de LES.

Consideramos necesario descartar outras enfermidades autoinmunes que poidan compartir características clínicas e inmunolóxicas co LES, polo que a presenza de criterios definitivos doutras enfermidades sería suficiente para excluír un paciente.

Para rematar, por mor de que en moitos casos o LES é unha enfermidade que se desenvolve de xeito gradual, indistinguible do LEI mentres non presenta polo menos catro criterios, debemos engadir á definición un período de tempo previo á inclusión suficiente para que aqueles que finalmente van ser LES poidan desenvolver a enfermidade. Con este fin escollemos un período

de 2 anos dende o comezo da enfermidade en base a estudos previos, que mostraban que ese era o tempo medio de desenvolvemento de LES naqueles pacientes que se presentaban con menos de catro criterios [81, 133].

Na nosa serie, o 57% dos pacientes do grupo de LES tiveron unha evolución gradual, é dicir, iniciaron a enfermidade con menos de 4 criterios. Pero despois de 5 anos máis do 75% de todos os LES presentaban enfermidade definida. Así que un seguimento previo de 5 anos, coma no estudo de Ganczarczyk *et al.* [97], reduciría aínda máis a probabilidade de que un paciente con LEI puidese finalmente desenvolver LES, e que polo tanto fose mal clasificado ó incluílo no estudo, xerando dese xeito un sesgo na análise xenética.

Con todo, no presente estudo, ó analizar o tempo de seguimento na consulta dende o inicio dos síntomas, comprobamos que o 68% dos pacientes con LEI da nosa serie tiñan un tempo de seguimento previo á inclusión maior de 5 anos, polo que a probabilidade de que estes pacientes acaben desenvolvendo LES debería ser moi baixa.

A nosa experiencia clínica e a doutros autores [81, 96-103] suxire que efectivamente existe un grupo de pacientes clínica e inmunoloxicamente semellantes ó LES pero con menos de catro criterios de clasificación que, pola súa dotación xenética ou outros factores que de momento se descoñecen, nunca desenvolverán LES; ou que se chegasen a cumprir criterios de

enfermidade definida, a súa gravidade clínica sería moito menor cá que padecen os pacientes con LES que teñen un inicio máis explosivo.





## 5.2 Estudo da Frecuencia dos Alelos HLA DRB1 no Lupus

### 5.2.1 LES en relación con controis sans

Os alelos HLA DRB1 foron estudados en múltiples poboacións de LES. Do mesmo xeito que a distribución dos alelos HLA varía dunha poboación a outra, as asociacións atopadas entre devanditos alelos e o LES varían dependendo da orixe étnica da poboación estudada [61]. As asociacións máis consistentes co LES atopáronse nos alelos HLA DRB1\*03 e HLA DRB1\*15, e en menor medida no HLA DRB1\*08 [134]. Estes tres alelos son considerados alelos de risco para o desenvolvemento de LES, cunhas OR de 2.2 a 3 no caso do HLA DRB1\*03 e de 1.6 para o HLA DRB1\*15 e o DRB1\*08 [67, 77].

Do mesmo xeito que se atoparon alelos máis frecuentes, tamén se viu que hai alelos que son menos frecuentes nos pacientes con lupus ca nos controis sans, como son o HLA DRB1\*01, o DRB1\*04 e o DRB1\*11 [67, 135, 136], considerados protectores fronte ó desenvolvemento do LES.

Os traballos realizados en poboacións, étnica e xeograficamente, máis próximas a nós serían os de Europa e os da península ibérica [67, 137-139]. Estes estudos, do mesmo xeito que os realizados noutras áreas xeográficas, amosaron unha maior frecuencia do alelo HLA DRB1\*03 en pacientes con LES en comparación cos controis sans. O alelo HLA DRB1\*15 tamén foi máis frecuente entre os pacientes con LES ca entre os controis, pero só nun dos

traballos a diferenza foi estatisticamente significativa [67]. En cambio o alelo HLA DRB1\*08 non se asociou ó LES en ningún dos estudos anteriormente citados.

En canto ós alelos protectores, dos estudos realizados na nosa contorna, só o multicéntrico europeo de Galeazzi *et al.* demostrou asociación negativa dos alelos HLA DRB1\*01, DRB1\*04 e DRB1\*11 [67].

Na nosa serie comprobouse a asociación do alelo HLA DRB1\*03 co LES, xa que foi significativamente máis frecuente neste grupo que entre a poboación sa. O alelo HLA DRB1\*15, malia ser máis frecuente no grupo de LES ca no de controis sans, non demostrou diferenzas significativas. En cambio o alelo HLA DRB1\*08 presentou a mesma frecuencia en ambos grupos. Este patrón de distribución dos alelos HLA DRB1 no LES é concordante co descrito na literatura e coincide exactamente cos datos do estudo de Sánchez *et al.*, realizado en poboación española [139].

Os outros dous alelos que se asociaron ó LES na nosa serie son o HLA DRB1\*11 e o DRB1\*01. Ambos alelos son considerados protectores fronte ó LES e, do mesmo xeito que na literatura, tamén na nosa serie foron significativamente menos frecuentes no grupo de LES ca no grupo de controis sans.

Polo tanto, a nosa poboación axústase ó descrito na literatura, cunha maior frecuencia do alelo HLA DRB1\*03, que é o alelo HLA DRB1 que se asociou de

xeito máis consistente ó LES [134], e menor dos alelos HLA DRB1\*01 e DRB1\*11, considerados protectores fronte a LES [67].



### 5.2.2 Alelos HLA DRB1 no LEI

Así coma nos pacientes con LES se realizaron múltiples estudos xenéticos que estableceron a maior frecuencia dalgúns alelos HLA DRB1, nos pacientes con LEI ocorre todo o contrario.

Ata a data só se publicou un traballo que estude a rexión HLA nos pacientes con LEI. Neste traballo [97], realizado nunha poboación canadense e publicado en 1989, estudouse a frecuencia de diferentes antíxenos HLA en 15 pacientes con LEI, comparándoos con pacientes diagnosticados de LES e cun grupo de controis sans. Os autores atoparon nunha maior frecuencia do antíxeno DR3 (correspondente ó alelo DRB1\*03 [140]) tanto en pacientes con LES coma con LEI ó comparalos con controis sans. Á vez atoparon unha frecuencia diminuída do antíxeno DR1 (correspondente ó alelo DRB1\*01) nos pacientes clasificados como LEI que posteriormente desenvolveron LES.

Este estudo presentaba dúas limitacións fundamentais: contaba con moi poucos pacientes e utilizaba técnicas serolóxicas, moito menos precisas que as actuais técnicas de tipado xenético por PCR. Malia que estes achados orientaban cara á existencia de diferenzas xenéticas entre os pacientes con LEI e os pacientes con LES, en todos estes anos non houbo ningún outro intento de caracterizar os alelos HLA DRB1 nos pacientes con LEI.

### 5.2.3 LEI en relación con controis sans

Do mesmo xeito có observado no grupo de LES, os pacientes con LEI presentaron unha maior frecuencia do alelo HLA DRB1\*03 cós controis sans. Así mesmo o alelo protector HLA DRB1\*01 foi menos frecuente entre os pacientes con LEI ca na poboación sa.

A menor frecuencia do alelo HLA DRB1\*11 observada no grupo de LES non ocorreu entre os pacientes con LEI, que presentaron unha frecuencia semellante á dos controis sans.

Doutra banda, o alelo HLA DRB1\*16 foi menos frecuente entre os pacientes con LEI ca entre os controis. Este alelo asociouse positivamente ó LES, fundamentalmente en poboacións de raza negra e en poboacións asiáticas [141], aínda que tamén nalgúns estudos de pacientes caucásicos [67, 142]. A asociación do alelo HLA DRB1\*16 co lupus non é tan constante coma a dos alelos DRB1\*03, DRB1\*15 ou DRB1\*08, e ademais adoita ser máis débil cás asociacións atopadas cos alelos anteriormente citados. A ausencia deste alelo entre os nosos pacientes con LEI pode contribuír a atenuar a agresividade do quadro clínico, xa que a súa presenza se asociou co desenvolvemento de afectación renal, lupus discoide e linfadenopatías [67, 143].

## 5.2.4 Diferenzas de alelos HLA DRB1 entre pacientes con LEI e pacientes con LES

Aínda que fronte ó grupo de controis sans o grupo de LEI e de LES presentaban unha distribución de alelos HLA DRB1 similar, ó comparalos entre eles atopamos diferenzas significativas en dous alelos: en primeiro lugar, o alelo HLA DRB1\*15 é menos frecuente no grupo de LEI ca no de LES, e en segundo lugar unha maior frecuencia do HLA DRB1\*11 no grupo de LEI ca no de LES.

A asociación de devanditos alelos co LES xa foi previamente descrita na literatura.

- O alelo HLA DRB1\*15 está considerado como un alelo de risco, xa que se comunicou que a súa presenza é maior nos pacientes con LES [67]. No noso estudo atopamos que este alelo é significativamente menos frecuente entre os pacientes con LEI ca nos pacientes con LES, o que podería contribuír a que os LEI non desenvolvan LES.
- O alelo HLA DRB1\*11 compórtase de forma contraria ó anterior. A presenza deste alelo é considerada protectora, xa que se detectadou con menor frecuencia entre os pacientes con LES ca na poboación xeral [67]. Na nosa serie a frecuencia deste alelo foi significativamente maior entre os pacientes con LEI ca entre os pacientes con LES. Polo tanto, a maior presenza deste alelo protector nos pacientes con LEI

pode ser outro factor máis que contribúa a que os pacientes con LEI non desenvolvan LES.



#### 5.2.4.1 Alelo HLA DRB1\*15

Estudios realizados en poboacións europeas e de EEUU (caucásicas) foron os primeiros que detectaron a relación existente entre o alelo HLA DRB1\*15 (ou DR2, como se denominaba cando se realizaban estudos serolóxicos) e o LES. Estes traballos demostraron unha frecuencia significativamente elevada do alelo HLA DRB1\*15 en pacientes con LES. Malia que esta asociación foi posteriormente confirmada por múltiples estudos [65, 72, 73, 77, 135, 144, 145], hai poboacións nas que a maior frecuencia deste alelo nos pacientes con LES non alcanza significación estatística con respecto ó grupo de controis sans [74, 139, 142, 146-148].

Datos recentes suxeriron que o alelo HLA DRB1\*15 non se asocia tanto co desenvolvemento de LES en si coma con algunhas manifestacións clínicas da enfermidade [147]. Neste senso comunicouse que o alelo HLA DRB1\*15 é máis frecuente en pacientes con LES e afectación renal ca nos controis sans [141, 147], aínda que non todos os estudos mostran resultados concordantes [65, 135]. Isto podería ser debido a que o alelo HLA DRB1\*15 se asocie con algúns subtipos histolóxicos de glomerulonefrite lúpica máis que coa afectación renal globalmente entendida no lupus. En concreto parece que se podería asociar coas formas máis graves de glomerulonefrite, fundamentalmente coa clase IV [147].



Tamén se viron diferenzas na frecuencia do alelo HLA DRB1\*15 noutros subgrupos de pacientes con LES. Nun traballo no que se estudaron as características clínicas, serolóxicas e inmunoxenéticas de pacientes con LES, con ou sen síndrome de Sjögren (SS) asociado, observouse que o alelo HLA DRB1\*15 non se distribuía de igual forma en tódolos grupos [149]. A frecuencia de devandito alelo amosaba un gradiente entre os diferentes tipos de pacientes, sendo máis frecuente no grupo de LES sen SS, seguido dos controis sans e por último LES con SS. A diferenza entre ambos grupos de LES, con e sen SS, foi estatisticamente significativa.

O subgrupo de pacientes con LES e SS, é dicir, o que se asociou con menor frecuencia de HLA DRB1\*15, presentaba ademais outras características distintivas, como era un inicio máis tardío da enfermidade e un cadro clínico máis leve có de LES sen SS. Este cadro clínico caracterizábase por unha menor frecuencia de afectación renal, trombopenia e linfadenopatías.

Os nosos pacientes presentaron un patrón de distribución similar do alelo HLA DRB1\*15, cunha frecuencia maior deste alelo entre os pacientes con LES, seguido de controis sans e por último pacientes con LEI (Figura 12). Aínda que, polo deseño do estudo, os nosos pacientes con LEI non tiñan SS, a súa relación co alelo HLA DRB1\*15 coincide co mostrado polo grupo de LES con SS do traballo de Manoussakis *et al.* [149], xa que igual ca eles, os nosos pacientes con LEI presentaron unha menor frecuencia do alelo HLA

DRB1\*15, manifestacións clínicas de menor gravidade e un inicio máis tardío da enfermidade cós pacientes do grupo de LES do noso estudo.

A asociación entre a presenza do alelo HLA DRB1\*15 e o inicio precoz da enfermidade confirmouse en estudos sobre lupus xuvenil [150].

Polo tanto, pode considerarse que a menor frecuencia do alelo HLA DRB1\*15, asociado a maior incidencia de nefrite lúpica grave e comezo do LES a unha idade menor, podería explicar a ausencia de nefrite lúpica, a menor gravidade clínica da enfermidade e o comezo dos síntomas a unha idade máis avanzada nos pacientes con LEI.



#### 5.2.4.2 Alelo HLA DRB1\*11

Practicamente tódolos datos que hai da relación entre o alelo HLA DRB1\*11 e o LES orientan cara a que se trata dun alelo protector fronte á enfermidade, xunto co HLA DRB1\*04 e o HLA DRB1\*01 [67, 135, 146]. Actualmente, pode considerarse que o alelo HLA DRB1\*11 protexe fronte ó lupus grave, caracterizado por nefropatía e linfopenia [67].

Tamén se comunicou que a presenza do alelo HLA DRB1\*11 se asocia cunha menor gravidade e intensidade da inflamación noutras enfermidades autoinmunes, como a artrite reumatoide ou a cirrose biliar primaria [151-153]. Estudos realizados nesta última entidade, suxeriron que o alelo HLA DRB1\*1101 promove a tolerancia inmunolóxica ós autoantíxenos [154], o que explicaría o efecto atenuante da inflamación que se asociou coa súa presenza.

O efecto protector do alelo HLA DRB1\*11, que foi significativamente máis frecuente nos nosos pacientes con LEI ca nos pacientes con LES, podería contribuír a que os pacientes con LEI non desenvolvan un cadro máis grave e que polo tanto non desenvolvan LES.

### 5.3 Características Demográficas

Nas series de LEI publicadas a relación muller:home é similar á dos pacientes con LES. Na nosa serie non hai ningún home con LEI, mentres que no grupo de LES a relación muller:home é de 9:1. Hai estudos que suxiren que o LES en homes podería ser máis grave ca en mulleres, con maior frecuencia de afectación renal e neurolóxica, pero debido ó escaso número de pacientes afectados, os resultados dos estudos non sempre foron concordantes [155, 156]. Se o LES se manifestase de forma máis agresiva entre os pacientes de sexo masculino, cabería esperar tamén unha menor proporción de homes entre os pacientes con LEI, que presentan un cadro clínico máis leve. Aínda que tampouco podemos descartar que a ausencia de varóns na nosa serie sexa debida á baixa frecuencia de afectación masculina xunto co número de pacientes con LEI incluídos.

Na presente serie observamos que a idade de inicio e de diagnóstico da enfermidade foron significativamente maiores no grupo de LEI ca no grupo de pacientes con LES. Este feito concorda co observado en todos os traballos sobre LEI, nos que o inicio dos síntomas foi a unha idade máis avanzada nos pacientes con LEI ca nos que tiñan LES. Como xa se comentou previamente, este feito podería estar xeneticamente determinado pola ausencia do alelo HLA DRB1\*15 nos pacientes con LEI e a súa presenza nos enfermos con LES.

## 5.4 Manifestacións Clínicas dos Pacientes con LEI e LES

As manifestacións clínicas do lupus distribúense de forma diferente entre os pacientes con LEI e con LES. En xeral, podemos dicir que todas elas son menos frecuentes no LEI, aínda que as diferenzas entre grupos varían dunha manifestación a outra.

Segundo os nosos resultados, as manifestacións máis frecuentes entre os pacientes con LEI foron as alteracións hematolóxicas, a artrite, aftas orais e fotosensibilidade. Isto coincide cos datos publicados doutras series (Táboa 34), nas que a fotosensibilidade e a artrite son as dúas manifestacións máis frecuentes, aínda que tamén existen diferenzas. Mentres que nalgúns series a presenza de anticorpos anti-ADN e/ou anti-Sm está entre as tres manifestacións máis frecuentes [96, 99, 100], noutras son as alteracións hematolóxicas as que predominan [97, 101, 102].

No grupo de LES as manifestacións máis frecuentes foron tamén as mucocutáneas, hematolóxicas e articulares, pero ademais hai que engadir a presenza de anticorpos anti-ADN e anti-Sm, alteracións infrecuentes entre os pacientes con LEI.

### 5.4.1 Manifestacións mucocutáneas

As manifestacións mucocutáneas foron as máis frecuentes tanto no grupo de LEI coma no de LES. Pero dentro desta categoría, non tódalas manifestacións se comportan igual. A diferenza fundamental está no eritema malar, moi frecuente no LES e apenas presente no LEI. A diferenza entre grupos acadou significación estatística que se mantén tralo estudo multivariado, co que podería predicir o desenvolvemento de LES. Nas series publicadas, a frecuencia do eritema malar no LEI oscilou do 0 ó 25%, mentres que na nosa foi do 5%. A maior parte dos traballos con porcentaxes altas de eritema malar no LEI son estudos que inclúen poucos pacientes [96, 99, 100]. En xeral, do mesmo xeito que na nosa serie, o número absoluto de pacientes con LEI e eritema malar foi moi escaso, e poucas veces superior a 5 enfermos. Só nos traballos de Swaak *et al.* [101] e de Vilá *et al.* [102] houbo 15 e 10 pacientes con LEI e eritema malar respectivamente.

A presenza de eritema malar é a diferenza clínica máis consistente entre LEI e LES, xa que en catro dos sete estudos publicados observaron que era significativamente máis frecuente no grupo de LES [98-100, 102]. Ademais, do mesmo xeito que nos nosos casos, esta diferenza mantivo a significación estatística trala análise multivariada no estudo no que se realizou [102]. Por iso se considera que a presenza de eritema malar é un signo clínico que podería axudar a predicir o desenvolvemento de LES nos pacientes con LEI [102].

A fotosensibilidade tamén é frecuente entre LEI e LES, aínda que a proporción de pacientes afectados é maior dentro do LES. Esta diferenza mantense no estudo multivariado, no que se mostra independente da presenza de eritema malar.

#### **5.4.2 Alteracións renais**

En concordancia coa idea de que o LEI é unha entidade de menor gravidade que o LES, a afectación renal é pouco frecuente neste grupo (Táboa 34).

Na nosa serie só 2 pacientes con LEI presentaron alteracións renais que poderían cumprir o criterio de afectación renal polo LES (alteración do sedimento urinario e/ou proteinuria persistentes). En ningún destes dous casos se realizou biopsia, probablemente por presentar alteracións leves que se autolimitaron no tempo. No momento da realización do estudo ningún deles presentaba alteración da función renal, sen que se recollese na súa historia clínica nin que a doente lembrase ter recibido tratamento inmunosupresor. Polo tanto e aínda que no seu día cumprisen o criterio de afectación renal, a evolución do cadro clínico fai que sexa altamente improbable que se tratase de auténticas nefrites lúpicas.

Ó revisar a literatura, chama a atención que en tres das series publicadas a frecuencia de afectación renal fose do 11 ó 17%, mentres que no resto foi practicamente nula.

Na serie de Swaak *et al.* 11 pacientes con LEI presentaron alteracións renais, con 8 casos de hematuria e 4 de proteinuria [101]. Ó tratarse dun estudio multicéntrico no que unicamente se estudaba a evolución da enfermidade en base á presenza ou ausencia de manifestacións clínicas, non se valorou a gravidade nin se fixo referencia á realización de biopsia renal. Polo tanto é difícil valorar con eses datos se realmente se trataba de casos de nefropatía lúpica.

Na serie de Laustrup *et al.* [99] recolléronse 4 pacientes con alteracións renais que tampouco se especificaron, e no traballo de Vilá *et al.* [102] só 2 pacientes con LEI dos 87 estudados presentaron proteinuria, pero descoñecemos cal foi a súa evolución.

O traballo que máis afonda fai na posibilidade de desenvolvemento de nefropatía nos pacientes con LEI é o de Stahl Hallengren *et al.* [100]. Nesta serie, 2 dos 12 pacientes con LEI presentaron afectación renal. De tódolos xeitos, nun dos casos non se puido descartar a posibilidade de que se tratase dunha nefrite post-estreptocócica e no outro non se especificou que tipo de alteración renal presentaba.

De calquera forma, en tódolos traballos consideran que a afectación renal no LEI é excepcional. Tampouco hai ningún estudo que analice en profundidade estes casos, polo que descoñecemos cal foi a evolución, se había estudo



histolóxico ou que tratamentos recibiron, e non podemos ter a certeza de que todos sexan casos de nefrite lúpica.

### 5.4.3 Alteracións neurolóxicas

Nas series publicadas a frecuencia de alteracións neurolóxicas (crises comiciais e/ou psicose) entre os pacientes con LEI foi moi baixa. O traballo que recolleu o maior número de pacientes con afectación neurolóxica é o de Swaak *et al.* [101], no que se incluíron 4 casos de convulsións e 3 de psicose. Nas outras dúas series que mencionan casos de afectación neurolóxica en LEI só houbo un paciente con psicose [98] e outro con afectación neurolóxica non especificada [99].

Na nosa serie só un paciente do grupo de LEI presentou alteracións neurolóxicas que foron atribuídas ó lupus. Tratábase de crises comiciais ocorridas 2 anos antes do diagnóstico de LEI. Realizáronse estudos de imaxe con resonancia magnética que non demostraron alteracións e os anticorpos antifosfolípido foron negativos. Ó non haber outra causa considerouse que as crises comiciais eran secundarias ó lupus, malia o cal non chegou a cumprir criterios diagnósticos de LES.

#### **5.4.4 Alteracións hematolóxicas**

As manifestacións hematolóxicas foron frecuentes en ambos grupos, pero a diferenza fundamental entre os pacientes con LES e os pacientes con LEI foi a presenza de anemia hemolítica autoinmune. Na nosa serie non houbo ningún caso de anemia hemolítica dentro do grupo de LEI, mentres que se diagnosticou no 22% dos pacientes con LES. Nas series publicadas si hai algún caso de anemia hemolítica autoinmune [101], pero tampouco está clara a súa frecuencia, xa que na maioría dos estudos publicados as alteracións hematolóxicas contabilizáronse agrupadas.

#### **5.4.5 Alteracións inmunolóxicas**

Nos estudos realizados en pacientes con LEI, a frecuencia de alteracións inmunolóxicas diferentes da positividade dos ANA presenta unha gran variabilidade, xa que foi dende o 0% a máis do 70%. Estas diferenzas débense ó ano de publicación dos diferentes estudos e ós avances nas técnicas de detección de autoanticorpos, xa que os estudos máis recentes son os que observan alteracións inmunolóxicas con maior frecuencia. Doutra banda, tampouco existe un estándar nas técnicas de determinación de tódolos autoanticorpos, polo que pode haber unha importante variabilidade dun laboratorio a outro [157, 158]

Na nosa serie, o 15% dos pacientes con LEI presentaron anticorpos anti-ADN ou anti-Sm. A existencia de pacientes con LEI e anticorpos anti-ADN positivos chama a atención, xa que a presenza de devanditos autoanticorpos foi considerada un dos factores de predición de desenvolvemento de LES [102]. Na nosa serie foron 5 os pacientes con anticorpos anti-ADN positivos, e todos menos un tiñan máis de 5 anos de evolución no momento da realización do estudo, polo que a probabilidade de desenvolver LES sería baixa.

O criterio inmunolóxico, entendido como a presenza de anticorpos anti-ADN e/ ou anti-Sm, constituíu no noso traballo unha das diferenzas principais entre os grupos de LEI e LES. A presenza de anticorpos anti-ADN foi significativamente máis frecuente no grupo de LES ca no LEI, tanto no estudo bivariado coma no multivariado, coincidindo cos resultados de Vila *et al.* [102]

**Táboa 34.** Manifestacións clínicas durante a evolución da enfermidade en pacientes con LEI de estudos publicados (%)

	Greer [98]	Ganczarczyk [97]	Calvo Alén [103]	Vila [102]	Swaak <sup>c</sup> [101]	Stahl Hallengren [100]	Al Attia [96]	Lastrup [99]	Serie actual
<b>N</b>	38	15	22	79	100	12	15	25	41
<b>Erupción malar</b>	13 <sup>a</sup>	0	5 <sup>a</sup>	25 <sup>a</sup>	15	17	20	19 <sup>a</sup>	5 <sup>a,b</sup>
<b>LE discoide</b>	34 <sup>a</sup>	0	9	8	5	8	0 <sup>a</sup>	4	7
<b>Fotosensibilidade</b>	24	13	18	40 <sup>a</sup>		42	0 <sup>a</sup>	46	24 <sup>a,b</sup>
<b>Aftas orais</b>	3	27	9	3 <sup>a</sup>		0	0 <sup>a</sup>	8	27
<b>Artrite</b>	47	40	27 <sup>a</sup>	15	28	50	65	31 <sup>a</sup>	32 <sup>a,b</sup>
<b>Serosite</b>	16 <sup>a</sup>	13	36	1	5	8	20	19 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>
<b>Nefropatía</b>	0 <sup>a</sup>	0	27	3	11	17	0 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>
<b>Neurolóxicas</b>	3 <sup>a</sup>	0	0	0	4	0	0 <sup>a</sup>	4	2
<b>Hematolóxicas</b>	18 <sup>a</sup>					17	33	31 <sup>a</sup>	34 <sup>a</sup>
Anemia HAI		0	0	30 <sup>d</sup>	2				0 <sup>a</sup>
Trombopenia		33	9	5	9				15
Leucopenia		20	9 <sup>a</sup>	10	44		14 <sup>a</sup>		20 <sup>a,b</sup>
Linfopenia		0	23 <sup>a</sup>	21					15 <sup>a,b</sup>
<b>Inmunolóxicas</b>	0 <sup>a</sup>					25		65 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>
Anti ADN		13	18	4 <sup>*a</sup>			71		12 <sup>a,b</sup>
Anti Sm				0 <sup>*</sup>			11		2 <sup>a</sup>
<b>ANA</b>	82	73	95	98 <sup>*</sup>		100	85	100	100

\*de inicio; <sup>a</sup> Diferenzas estatisticamente significativas respecto a LES; <sup>b</sup> Diferenzas estatisticamente significativas en estudo de regresión; <sup>c</sup> Non compara con grupo LES; <sup>d</sup> Anemia de calquera etiología

Polo tanto, os datos obtidos son concordantes cos dos estudos publicados, nos que as manifestacións máis frecuentes nos pacientes con LEI foron a artrite, as alteracións hematolóxicas e a fotosensibilidade. Hai que destacar que os estudos previos que compararon as manifestacións clínicas e analíticas dos pacientes con LEI coas presentadas polos pacientes con LES observaron as mesmas diferenzas ca nesta serie (Táboa 34).

Todo isto encaixa coa idea de que o LEI é unha entidade de menor gravidade có LES. Aínda que tamén vemos na literatura que, malia que o LEI é un cadro xeralmente máis leve que o LES, algúns pacientes con LEI poderían presentar manifestacións hematolóxicas, cutáneas, articulares ou neurolóxicas graves [98-102]. É posible que estes pacientes que non cumpren criterios de clasificación pero que presentan afectación orgánica grave sexan xeneticamente máis parecidos ós LES, con alelos ou polimorfismos asociados a unha maior gravidade.

Así mesmo hai pacientes que si cumpren criterios pero que presentan unha enfermidade máis leve, clinicamente similar á dos LEI, e que poderían ser portadores de alelos protectores que fagan que non se desenvolvan as manifestacións máis graves. Por exemplo, cadros mucocutáneos con ANA positivos poden cumprir criterios e aínda así ter unha evolución moi benigna, comparable á dos cadros incompletos.

#### 5.4.6 Manifestacións de inicio

Aínda que un 43% dos nosos pacientes con LES se presentou cun cadro clínico diagnóstico, no resto dos enfermos o desenvolvemento da enfermidade foi gradual. Nestes casos, ó comezo da enfermidade non podemos saber se estamos ante un paciente que desenvolverá LES ou se pola contra se trata dun LEI que permanecerá estable e con escasa morbilidade para sempre. Consideramos que a análise das manifestacións de inicio en cada grupo de pacientes podería axudarnos a distinguilos.

A artrite e as manifestacións hematolóxicas foron as dúas características de inicio máis frecuentes en ambos grupos. As diferenzas fundamentais entre grupos estaban no eritema malar e nas alteracións inmunolóxicas, significativamente máis frecuentes ó comezo do cadro entre os pacientes con LES ca entre os LEI.

Nas tres series con LEI publicadas que avaliaron as manifestacións de presentación da enfermidade (Táboa 35), a artrite foi tamén a manifestación inicial máis frecuente, pero en dúas delas a fotosensibilidade foi a segunda en frecuencia. No estudo de Vila *et al.* [102] observaron igual ca nós, que a presenza de fotosensibilidade era significativamente menor no grupo de LEI ca no de LES.

**Táboa 35.** Frecuencia das manifestacións de inicio (%) en pacientes con LEI na literatura e na serie actual

	Ganczarczyk <sup>c</sup> [97]	Stahl Hallengren <sup>c</sup> [100]	Vila [102]	Serie actual
<b>N</b>	15	12	79	41
<b>Erupción malar</b>	0	0	11 <sup>a,b</sup>	5 <sup>a</sup>
<b>LE discoide</b>	0	8	6	7
<b>Fotosensibilidade</b>	0	42	25 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>
<b>Aftas orais</b>	0	0	0 <sup>a,b</sup>	17
<b>Artrite</b>	33	50	11 <sup>a</sup>	22 <sup>a</sup>
<b>Serosite</b>	0	8	1	5
<b>Nefropatía</b>	0	17	1	5
<b>Neurolóxicas</b>	0	0	0	2
<b>Hematolóxicas</b>		17		22 <sup>a</sup>
Anemia HAI	0		13	0 <sup>a</sup>
Trombopenia	7		4	12
Leucopenia	20		1	7 <sup>a</sup>
Linfopenia	0		4	10
<b>Inmunolóxicas</b>		17		5 <sup>a</sup>
Anti ADN	0		4 <sup>a,b</sup>	5 <sup>a</sup>
Anti Sm			0 <sup>a</sup>	0
<b>ANA</b>	47	100	98	51

<sup>a</sup> Diferenzas estatisticamente significativas respecto a LES; <sup>b</sup> Consideradas predictoras de evolución a LES en estudio de regresión; <sup>c</sup> Non compara con grupo LES

Tralo estudo multivariado observouse que o eritema malar e a artrite eran características clínicas útiles para distinguir o LEI do LES. A presenza dalgunha destas dúas manifestacións ó comezo do cadro podería indicar unha maior probabilidade de que o paciente desenvolvese LES, cunha OR de 10,78 para o eritema malar e de 3,72 para a artrite.

## 5.5 Asociación de Alelos HLA-DRB1 con Características

### Clínicas de Lupus

Hai tres estudos nos que se analizou a asociación dos alelos HLA-DRB1 coas diferentes manifestacións clínicas do LES [67, 135, 137]. Noutros traballos a análise foi máis limitada, xa que estudaron só os alelos asociados ó LES, coma o HLA DRB1\*03 e o HLA DRB1\*15 [65], ou a asociación cunha única manifestación do lupus [143]. As coincidencias entre os resultados obtidos en devanditos traballos son escasas (Táboas 36 e 37), polo que a maioría dos autores consideran que son necesarios máis estudos nesta liña de traballo. Nos nosos resultados existen certas similitudes e tamén algunhas diferenzas co publicado ata a data que cómpre resaltar.

En primeiro lugar, a asociación do lupus discoide co alelo HLA DRB1\*04 foi detectada previamente en dous estudos de grupos étnicos moi diferentes ós nosos pacientes: un coreano [135] e outro mexicano [143]. Nestes traballos calculouse unha OR para o desenvolvemento de lupus discoide de 2,6 e 2,24 respectivamente, algo menores ca na nosa serie.

Doutra banda tamén se observou asociación entre o alelo HLA DRB1\*04 e a presenza de artrite, que algúns autores explican pola maior frecuencia do HLA DRB1\*04 na artrite reumatoide [135]. En cambio na nosa serie a asociación do alelo HLA DRB1\*04 coa artrite é negativa.



**Táboa 36.** Asociacións positivas entre alelos HLA-DRB1 e manifestacións clínicas de lupus

DRB1	Na literatura	Na serie actual
*01		Anemia HAI Serosite
*03	Pleurite <sup>a</sup> Afectación pulmonar <sup>a</sup> Nefropatía <sup>a,c</sup> Psicose <sup>a</sup>	
*04	Artrite <sup>b</sup> Lupus discoide <sup>b,e</sup>	Lupus discoide Aftas orais
*07	Raynaud <sup>a</sup> Artrite <sup>b</sup> Anemia Hemolítica autoinmune <sup>b</sup>	
*08	Afectación neurolóxica <sup>c</sup>	
*09	Raynaud <sup>b</sup>	
*13	Anemia HAI <sup>b</sup>	
*15	Afectación neurolóxica <sup>b</sup> Serosite <sup>d</sup>	Erupción malar Aftas orais
*16	Nefropatía <sup>a</sup> Lupus discoide <sup>a,e</sup> Linfadenopatía <sup>a</sup>	

<sup>a</sup> Galeazzi *et al.* [67]; <sup>b</sup> Lee *et al.* [135]; <sup>c</sup> Vasconcelos *et al.* [137]; <sup>d</sup> Tsuchiya *et al.* [65]; <sup>e</sup> López-Tello *et al.* [143]

Unha asociación significativa observada nos nosos pacientes foi a do eritema malar co alelo HLA DRB1\*15. Esta asociación non se chegou a demostrar

noutros estudos, pero si se observou unha maior transmisión do alelo HLA DRB1\*15 nos pacientes que presentaban eritema malar [65].

**Táboa 37.** Asociacións negativas entre alelos HLA-DRB1 e manifestacións clínicas de lupus

DRB1	Na literatura	Na serie actual
<b>*01</b>	Nefropatía <sup>a</sup>	
	Manifestacións neurolóxicas <sup>a</sup>	
<b>*04</b>	Erupción malar <sup>b</sup>	Artrite
	Leucopenia <sup>b</sup>	
<b>*09</b>	Nefrite <sup>c</sup>	
<b>*11</b>	Nefropatía <sup>a</sup>	
	Linfopenia <sup>a</sup>	
<b>*13</b>	Serosite <sup>b</sup>	Aftas orais
	Nefrite <sup>c</sup>	
<b>*14</b>	Leucopenia <sup>a,b</sup>	
	Linfopenia <sup>a</sup>	
	Vasculite cutánea dixital <sup>a</sup>	
<b>*15</b>	Trombocitopenia <sup>b</sup>	
	Nefropatía <sup>d</sup>	

<sup>a</sup> Galeazzi *et al.* [67]; <sup>b</sup> Lee *et al.* [135]; <sup>c</sup> Vasconcelos *et al.* [137]; <sup>d</sup> Tsuchiya *et al.* [65]; <sup>e</sup> López-Tello *et al.* [143]

## 5.6 Asociación de Alelos HLA-DRB1 con Autoanticorpos Relacionados co Lupus

Hai múltiples traballos publicados nos que se estuda a relación entre os autoanticorpos asociados ó LES e os alelos HLA DRB1.

**Táboa 38.** Asociacións entre autoanticorpos relacionados co lupus e alelos HLA DRB1 na literatura e na serie actual

	Na literatura	Na serie actual
Alelos HLA DRB1 con asociación positiva		
<b>Anti ADN</b>	*15 <sup>a,c,d</sup> , *03 <sup>c</sup>	*16
<b>Anti SSA</b>	*03 <sup>a,c,e</sup> , *07 <sup>b</sup> , *08 <sup>b</sup> , *15 <sup>c</sup>	*15
<b>Anti SSB</b>	*03 <sup>a,c</sup>	*03
<b>Anti Sm</b>	*03 <sup>c</sup> , *15 <sup>c</sup>	
<b>Anti RNP</b>	*04, *11 <sup>b</sup> , *15 <sup>b</sup>	
Alelos HLA DRB1 con asociación negativa		
<b>Anti SSA</b>	*01 <sup>a</sup> , *14 <sup>a</sup>	*11
<b>Anti RNP</b>	*08 <sup>b</sup> , *12 <sup>b</sup>	

<sup>a</sup> Galeazzi *et al.*[67]; <sup>b</sup> Lee *et al.*[135]; <sup>c</sup> Graham *et al.*[68]; <sup>d</sup> Podrebarac *et al.* [159]; <sup>e</sup> McHugh *et al.* [160]

Descríronse diversas asociacións, pero as máis consistentes son as atopadas entre o alelo HLA DRB1\*15 e os anticorpos anti-ADN e o HLA DRB1\*03 e os anticorpos anti-SSA (Táboa 38).

Na nosa serie atopamos unha asociación significativa entre o alelo HLA DRB1\*15 e os anticorpos anti-SSA e entre o HLA DRB1\*03 e os anti-SSB, achados que concordan cos datos publicados previamente.

Por outra banda, nos nosos pacientes observamos a relación entre o alelo HLA DRB1\*16 e os anticorpos anti-ADN e a asociación negativa do alelo HLA DRB1\*11 cos anti-SSA, que non foron descritas previamente. O que si está descrito é a correlación entre a produción de anticorpos anti-ADN e a afectación renal no lupus [161], así coma a asociación de esta última co alelo HLA DRB1\*16 [67].

## 5.7 Limitacións

1. O número de pacientes incluídos no estudo foi escaso. Aumentando o número de pacientes e controis aumentaría potencia do estudo, aínda que pola baixa prevalencia do LEI probablemente sexa difícil conseguir unha serie ampla, sendo a serie actual a terceira máis numerosa das publicadas ata o momento.
2. Realizouse un tipado HLA DRB1 de baixa resolución. Cun tipado de alta resolución podería afinarse máis nos alelos asociados ó LEI. E engadindo o estudo de alelos DQB1 e/ou DQA1 poderían estudarse haplotipos asociados ó LEI.
3. Por ser un estudo retrospectivo, só se recolleron manifestacións presentes nos criterios de clasificación, ademais de Raynaud e alteracións analíticas, e non outras manifestacións frecuentes en pacientes con LES, xa que non estaban recolleitas de xeito sistemático nas historias clínicas.





## **6. CONCLUSIÓNS**





## Conclusións

1. Os pacientes con LEI presentaron unha frecuencia dos alelos HLA DRB1\*03 e HLA DRB1\*01 semellante á dos pacientes con LES ó comparalos cos controis sans.
2. Os pacientes con LEI presentaron unha maior frecuencia do alelo HLA DRB1\*11 cós pacientes con LES .
3. Os pacientes con LEI presentaron unha menor frecuencia do alelo HLA DRB1\*15 cós pacientes con LES.
4. As diferenzas observadas na frecuencia dos alelos HLA DRB1 entre os pacientes con LEI e os pacientes con LES, poderían contribuír a que a enfermidade fose máis leve e non se desenvolvese de forma completa nos pacientes con LEI.
5. Os pacientes con LEI presentaron unha idade de inicio da enfermidade maior ca dos pacientes con LES.
6. Ante un paciente con ANA positivos e menos de catro criterios de clasificación de LES, a presenza de eritema malar e/ou artrite ó comezo da enfermidade aumentan a probabilidade de que se trate dun paciente con LES e non con LEI.





## **7. BIBLIOGRAFÍA**



1. Danchenko, N., J.A. Satia, and M.S. Anthony, *Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden*. *Lupus*, 2006. **15**(5): p. 308-18.
2. Cervera, R., M.A. Khamashta, and G.R. Hughes, *The Euro-lupus project: epidemiology of systemic lupus erythematosus in Europe*. *Lupus*, 2009. **18**(10): p. 869-74.
3. Cervera, R., et al., *Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients*. *Medicine (Baltimore)*, 2003. **82**(5): p. 299-308.
4. Siegel, M., et al., *The epidemiology of systemic lupus erythematosus: preliminary results in New York City*. *J Chronic Dis*, 1962. **15**: p. 131-40.
5. Michet, C.J., Jr., et al., *Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979*. *Mayo Clin Proc*, 1985. **60**(2): p. 105-13.
6. Naleway, A.L., et al., *Epidemiology of systemic lupus erythematosus in rural Wisconsin*. *Lupus*, 2005. **14**(10): p. 862-6.
7. Jimenez, S., et al., *The epidemiology of systemic lupus erythematosus*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2003. **25**(1): p. 3-12.
8. Lopez, P., et al., *Epidemiology of systemic lupus erythematosus in a northern Spanish population: gender and age influence on immunological features*. *Lupus*, 2003. **12**(11): p. 860-5.

9. Alonso, M.D., et al., *Systemic lupus erythematosus in northwestern Spain: a 20-year epidemiologic study*. *Medicine (Baltimore)*, 2011. **90**(5): p. 350-8.
10. Laffon-Roca, A. *Proyecto EPISER. Prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española*. . 2001 [cited 2012 10/09/2012].
11. Vasudevan, A. and A.N. Krishnamurthy, *Changing worldwide epidemiology of systemic lupus erythematosus*. *Rheum Dis Clin North Am*, 2010. **36**(1): p. 1-13, vii.
12. Rahman, A. and D.A. Isenberg, *Systemic lupus erythematosus*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(9): p. 929-39.
13. La Cava, A., *Lupus and T cells*. *Lupus*, 2009. **18**(3): p. 196-201.
14. Lipsky, P.E., *Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(9): p. 764-6.
15. Nagy, G., A. Koncz, and A. Perl, *T- and B-cell abnormalities in systemic lupus erythematosus*. *Crit Rev Immunol*, 2005. **25**(2): p. 123-40.
16. Chen, M., M.R. Daha, and C.G. Kallenberg, *The complement system in systemic autoimmune disease*. *J Autoimmun*, 2010. **34**(3): p. J276-86.
17. Shao, W.H. and P.L. Cohen, *Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Res Ther*, 2011. **13**(1): p. 202.
18. Schoonen, W.M., et al., *Do selected drugs increase the risk of lupus? A matched case-control study*. *Br J Clin Pharmacol*, 2010. **70**(4): p. 588-96.

19. Vasoo, S., *Drug-induced lupus: an update*. *Lupus*, 2006. **15**(11): p. 757-61.
20. Strickland, F.M. and B.C. Richardson, *Epigenetics in human autoimmunity. Epigenetics in autoimmunity - DNA methylation in systemic lupus erythematosus and beyond*. *Autoimmunity*, 2008. **41**(4): p. 278-86.
21. Yung, R., et al., *Mechanisms of drug-induced lupus. II. T cells overexpressing lymphocyte function-associated antigen 1 become autoreactive and cause a lupuslike disease in syngeneic mice*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(12): p. 2866-71.
22. Casciola-Rosen, L.A., G. Anhalt, and A. Rosen, *Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes*. *J Exp Med*, 1994. **179**(4): p. 1317-30.
23. Li-Weber, M., et al., *Ultraviolet irradiation suppresses T cell activation via blocking TCR-mediated ERK and NF-kappa B signaling pathways*. *J Immunol*, 2005. **175**(4): p. 2132-43.
24. Parks, C.G., K. Conrad, and G.S. Cooper, *Occupational exposure to crystalline silica and autoimmune disease*. *Environ Health Perspect*, 1999. **107 Suppl 5**: p. 793-802.

25. Davis, G.S., L.M. Pfeiffer, and D.R. Hemenway, *Expansion of interferon-gamma-producing lung lymphocytes in mouse silicosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**(4): p. 813-24.
26. Song, L., et al., *Tregs promote the differentiation of Th17 cells in silica-induced lung fibrosis in mice*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37286.
27. Hultman, P., et al., *Anti-fibrillar autoantibodies in mercury-treated mice*. Clin Exp Immunol, 1989. **78**(3): p. 470-7.
28. Pollard, K.M., et al., *Lupus-prone mice as models to study xenobiotic-induced acceleration of systemic autoimmunity*. Environ Health Perspect, 1999. **107 Suppl 5**: p. 729-35.
29. James, J.A., et al., *Systemic lupus erythematosus in adults is associated with previous Epstein-Barr virus exposure*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(5): p. 1122-6.
30. James, J.A., et al., *An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 3019-26.
31. Harley, J.B., et al., *The curiously suspicious: a role for Epstein-Barr virus in lupus*. Lupus, 2006. **15**(11): p. 768-77.
32. Poole, B.D., et al., *Epstein-Barr virus and molecular mimicry in systemic lupus erythematosus*. Autoimmunity, 2006. **39**(1): p. 63-70.



33. Henderson, S., et al., *Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8479-83.
34. Taga, K., et al., *Interleukin-10 inhibits apoptotic cell death in infectious mononucleosis T cells*. J Clin Invest, 1994. **94**(1): p. 251-60.
35. Larsen, M., et al., *Exhausted cytotoxic control of Epstein-Barr virus in human lupus*. PLoS Pathog, 2011. **7**(10): p. e1002328.
36. Ramos-Casals, M., et al., *Acute viral infections in patients with systemic lupus erythematosus: description of 23 cases and review of the literature*. Medicine (Baltimore), 2008. **87**(6): p. 311-8.
37. Roubinian, J.R., et al., *Effect of castration and sex hormone treatment on survival, anti-nucleic acid antibodies, and glomerulonephritis in NZB/NZW F1 mice*. J Exp Med, 1978. **147**(6): p. 1568-83.
38. Talal, N., *Natural history of murine lupus. Modulation by sex hormones*. Arthritis Rheum, 1978. **21**(5 Suppl): p. S58-63.
39. Michalski, J.P., et al., *Effect of androgen therapy on survival and suppressor cell activity in aged NZB/NZW F1 hybrid mice*. Clin Exp Immunol, 1983. **52**(1): p. 229-33.
40. Verheul, H.A., et al., *The effects of nandrolone, testosterone and their decanoate esters on murine lupus*. Clin Exp Immunol, 1981. **44**(1): p. 11-7.

41. Cutolo, M., et al., *Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity*. *Lupus*, 2004. **13**(9): p. 635-8.
42. Cooper, G.S., et al., *Hormonal and reproductive risk factors for development of systemic lupus erythematosus: results of a population-based, case-control study*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(7): p. 1830-9.
43. Buyon, J.P., et al., *Can women with systemic lupus erythematosus safely use exogenous estrogens?* *J Clin Rheumatol*, 1995. **1**(4): p. 205-12.
44. Cunningham, M. and G. Gilkeson, *Estrogen receptors in immunity and autoimmunity*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2011. **40**(1): p. 66-73.
45. Lang, T.J., *Estrogen as an immunomodulator*. *Clin Immunol*, 2004. **113**(3): p. 224-30.
46. Jara, L.J., et al., *Prolactin in human systemic lupus erythematosus*. *Lupus*, 2001. **10**(10): p. 748-56.
47. Alarcon-Segovia, D., et al., *Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(4): p. 1138-47.
48. Rasmussen, A., et al., *The lupus family registry and repository*. *Rheumatology (Oxford)*, 2011. **50**(1): p. 47-59.
49. Michel, M., et al., *Familial lupus erythematosus. Clinical and immunologic features of 125 multiplex families*. *Medicine (Baltimore)*, 2001. **80**(3): p. 153-8.

50. Deng, Y. and B.P. Tsao, *Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era*. Nat Rev Rheumatol, 2010. **6**(12): p. 683-92.
51. Castro, J., et al., *The complex immunogenetic basis of systemic lupus erythematosus*. Autoimmun Rev, 2008. **7**(5): p. 345-51.
52. Moser, K.L., et al., *Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus*. Genes Immun, 2009. **10**(5): p. 373-9.
53. Guerra, S.G., T.J. Vyse, and D.S. Cunninghame Graham, *The genetics of lupus: a functional perspective*. Arthritis Res Ther, 2012. **14**(3): p. 211.
54. Lee, Y.H., et al., *Genome-wide pathway analysis of genome-wide association studies on systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis*. Mol Biol Rep, 2012.
55. Sullivan, K.E., *Genetics of systemic lupus erythematosus. Clinical implications*. Rheum Dis Clin North Am, 2000. **26**(2): p. 229-56, v-vi.
56. Hughes, T., et al., *Evidence for gene-gene epistatic interactions among susceptibility loci for systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(2): p. 485-92.
57. Shiina, T., H. Inoko, and J.K. Kulski, *An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004*. Tissue Antigens, 2004. **64**(6): p. 631-49.
58. Klein, J. and A. Sato, *The HLA system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(10): p. 702-9.

59. Horton, R., et al., *Gene map of the extended human MHC*. Nat Rev Genet, 2004. **5**(12): p. 889-99.
60. Ziegler, A., H. Kentenich, and B. Uchanska-Ziegler, *Female choice and the MHC*. Trends Immunol, 2005. **26**(9): p. 496-502.
61. Fernando, M.M., et al., *Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis*. PLoS Genet, 2008. **4**(4): p. e1000024.
62. Lahita, R.G., *Systemic lupus erythematosus*. 5th ed. 2011, Amsterdam ; New York: Elsevier Academic Press. xix, 1134 p.
63. Grumet, F.C., et al., *Histocompatibility (HL-A) antigens associated with systemic lupus erythematosus. A possible genetic predisposition to disease*. N Engl J Med, 1971. **285**(4): p. 193-6.
64. Hughes, G.R. and J.R. Batchelor, *Genetics of systemic lupus erythematosus*. Br Med J (Clin Res Ed), 1983. **286**(6363): p. 416-7.
65. Tsuchiya, N., et al., *Analysis of the association of HLA-DRB1, TNFalpha promoter and TNFR2 (TNFRSF1B) polymorphisms with SLE using transmission disequilibrium test*. Genes Immun, 2001. **2**(6): p. 317-22.
66. Reveille, J.D., et al., *Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: I. The effects of HLA class II, C4, and CR1 alleles, socioeconomic factors, and ethnicity at disease onset. LUMINA Study Group. Lupus in minority populations, nature versus nurture*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(7): p. 1161-72.

67. Galeazzi, M., et al., *HLA class II DNA typing in a large series of European patients with systemic lupus erythematosus: correlations with clinical and autoantibody subsets*. *Medicine (Baltimore)*, 2002. **81**(3): p. 169-78.
68. Graham, R.R., et al., *Specific combinations of HLA-DR2 and DR3 class II haplotypes contribute graded risk for disease susceptibility and autoantibodies in human SLE*. *Eur J Hum Genet*, 2007. **15**(8): p. 823-30.
69. Harley, J.B., et al., *A model for disease heterogeneity in systemic lupus erythematosus. Relationships between histocompatibility antigens, autoantibodies, and lymphopenia or renal disease*. *Arthritis Rheum*, 1989. **32**(7): p. 826-36.
70. Galeazzi, M., et al., *HLA class II alleles associations of anticardiolipin and anti-beta2GPI antibodies in a large series of European patients with systemic lupus erythematosus*. *Lupus*, 2000. **9**(1): p. 47-55.
71. Domenico Sebastiani, G., G. Minisola, and M. Galeazzi, *HLA class II alleles and genetic predisposition to the antiphospholipid syndrome*. *Autoimmun Rev*, 2003. **2**(6): p. 387-94.
72. Lundstrom, E., et al., *HLA-DRB1\*04/\*13 alleles are associated with vascular disease and antiphospholipid antibodies in systemic lupus erythematosus*. *Ann Rheum Dis*, 2012.

73. Graham, R.R., et al., *Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus*. Am J Hum Genet, 2002. **71**(3): p. 543-53.
74. Fernando, M.M., et al., *Identification of two independent risk factors for lupus within the MHC in United Kingdom families*. PLoS Genet, 2007. **3**(11): p. e192.
75. Fernando, M.M., et al., *Transancestral mapping of the MHC region in systemic lupus erythematosus identifies new independent and interacting loci at MSH5, HLA-DPB1 and HLA-G*. Ann Rheum Dis, 2012. **71**(5): p. 777-84.
76. Scherak, O., G. Kolarz, and W.R. Mayr, *HLA-B8 in caucasian patients with systemic lupus erythematosus*. Scand J Rheumatol, 1978. **7**(1): p. 3-6.
77. Barcellos, L.F., et al., *High-density SNP screening of the major histocompatibility complex in systemic lupus erythematosus demonstrates strong evidence for independent susceptibility regions*. PLoS Genet, 2009. **5**(10): p. e1000696.
78. Boteva, L., et al., *Genetically determined partial complement C4 deficiency states are not independent risk factors for SLE in UK and Spanish populations*. Am J Hum Genet, 2012. **90**(3): p. 445-56.
79. Wu, Y.L., et al., *Phenotypes, genotypes and disease susceptibility associated with gene copy number variations: complement C4 CNVs in*

- European American healthy subjects and those with systemic lupus erythematosus.* Cytogenet Genome Res, 2008. **123**(1-4): p. 131-41.
80. Alarcon, G.S., et al., *Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. XIX. Natural history of the accrual of the American College of Rheumatology criteria prior to the occurrence of criteria diagnosis.* Arthritis Rheum, 2004. **51**(4): p. 609-15.
81. Voss, A., A. Green, and P. Junker, *Systemic lupus erythematosus in Denmark: clinical and epidemiological characterization of a county-based cohort.* Scand J Rheumatol, 1998. **27**(2): p. 98-105.
82. Arbuckle, M.R., et al., *Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus.* N Engl J Med, 2003. **349**(16): p. 1526-33.
83. Tan, E.M., et al., *The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 1982. **25**(11): p. 1271-7.
84. Petri, M., *Review of classification criteria for systemic lupus erythematosus.* Rheum Dis Clin North Am, 2005. **31**(2): p. 245-54, vi.
85. Nossent, J.S.T., *Incomplete Lupus Erythematosus*, in *Systemic Lupus Erythematosus*, R. Lahita, Editor. 2011, Elsevier Academic Press: Amsterdam ; New York. p. xix, 1134 p.

86. Mosca, M., C. Tani, and S. Bombardieri, *Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD): a new frontier for rheumatology*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2007. **21**(6): p. 1011-23.
87. Mosca, M., et al., *Undifferentiated CTD: a wide spectrum of autoimmune diseases*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2012. **26**(1): p. 73-7.
88. Mosca, M., et al., *Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD): simplified systemic autoimmune diseases*. Autoimmun Rev, 2011. **10**(5): p. 256-8.
89. Vaz, C.C., et al., *Undifferentiated connective tissue disease: a seven-center cross-sectional study of 184 patients*. Clin Rheumatol, 2009. **28**(8): p. 915-21.
90. Asherson, R.A., R. Cervera, and R.G. Lahita, *Latent, incomplete or lupus at all?* J Rheumatol, 1991. **18**(12): p. 1783-6.
91. Doria, A., et al., *Defining unclassifiable connective tissue diseases: incomplete, undifferentiated, or both?* J Rheumatol, 2005. **32**(2): p. 213-5.
92. Bodolay, E., et al., *Five-year follow-up of 665 Hungarian patients with undifferentiated connective tissue disease (UCTD)*. Clin Exp Rheumatol, 2003. **21**(3): p. 313-20.
93. Danieli, M.G., et al., *Five-year follow-up of 165 Italian patients with undifferentiated connective tissue diseases*. Clin Exp Rheumatol, 1999. **17**(5): p. 585-91.



94. Mosca, M., et al., *Undifferentiated connective tissue disease: analysis of 83 patients with a minimum followup of 5 years*. J Rheumatol, 2002. **29**(11): p. 2345-9.
95. Mosca, M., et al., *Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD)*. Autoimmun Rev, 2006. **6**(1): p. 1-4.
96. Al Attia, H.M., *Borderline systemic lupus erythematosus (SLE): a separate entity or a forerunner to SLE?* Int J Dermatol, 2006. **45**(4): p. 366-9.
97. Ganczarczyk, L., M.B. Urowitz, and D.D. Gladman, "*Latent lupus*". J Rheumatol, 1989. **16**(4): p. 475-8.
98. Greer, J.M. and R.S. Panush, *Incomplete lupus erythematosus*. Arch Intern Med, 1989. **149**(11): p. 2473-6.
99. Laustrup, H., et al., *SLE disease patterns in a Danish population-based lupus cohort: an 8-year prospective study*. Lupus, 2010. **19**(3): p. 239-46.
100. Stahl Hallengren, C., O. Nived, and G. Sturfelt, *Outcome of incomplete systemic lupus erythematosus after 10 years*. Lupus, 2004. **13**(2): p. 85-8.
101. Swaak, A.J., et al., *Incomplete lupus erythematosus: results of a multicentre study under the supervision of the EULAR Standing Committee on International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT)*. Rheumatology (Oxford), 2001. **40**(1): p. 89-94.

102. Vila, L.M., et al., *Clinical outcome and predictors of disease evolution in patients with incomplete lupus erythematosus*. *Lupus*, 2000. **9**(2): p. 110-5.
103. Calvo-Alen, J., et al., *Identification of patient subsets among those presumptively diagnosed with, referred, and/or followed up for systemic lupus erythematosus at a large tertiary care center*. *Arthritis Rheum*, 1995. **38**(10): p. 1475-84.
104. Lastrup, H., et al., *Occurrence of systemic lupus erythematosus in a Danish community: an 8-year prospective study*. *Scand J Rheumatol*, 2009. **38**(2): p. 128-32.
105. Wandstrat, A.E., et al., *Autoantibody profiling to identify individuals at risk for systemic lupus erythematosus*. *J Autoimmun*, 2006. **27**(3): p. 153-60.
106. Heinlen, L.D., et al., *Clinical criteria for systemic lupus erythematosus precede diagnosis, and associated autoantibodies are present before clinical symptoms*. *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(7): p. 2344-51.
107. Li, Q.Z., et al., *Protein array autoantibody profiles for insights into systemic lupus erythematosus and incomplete lupus syndromes*. *Clin Exp Immunol*, 2007. **147**(1): p. 60-70.
108. Li, Q.Z., et al., *Interferon signature gene expression is correlated with autoantibody profiles in patients with incomplete lupus syndromes*. *Clin Exp Immunol*, 2010. **159**(3): p. 281-91.

109. Arnett, F.C., et al., *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1988. **31**(3): p. 315-24.
110. *Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma)*. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum*, 1980. **23**(5): p. 581-90.
111. Vitali, C., et al., *Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group*. *Ann Rheum Dis*, 2002. **61**(6): p. 554-8.
112. Bohan, A. and J.B. Peter, *Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts)*. *N Engl J Med*, 1975. **292**(7): p. 344-7.
113. Alarcon-Segovia, D. and M.H. Cardiel, *Comparison between 3 diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. Study of 593 patients*. *J Rheumatol*, 1989. **16**(3): p. 328-34.
114. van der Linden, S., H.A. Valkenburg, and A. Cats, *Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria*. *Arthritis Rheum*, 1984. **27**(4): p. 361-8.
115. Alarcon-Segovia, D., et al., *Preliminary classification criteria for the antiphospholipid syndrome within systemic lupus erythematosus*. *Semin Arthritis Rheum*, 1992. **21**(5): p. 275-86.

116. *Criteria for diagnosis of Behcet's disease. International Study Group for Behcet's Disease. Lancet, 1990. 335(8697): p. 1078-80.*
117. Leavitt, R.Y., et al., *The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. Arthritis Rheum, 1990. 33(8): p. 1101-7.*
118. Masi, A.T., et al., *The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Churg-Strauss syndrome (allergic granulomatosis and angiitis). Arthritis Rheum, 1990. 33(8): p. 1094-100.*
119. Jennette, J.C., et al., *Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. Arthritis Rheum, 1994. 37(2): p. 187-92.*
120. Lightfoot, R.W., Jr., et al., *The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of polyarteritis nodosa. Arthritis Rheum, 1990. 33(8): p. 1088-93.*
121. Mills, J.A., et al., *The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Henoch-Schonlein purpura. Arthritis Rheum, 1990. 33(8): p. 1114-21.*
122. Arend, W.P., et al., *The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Takayasu arteritis. Arthritis Rheum, 1990. 33(8): p. 1129-34.*

123. Calabrese, L.H., et al., *The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of hypersensitivity vasculitis*. *Arthritis Rheum*, 1990. **33**(8): p. 1108-13.
124. Olerup, O. and H. Zetterquist, *HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation*. *Tissue Antigens*, 1992. **39**(5): p. 225-35.
125. Davatchi, F., C. Chams, and M. Akbarian, *Evaluation of the 1982 American Rheumatism Association revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1985. **28**(6): p. 715.
126. Gilboe, I.M. and G. Husby, *Application of the 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus on a cohort of 346 Norwegian patients with connective tissue disease*. *Scand J Rheumatol*, 1999. **28**(2): p. 81-7.
127. Levin, R.E., et al., *A comparison of the sensitivity of the 1971 and 1982 American Rheumatism Association criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1984. **27**(5): p. 530-8.
128. Nived, O., G. Sturfelt, and F. Wollheim, *Systemic lupus erythematosus in an adult population in southern Sweden: incidence, prevalence and validity of ARA revised classification criteria*. *Br J Rheumatol*, 1985. **24**(2): p. 147-54.

129. Perez-Gutthann, S., M. Petri, and M.C. Hochberg, *Comparison of different methods of classifying patients with systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 1991. **18**(8): p. 1176-9.
130. Yokohari, R. and T. Tsunematsu, *Application, to Japanese patients, of the 1982 American Rheumatism Association revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1985. **28**(6): p. 693-8.
131. Kurien, B.T. and R.H. Scofield, *Autoantibody determination in the diagnosis of systemic lupus erythematosus*. Scand J Immunol, 2006. **64**(3): p. 227-35.
132. Tan, E.M., et al., *Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(9): p. 1601-11.
133. Dijkstra, S., E.J. Nieuwenhuys, and A.J. Swaak, *The prognosis and outcome of patients referred to an outpatient clinic for rheumatic diseases characterized by the presence of antinuclear antibodies (ANA)*. Scand J Rheumatol, 1999. **28**(1): p. 33-7.
134. Tsao, B.P., *Update on human systemic lupus erythematosus genetics*. Curr Opin Rheumatol, 2004. **16**(5): p. 513-21.
135. Lee, H.S., et al., *Independent association of HLA-DR and FCgamma receptor polymorphisms in Korean patients with systemic lupus erythematosus*. Rheumatology (Oxford), 2003. **42**(12): p. 1501-7.

136. Castano-Rodriguez, N., et al., *Meta-analysis of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 polymorphisms in Latin American patients with systemic lupus erythematosus*. *Autoimmun Rev*, 2008. **7**(4): p. 322-30.
137. Vasconcelos, C., et al., *HLA in Portuguese systemic lupus erythematosus patients and their relation to clinical features*. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. **1173**: p. 575-80.
138. Martin-Villa, J.M., et al., *Differential contribution of HLA-DR, DQ, and TAP2 alleles to systemic lupus erythematosus susceptibility in Spanish patients: role of TAP2\*01 alleles in Ro autoantibody production*. *Ann Rheum Dis*, 1998. **57**(4): p. 214-9.
139. Sanchez, E., et al., *No primary association of MICA polymorphism with systemic lupus erythematosus*. *Rheumatology (Oxford)*, 2006. **45**(9): p. 1096-100.
140. Holdsworth, R., et al., *The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens*. *Tissue Antigens*, 2009. **73**(2): p. 95-170.
141. Liphaus, B.L., M.H. Kiss, and A.C. Goldberg, *HLA-DRB1 alleles in juvenile-onset systemic lupus erythematosus: renal histologic class correlations*. *Braz J Med Biol Res*, 2007. **40**(4): p. 591-7.
142. Tarassi, K., et al., *HLA-TNF haplotype heterogeneity in Greek SLE patients*. *Clin Exp Rheumatol*, 1998. **16**(1): p. 66-8.

143. Lopez-Tello, A., et al., *Association of HLA-DRB1\*16 with chronic discoid lupus erythematosus in Mexican mestizo patients*. Clin Exp Dermatol, 2007. **32**(4): p. 435-8.
144. Lu, L.Y., et al., *Molecular analysis of major histocompatibility complex allelic associations with systemic lupus erythematosus in Taiwan*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(6): p. 1138-45.
145. Yoshida, K., et al., *Role of the MICA polymorphism in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(10): p. 3058-66.
146. Fojtikova, M., et al., *HLA class II, MICA and PRL gene polymorphisms: the common contribution to the systemic lupus erythematosus development in Czech population*. Rheumatol Int, 2011. **31**(9): p. 1195-201.
147. Marchini, M., et al., *HLA class II antigens associated with lupus nephritis in Italian SLE patients*. Hum Immunol, 2003. **64**(4): p. 462-8.
148. Smerdel-Ramoya, A., et al., *Systemic lupus erythematosus and the extended major histocompatibility complex--evidence for several predisposing loci*. Rheumatology (Oxford), 2005. **44**(11): p. 1368-73.
149. Manoussakis, M.N., et al., *Sjogren's syndrome associated with systemic lupus erythematosus: clinical and laboratory profiles and comparison with primary Sjogren's syndrome*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(3): p. 882-91.



150. Mosaad, Y.M., et al., *HLA-DRB1\*15 confers susceptibility to juvenile SLE but is not associated with disease presentation: an Egyptian Study*. Immunol Invest, 2010. **39**(3): p. 235-44.
151. Invernizzi, P., et al., *Classical HLA-DRB1 and DPB1 alleles account for HLA associations with primary biliary cirrhosis*. Genes Immun, 2012. **13**(6): p. 461-8.
152. Gibert, M., et al., *Functional categorization of HLA-DRB1 alleles in rheumatoid arthritis: the protective effect*. Hum Immunol, 2003. **64**(10): p. 930-5.
153. Mourad, J. and F. Monem, *HLA-DRB1 allele association with rheumatoid arthritis susceptibility and severity in Syria*. Rev Bras Reumatol, 2013. **53**(1): p. 47-56.
154. Chow, I.T., et al., *Differential binding of pyruvate dehydrogenase complex-E2 epitopes by DRB1\*08:01 and DRB1\*11:01 Is predicted by their structural motifs and correlates with disease risk*. J Immunol, 2013. **190**(9): p. 4516-24.
155. Murphy, G. and D. Isenberg, *Effect of gender on clinical presentation in systemic lupus erythematosus*. Rheumatology (Oxford), 2013.
156. Tan, T.C., et al., *Differences between male and female systemic lupus erythematosus in a multiethnic population*. J Rheumatol, 2012. **39**(4): p. 759-69.

157. Tan, E.M., et al., *A critical evaluation of enzyme immunoassays for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificities. I. Precision, sensitivity, and specificity.* Arthritis Rheum, 1999. **42**(3): p. 455-64.
158. Tan, E.M., et al., *A critical evaluation of enzyme immunoassay kits for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificities. II. Potential for quantitation of antibody content.* J Rheumatol, 2002. **29**(1): p. 68-74.
159. Podrebarac, T.A., D.M. Boisert, and R. Goldstein, *Clinical correlates, serum autoantibodies and the role of the major histocompatibility complex in French Canadian and non-French Canadian Caucasians with SLE.* Lupus, 1998. **7**(3): p. 183-91.
160. McHugh, N.J., et al., *MHC class II, tumour necrosis factor alpha, and lymphotoxin alpha gene haplotype associations with serological subsets of systemic lupus erythematosus.* Ann Rheum Dis, 2006. **65**(4): p. 488-94.
161. Taylor, K.E., et al., *Risk alleles for systemic lupus erythematosus in a large case-control collection and associations with clinical subphenotypes.* PLoS Genet, 2011. **7**(2): p. e1001311.



## **8. ANEXOS**



## 8.1 Anexo 1. Cebadores Utilizados para o Tipado HLA DRB1

Alelos amplificados	Secuencia Cebador 5'	Secuencia Cebador 3'	Tamaño producto pb	Tª PCR
DRB1*0101.*0103	TTG TGG CAG CTT AAG TTT GAA T	CTG CAC TGT GAA GCT CTC AC	255 pb	56°C
DRB1*0301	GAC GGA GCG GGT GCG GTA	CTG CAC TGT GAA GCT CTC CA	255 pb	56°C
DRB1*0301.*0302	TAC TTC CAT AAC CAG GAG A	CTG CAC TGT GAA GCT CTC CA	217 pb	60°C
DRB1*0302, *1302, *1305, *1402, *1403	TAC TTC CAT AAC CAG GAG A	TGC AGT AGT TGT CCA CCC G	151 pb	56°C
DRB1*0401*0411	GTT TCT TGG AGC AGG TTA AAC A	CTG CAC TGT GAA GCT CTC AC	189 pb	62°C
DRB1*0701*0702	CCT GTG GCA GGG TAA GTA TA	CTG CAC TGT GAA GCT CTC AC	260 pb	62°C
DRB1*0801.*0804	AGT ACT CTA CCG GTG AGT GTT	CTG CAC TGT GAA GCT CTC CA	260 pb	62°C
DRB1*0901	GTT TCT TGA AGC AGG ATA AGT TT	CCC GTA GTT GTG TCT GCA CAC	232 pb	55°C
DRB1*1001	CGG TTG CTG GAA AGA CGC G	CTG CAG TAG GTG TCC ACC AG	214 pb	56°C
DRB1*1101.*1104	GTT TCT TGG AGT ACT CTA CGT C	CCC GTA GTT GTG TCT GCA CAC	236 pb	53°C
DRB1*1201.*1202	AGT ACT CTA CCG GTG AGT GTT	CTG CAC TGT GAA GCT CTC AC	204 pb	57°C
DRB1*1301.*1302	TAC TTC CAT AAC CAG GAG GAG A	CTG GCT GTT CCA GTA CTC CT	176 pb	54°C
DRB1*1303.*1304	GTT TCT TGG AGT ACT CTA CGT C	CAC TGT GAA GCT CTC CAC AG	248 pb	55°C
DRB1*1305, *1402, *1403	TAC TTC CAT AAC CAG GAG GAG A	CCC GCT CGT CTT CCA GGA T	130 pb	57°C
DRB1*1401, *1404	GTT TCT TGG AGT ACT CTA CGT C	TGT TCC AGT ACT CGG CGC T	171 pb	53°C
DRB1*1405	AGT ACT CTA CCG GTG AGT GTT	TCC ACC GCG GCC CGC C	140 pb	61°C
DRB1*1501.*1502	TCC TGT GGC AGC CTA AGA G	TCT GCA ATA GGT GTG CAC CT	224 pb	54°C
DRB1*1601*1602	TCC TGT GGC AGC CTA AGA G	TCT GCA ATA GGT GTG CAC CT	215 pb	54°C
		CCG CGC CTG CTC CAG GAT	197 pb	60°C
		AGG TGT CCA CCG CGG CG	213 pb	60°C



## 8.2 Anexo 2. Consentimento Informado

### CONSENTIMENTO DO PACIENTE PARA ESTUDOS XENÉTICOS

Título do Proxecto de Investigación: Estudo de alelos HLA-DRB1 en pacientes con lupus eritematoso incompleto

Investigador Principal: Brenda Maure. Servizo de Medicina Interna. Complexo Hospitalario Universitario de Vigo.

1. Eu \_\_\_\_\_  
declaro baixo a miña responsabilidade que lín a Folla de Información sobre o estudo e acepto participar neste estudo xenético.
2. Entregóuseme unha copia da Folla de Información ao paciente e unha copia deste consentimento informado, datado e asinado. Explicáronseme as características e o obxectivo do estudo xenético e os posibles beneficios e riscos que podo esperar. Déuseme tempo e oportunidade para realizar preguntas. Todas as preguntas foron respondidas á miña enteira satisfacción.
3. Sei que se manterá en segredo a miña identidade e que se identificará o meu sangue e as miñas mostras de ADN cun número codificado.
4. Son libre de retirarme do estudo xenético en calquera momento por calquera motivo, sen ter que dar explicación e sen que repercuta negativamente sobre o meu tratamento médico futuro. Tras iso procederase á destrución da mostra codificada. Se se retirou previamente o vencello de identificación da mostra, non se poderá relacionar comigo, de forma que non se poderá destruír.
5. Entendo que o obxectivo do estudo xenético é avaliar a poboación obxecto do estudo e que os resultados do mesmo non se comunicarán nin a min nin ao meu médico, excepto no caso de que devanditos achados teñan unha implicación

significativa para a saúde dos participantes e que exista unha posibilidade real de mellorar esa condición de saúde.

Punto 1.- Eu DOU / Non DOU o meu consentimento voluntariamente para que se poida realizar o estudo xenético referente ao lupus eritematoso sistémico na miña mostra de ADN

Punto 2.- Eu DOU / Non DOU o meu consentimento voluntariamente para que se garde a miña mostra de ADN, con desvinculación da identidade. Isto permitirá a realización de novas probas no futuro cando se teñan máis coñecementos sobre os xenes relacionados coa enfermidade.

Punto 3.- Eu DOU / Non DOU o meu consentimento voluntariamente para que na miña mostra de ADN desvinculada de poidan realizar futuros estudos noutras enfermidades autoinmunes.

Consinto en participar voluntariamente no apartado marcado deste estudo xenético

Data:

Firma do paciente



### 8.3 Anexo 3. Difusión de Resultados

Datos parciais deste traballo foron comunicados en congresos:

- *Maure B, Sopena B, Vázquez-Triñanes C, Argibay A, Constenla L, Rivera A, Freire MC, Pazos N, Martínez-Vázquez C.* Alelos HLA DRB1 en Pacientes con Lupus Eritematoso Incompleto. Comunicación oral. XXVIII Reunión da Sociedade Galega de Medicina Interna. Ferrol, 13-14 de maio de 2011.
- Premio á Mellor Comunicación oral na XXVIII Reunión da Sociedade Galega de Medicina Interna. Ferrol, 13-14 de maio de 2011
- *B. Maure, B. Sopena, L. Constenla, A.B. Argibay, C. Vázquez-Triñanes, A. Rivera, C. Martínez-Vázquez.* HLA DRB1 Alleles in Incomplete Lupus Eritematosus. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR). Berlin, 6-9 de xuño de 2012. *Ann Rheum Dis* 2012;71(Suppl3):648

