

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

INFORME DE SERVICIO SOCIAL


**HLA DR EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO
CUTÁNEO Y LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO**


QUE PRESENTA LA ALUMNA

Carmen Rosalía Montufar Cardona

MATRÍCULA: 205350664

ASESORES:

EXTERNO: Dra. Olivo Díaz María Angélica Alfonsina 
Jefa del Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad
Del Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

INTERNO: Dra. Hamdan Partida Aida 
Departamento de Atención a la salud
N° Económico: 26343

Lugar de realización: Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

Fecha de terminación: Febrero 2023

INTRODUCCIÓN

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC: *major histocompatibility complex*) representa una región génica que codifica las moléculas de histocompatibilidad responsables de la presentación de antígenos al sistema inmunológico. En el humano, el MHC está localizado en el brazo corto del cromosoma 6, denominado sistema HLA (*human leukocyte antigens*) (Klein & Sato, 2000). Los genes del sistema HLA se han agrupado didácticamente en tres regiones (Turner, 2004): clase I, II y III. La región de clase I engloba a los *loci* HLA-A, -B y -C, que codifican para las moléculas clásicas de histocompatibilidad expresadas en la superficie de todas las células nucleadas. La región de clase II se compone de los *loci* HLA-DR, -DQ y -DP, que codifican las moléculas de histocompatibilidad presentes en la superficie de las células presentadoras de antígeno. La región de clase III no codifica moléculas de histocompatibilidad, pero sí otras moléculas, como los factores de necrosis tumoral, las proteínas C4, C2 y el factor B del sistema del complemento, la proteína de choque térmico y la enzima 21-hidroxilasa (Kuroiwa et al., 1998). La función principal de las moléculas HLA es la presentación de péptidos antigénicos a los linfocitos T, que es necesaria para desencadenar la respuesta inmunológica adaptativa (Singh et al., 1997). Diversos antígenos y alelos clase I y clase II se han asociado con susceptibilidad, protección y manifestación clínica de diferentes enfermedades, entre las que se encuentran las autoinmunes, infecciosas, neoplásicas e idiopáticas (Thorsby, 1997). Se han sugerido varios mecanismos para explicar esos hallazgos (Navarrete, 2000), siendo los más evidentes: (a) mimetismo molecular entre ciertos péptidos del patógeno y péptidos derivados del hospedero; (b) desequilibrio de ligamiento entre moléculas de histocompatibilidad y otros genes dentro o fuera del MHC que estén involucrados con la enfermedad; (c) moléculas HLA actuando como receptores para algunos agentes etiológicos; (d) selección del péptido presentado al sistema inmunológico por la molécula HLA; (e) inducción de la expresión de antígenos HLA clase II en tejidos que normalmente no se expresan.

El lupus eritematoso es un padecimiento autoinmune con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que van desde formas cutáneas (LEC) a una enfermedad multisistémica. El lupus eritematoso discoide (LED) y el lupus eritematoso subagudo

(LECSA) son las formas clínicas que afectan primariamente la piel (Callen, 2004). En el LECSA se reconocen dos patrones: psoriasisiforme y papuloescamoso y una forma anular con lesiones maculopapulosas.

MARCO DE REFERENCIA

En el desarrollo del LEC están involucrados múltiples factores. Los estudios experimentales sugieren una fuerte asociación con los genes polimórficos que codifican moléculas reguladoras (como HLA, TNF- α y complemento), especialmente en pacientes anti-Ro-positivos. La variación de la expresión de la enfermedad puede atribuirse a una predisposición genética conferida, probablemente, por determinados polimorfismos genéticos, como los del sistema HLA (Millar & McGregor, 2001).

Los antígenos HLA-B8 y -DR3 se han asociado con el desarrollo de LECSA. En algunos estudios, el antígeno HLA-DR3 se ha observado en más del 50% de los pacientes con LECSA. El antígeno HLA-DR3 mostró asociación especialmente con el subtipo anular y con la presencia de anticuerpos anti-Ro-SSA (Bielsa et al., 1991). El lupus eritematoso neonatal también se ha asociado al antígeno HLA-DR3 materno (David-Bajar, 1993). En relación a la asociación del HLA con LED, se destacan los antígenos HLA-A1, -B8, -DR3, -B7 y -DR2 en pacientes caucásicos (Millard & McGregor, 2001).

En LES se ha encontrado asociación de los antígenos HLA-DR2 y -DR3 con susceptibilidad en diferentes grupos étnicos, principalmente en caucásicos europeos y también se describe una fuerte asociación de los antígenos HLA-DR y -DQ con los auto-anticuerpos relacionados con LES (Buyon, 1992).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La piel es el segundo órgano más afectado por lupus eritematoso, después de las articulaciones (Mok & Lau, 2003). Hasta ahora no existen estudios poblacionales adecuados que evalúen la verdadera prevalencia e incidencia de lúpus eritematoso discoide (LED) en ausencia de lupus eritematoso sistémico (LES), ya que suelen ser subrepresentados y/o sobrerrepresentados en los estudios realizados por Reumatólogos, Internistas y Dermatólogos. Además de que generalmente se aplican los

criterios de clasificación de LES del Colegio Americano de Reumatología, los cuales no consideran la confirmación histológica de los cuatro criterios mucocutáneos que se incluyen, de tal manera que un paciente con Lupus Eritematoso Cutáneo (LEC) fácilmente cumple cuatro criterios sin tratarse verdaderamente de LES (Wakeland *et al.*, 2001) (McCauliffe & Sontheimer, 2007)

JUSTIFICACIÓN

Ante la notable diferencia de comportamiento clínico entre las formas de lupus eritematoso limitado a piel que se ven con mayor frecuencia en la consulta dermatológica y el lupus eritematoso con presencia de anticuerpos, alteraciones hematológicas y afección de órganos internos como articulaciones, riñón, serosas, cerebro vistos con mayor frecuencia en las consultas de Medicina Interna y Reumatología, vale la pena indagar si existen diferencias en los genes que modulan la respuesta inmunológica en estas formas de lupus eritematoso; por lo que este proyecto de manera indirecta trata de evaluar diferencias en la frecuencia de los alelos del gen HLA-DRB1 entre pacientes con LES y LEC.

OBJETIVO

Determinar si los alelos de HLA-DR más frecuentes en los pacientes mexicanos, son diferentes entre los pacientes con LEC y LES.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

Se incluyeron 31 pacientes de LEC que no tuvieran evidencia clínica de afección a otros órganos y que no presentaran linfopenia de $1500/\text{mm}^3$ o menor, proteinuria, o títulos de anticuerpos antinucleares de 1:320 o mayor; 41 casos de LES definidos por la presencia de anticuerpos antinucleares a títulos de 1:320 o mayor, anti DNA y/o anti Sm, con afección de órganos internos (serosas, riñón, cerebro, articulaciones, alteraciones hematológicas) y 158 sujetos aparentemente sanos, provenientes de población abierta.

A cada individuo se le tomaron 10 mL de sangre y se obtuvo el DNA utilizando el método de fenol/cloroformo.

Las muestras utilizadas provienen de pacientes con LEC y LES obtenidas por el Laboratorio de Biología molecular e Histocompatibilidad del Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Amplificación de DNA por PCR

Se realizó la amplificación del segundo exón del gen DRB1, mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron tres estrategias para la obtención de los resultados: a) Amplificación secuencia específica (SSP), para determinar los alelos de DR7, DR8, DR9 y DR10; b) Amplificación de grupo, para después determinar los alelos por medio de sondas específicas (SSOP), mediante Dot-Blot y quimioluminiscencia, alelos de DR1, DR2 (DR15 y DR16), DR3, DR5 (DR11 y DR12), DR6 (DR13 y DR14) y c) Amplificación de grupo y digestión con enzimas de restricción (PCR-RFLP), alelos del DR4. Para el cual se utilizaron iniciadores específicos diseñados por el XII Taller Internacional de Histocompatibilidad (Tabla 1) y un equipo termociclador AXYGENE durante 35 ciclos bajo las condiciones enlistadas en la tabla 2 (Bignon & Fernandez, 1996).

Tabla 1. Indicadores para la amplificación de LOCI HLA- DR			
Nombre	Codones exón 2	Secuencia	Tamaño de la banda
<i>DR1-DRB1</i>			
2DRBAMP-1	8-14	TTC TTG TGG CAG CTT AAG TT	259 bp
2DRBAMP-B	87-94	CCG CTG CAC TGT GAA GCT CT	
<i>DR2-DRB1</i>			
2DRBAMP-2	7-13	TTC CTG TGG CAG CCT AAG AGG	259 bp
2DRBAMP-B	87-94	EL MISMO QUE PARA DR1-DRB1	
<i>DR4-DRB1</i>			
2DRBAMP-4	6-13	GT TTC TTG GAG CAG GTT AAA C	257 bp
2DR86AMP-GR	86-92	CTG CAC TGT GAA GCT CTC AC	
2DR86AMP-VR	86-92	CTG CAC TGT GAA GCT CTC CA	

DR52-DRB1			
2DRBAMP-3	5-12	CA CGT TTC TTG GAG TAC TCT AC	260 bp
2DR86AMP-GR	86-92	EL MISMO QUE PARA DR4-DRB1	
2DR86AMP-VR	86-92	EL MISMO QUE PARA DR4-DRB1	

Tabla 2. Condiciones para la amplificación de genes de HLA-DR				
Gen	Desnaturalización	Alineación	Extensión	MgCl ₂ Final
DR1-DRB1	94 ^o C/ 1 min	56 ^o C/ 1 min	72 ^o C/ 1 min	1.5 mM
DR2-DRB1	94 ^o C/ 1 min	62 ^o C/ 1 min	72 ^o C/ 1 min	1.5 mM
DR4-DRB1	94 ^o C/ 1 min	62 ^o C/ 1 min	72 ^o C/ 1 min	1.5 mM
DR52-DRB1	94 ^o C/ 1 min	58 ^o C/ 1 min	72 ^o C/ 1 min	1.5 mM

Verificación de la amplificación

Se tomaron 10 µl del producto de cada amplificación y se les añadieron 3 µl de colorante para corrimiento (50% glicerol; 0.01% rojo de cresol). Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 2% con TAE y 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, durante 60 min a 90 voltios. Las amplificaciones positivas se observaron bajo luz UV y se fotografiaron para su registro. Para definir el alelo en la tipificación SSP, es suficiente la presencia de la banda de amplificación.

Dot-Blot del producto del PCR

Los productos de PCR obtenidos de las amplificaciones de grupo se colocaron en una membrana de nylon utilizando un aparato de Dot-Blot (Bio-Rad). El DNA en la membrana se desnaturalizó en una solución de NaOH 0.4M y se fijó con luz UV durante 1 min. Posteriormente se realizó la prehibridación de la membrana con una solución de SSPE 6X, Denhart 5x, ssDNA 100 µg/mL, lauril sarcosina 0.1%, SDS 0.02%, durante toda la noche a 42°C.

Posteriormente se realizó la hibridación con sondas específicas marcadas con DIG-dd-UTP en su extremo 3' y se detectó la hibridación por el método de quimioluminiscencia,

que consistió en realizar una serie de lavados, identificando el nucleótido marcado mediante un anticuerpo anti-DIG acoplado a la enzima fosfatasa alcalina. Para la visualización de la quimioluminiscencia se adicionó CSPD que es el sustrato de la fosfatasa alcalina, que al ser desfosforilado emite luz a 477nm, la membrana se expone y se obtiene una autoradiografía.

Tipificación de los alelos del DR4 mediante digestión del fragmento de PCR

La tipificación de los alelos del DR4 se realizó por medio de la digestión del fragmento de PCR con la 5 diferentes enzimas de restricción: HphI, BstUI, Haell, HinfI y FokI en baño maría a 37°C durante toda la noche. Los fragmentos se separaron por electroforesis poliácridamida al 6% y se evidenciaron mediante la tinción con bromuro de etidio a 0.5 µg/mL y luz UV, fotodocumentándose en un aparato UVP. En las tablas 3-8 se muestran las sondas que se emplearán para la tipificación (Mok & Lau, 2003).

Tabla 3. Sondas para la tipificación de DRB1-DR1			
No. de Sonda	T_m °C	Alelo(s)	
5701	58	*0101,0102,0103,0104	
7001	64	*101,0102,0104	
7007	56	*0103	
7032W	56	*0401	
8601	58	*0101,0103	
8602	58	*0102	
8603	58	*0104	
Sondas para la tipificación de DRB1-DR2			
No. de sonda	T_m °C	Alelo (s)	
2817	56	*1503	
3702	58	*1501,15021,15022,1503,1504,1505,1601,1602,1603,1604,1605,1606	
4701W	66	*1601,1602,1603,1604,1605,1606	
4702W	66	*1501,15021,15022,1503,1504,1505	
5701W	58	*15022	
5706	58	*1501,15021,1503,1504,1505,1601,1602,1603,1604,1605,1606	

7002	56	*1601,1603,1604
7003	58	*1602
7010W	58	*1605
7011	60	*1501,15021,15022,1503
7013W	66	*1603,1606
7014W	66	*1601,1602,1605
7019W	56	*1504,1601,1603,1604
7030	62	*1604
7037W	60	*1504
8603	58	*1501,1503,1504,1505

Tabla 4. Sondas para la tipificación de DRB1-DR4 GR

No. sonda	de	Tm^oC	Alelo (s)
3704	54		*0401,0405,0407,0408,0409,0414,0416,0417
3715	56		*0419,0420,0421
5701	58		*0401,0407,0408,0414,0419,0420,0421
5702	60		*0405,0409,0417
5703	56		*1122
5704	62		-----
5710W	58		*0416
7001	62		*0405,0407,0408,0417,0419,0420
7005	64		*0401,0409,0416,0421
7006	64		*0407,0417,0420
7007	56		*0414
7009	66		-----
7010W	58		-----
7012	66		*0405,0408,0419
8601	56		*0401,0405,0407,0408,0409,0414,0416,*0417, 0419,0420,04021,1122
8603	56		-----

Tabla 5. Sondas para la tipificación de DRB1-DR4 VR

No. de sonda	Tm^o C	Alelo (s)
3407	54	*0402,0403,0404,0406,0410,0411,0412, 0413,0415, 0416
3715	56	*0406
5701	58	*0402,0403,0404,0406,0413,0416,0422
5702	60	*0410,0411,0412
5703	56	*0415
5704	62	*1410
5710W	58	-----
7001	62	*0403,0404,0406,0410,0411
7002	56	*0415
7005	64	*0413,0422
7007	56	*0402
7009	66	*1410
7010W	58	*0412,0418
7012	66	*0404,0410
8601	56	-----
8603	56	*0402,0403,0404,0406,0410,0411,0412,0413, 0415,0418,0422,1410

Tabla 6. Sondas para la tipificación de alelos DRB1 asociados DR52 GR

No de sonda	Tm^o C	Alelo (s)
1003	58	*0302,01011,11012,11081,11082,1109,1110,1111,1112,11302,1303,1305,1307,1312, *1313,1402,1403,1407,1409,1413,1414
2809W	56	*0302,1402,1402,1413
3703	58	*0302,1302,1109,1305,1402,1403,1409,1413
3713	58	*1101,1105,1108,1111,0801,08021,08022,8032,0805,0807,0808,08011,1303,1307, *1312,1313
5701	58	*0302,08021,08022,0809,1302,1305,1307,1402,1403,1409,1414
5702	60	*0801,0803,0805,1303,1312,1313,1413
5703	60	*1101,1105,1108,1109,1110,1111,1112

7002	56	*0801,0802,0805,0807,0809,0811,1101,1105,1109,1110,1112,1305,1307
7003	58	*11081,11082,1403
7004	60	*0302
7007	56	*1302
7010W	58	*08031,08032,1312,1313
7012	66	*1402,1409,1413
7013	64	*1303
7016	62	*11011,11012,1105,11081,11082,1109,1110,1112,1305,1307,1312,1313
7018	56	*1302,1303,1312,1313,08031,08032

Tabla 7. Sondas para la tipificación de alelos DRB1 asociados con DR52 VR			
No. de Sonda	Tm^oC	Alelo (s)	
1005W	56	*0804,0806,0810,1201,1202,1203,1404,1411,1415	
2807	56	*03011,03012,0304	
2809	56	*0303,1406,1412	
3702W	58	*0304	
3705W	62	*1201,1202,1203	
3712	60	*1113,1308,1401,1404,1405,1408,1411,1415,1416	
5702	60	*0806,0810,1304	
5703	60	*1102,1103,1104,1106,1107,1113,1411	
5704	62	*1401,1404,1416	
7007	56	*1102,1301,1304,1308,1416	
7010	58	*0810,1201,1203,1306	
7012	66	*1406,1417	
7016	62	*11041,11042,1106,1203,1306,1311,0805	
7032	54	*03012	
8602	58	*1106,1201,1202	

Tabla 8. Sondas para la tipificación de alelos DRB1-DR8 asociados con DR52 GR			
No. de sonda	Tm^oC	Alelo (s)	
3713	54	*0802	
5701	60	*0802,0809	

5702	60	*0801,0803,0805
5704	62	*0808,1407
7002	60	*0801,0802,0805,0807,0808,0809,0811
7010	58	*0803
7016	58	*1101,1105,1108,1110,1112,1305,1307,1312,1313,0805

Las mezclas de iniciadores utilizadas para la amplificación por SSP no provinieron de fuentes comerciales, todas estas mezclas son estandarizadas y algunas nuevas fueron diseñadas en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Inmunogenética del Hospital General Dr. Manuel Gea González, con base en las secuencias de los alelos HLA-clase II publicadas en la literatura (Aldener-Cannavá & Olerup, 1994). En la tabla 9 se muestran las condiciones para la amplificación de alelos DRB1.

Tabla 9. PCR-SSP para los alelos DRB1-DR7, -DR9 Y -DR10				
Mezcla	Parejas de iniciadores		Alelos	Tamaño
DR7	R5'07	R3'079	*0701	189 pb
DR9	R5'09	R3'091	*09011,09012	200 pb
DR10	R5'10	R3'047	*1001	204 pb

Análisis estadístico

Se calcularon las frecuencias alélicas (FA) por conteo directo. Para probar asociaciones significativas entre los alelos y la enfermedad, se utilizó la prueba de X^2 con la corrección de Yates, o la prueba exacta de Fisher. En el caso de asociación de alelos particulares, se calculó la razón de momios (OR), la fracción etiológica (FE) o la fracción preventiva (FP). Se utilizó la corrección de Bonferroni de múltiples comparaciones.

RESULTADOS

Los resultados pertenecen a la Dra. Olivo Díaz María Angélica Alfonsina, Jefa del Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad, Del Hospital General "Dr. Manuel Gea González.

En las figuras 1, 2 y 3 se muestran las frecuencias de los alelos DRB1 en pacientes con lupus, lupus cutáneo y lupus sistémico, respectivamente y en testigos.

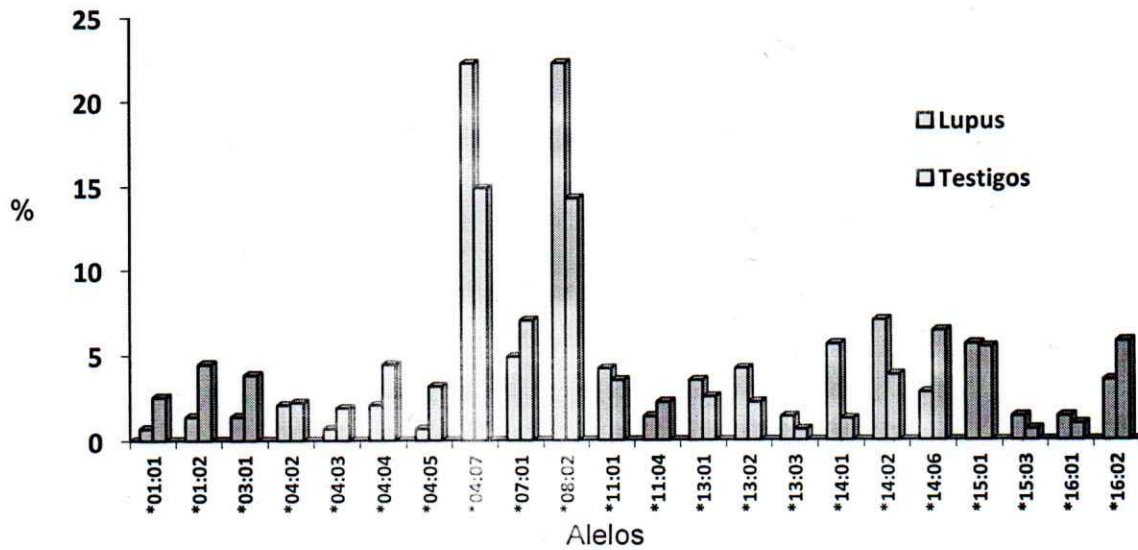


Fig.1. Alelos de DRB1 encontrados en todos los pacientes con lupus.

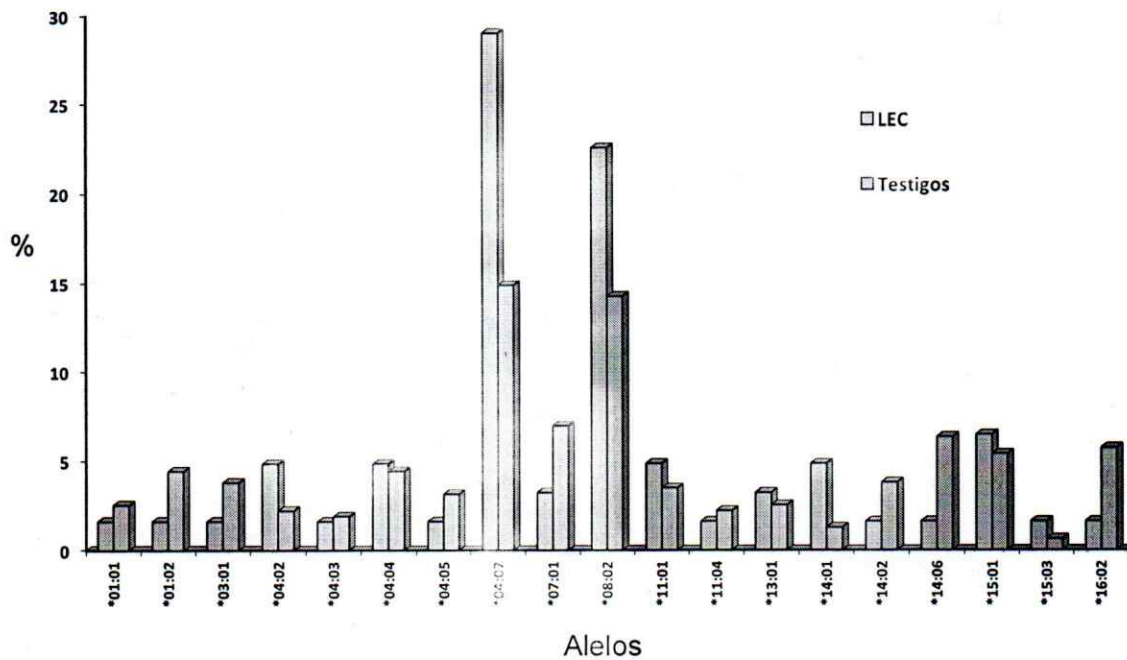


Fig. 2. Alelos de DRB1 encontrados en todos los pacientes con LEC.

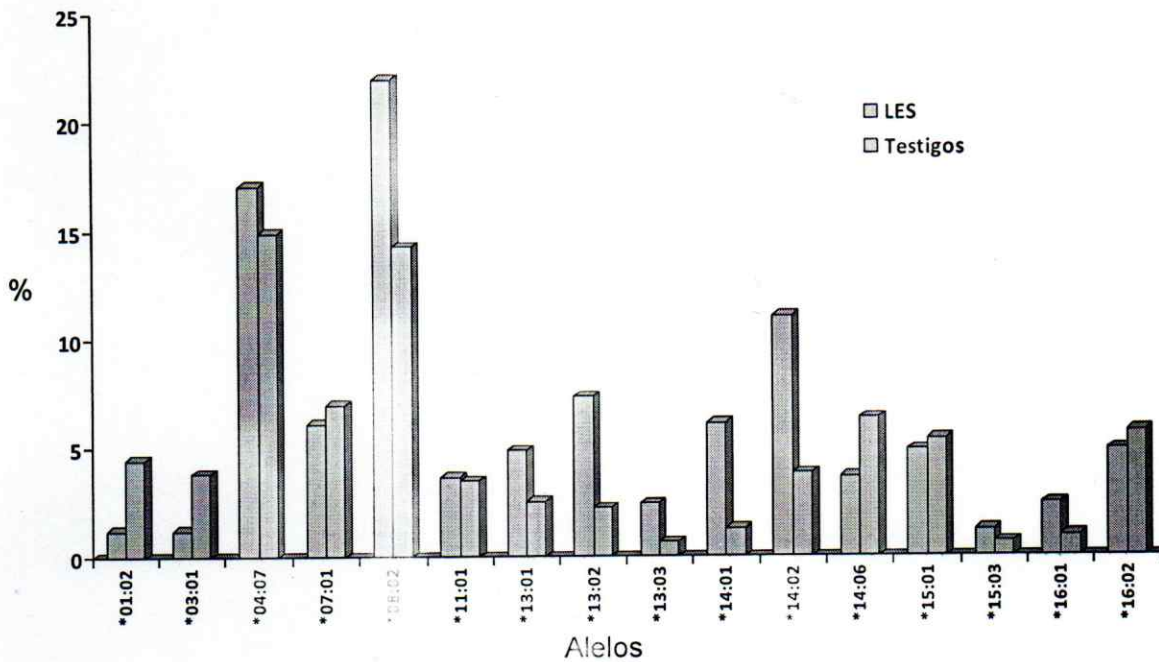


Fig. 3. Alelos de DRB1 encontrados en todos los pacientes con LES.

Tabla 10. Alelos de DRB1 asociados a lupus, lupus cutáneo y lupus sistémico

Alelos	Pacientes FA ^b (%)	Testigos FA (%)	<i>p</i> *	<i>pc</i> **	OR(95%IC) ^a
Lupus					
*08:02	22.22	14.24	0.011	0.246	2.20 (1.23-3.94)
*14:01	5.56	1.27	0.017	0.367	4.52 (1.32-15.56)
LEC^c					
*04:07	29.03	14.87	0.021	0.398	2.66 (1.21-5.82)
LES^d					
*08:02	21.95	14.24	0.050	0.795	2.16 (1.06-4.39)
*13:02	7.32	2.22	0.045	0.726	3.70 (1.17-11.69)
*14:01	6.10	1.27	0.026	0.410	5.17 (1.32-20.24)
*14:02	10.98	3.80	0.017	0.276	3.43 (1.33-8.82)
LEC vs.LES					
*14:02	1.61	10.98	0.009	0.115	0.17 (0.02-1.41)

*Probabilidad ***p* corregida (Corrección de Bonferroni); ^a Razón de momios (Odds ratio (95%Intervalo de confianza)); ^b Frecuencia alélica; ^c Lupus eritematoso cutáneo; ^d Lupus eritematoso sistémico.

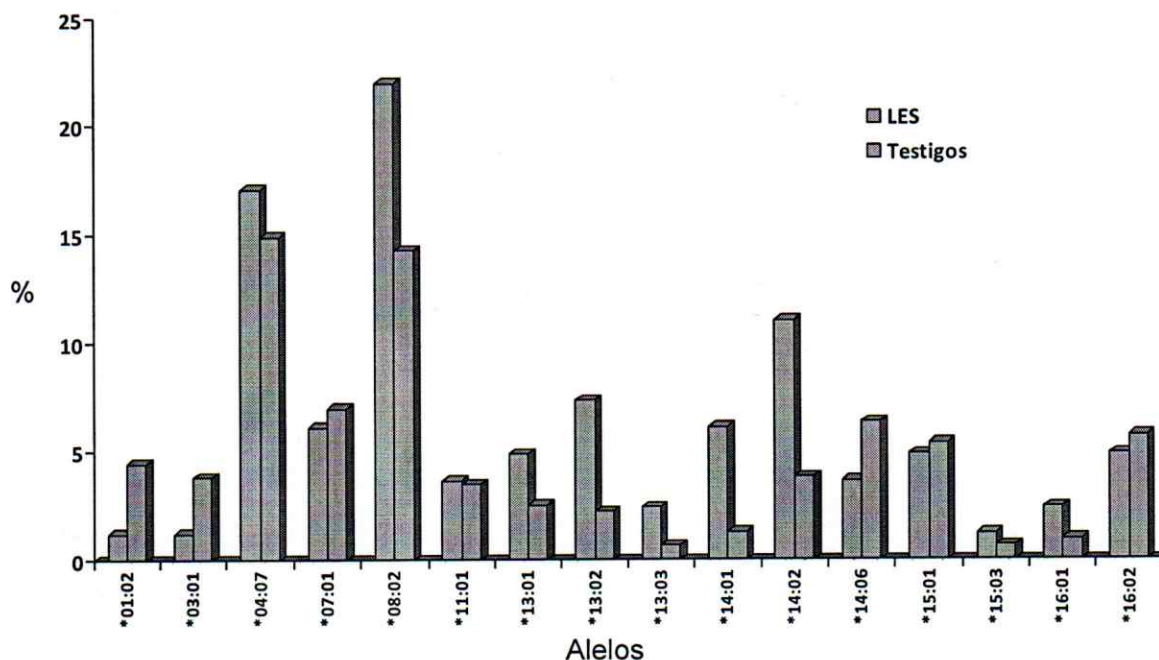


Fig. 3. Alelos de DRB1 encontrados en todos los pacientes con LES.

Tabla 10. Alelos de DRB1 asociados a lupus, lupus cutáneo y lupus sistémico

Alelos	Pacientes FA ^b (%)	Testigos FA (%)	<i>p</i> *	<i>pc</i> **	OR(95%IC) ^a
Lupus					
*08:02	22.22	14.24	0.011	0.246	2.20 (1.23-3.94)
*14:01	5.56	1.27	0.017	0.367	4.52 (1.32-15.56)
LEC^c					
*04:07	29.03	14.87	0.021	0.398	2.66 (1.21-5.82)
LES^d					
*08:02	21.95	14.24	0.050	0.795	2.16 (1.06-4.39)
*13:02	7.32	2.22	0.045	0.726	3.70 (1.17-11.69)
*14:01	6.10	1.27	0.026	0.410	5.17 (1.32-20.24)
*14:02	10.98	3.80	0.017	0.276	3.43 (1.33-8.82)
LEC vs.LES					
*14:02	1.61	10.98	0.009	0.115	0.17 (0.02-1.41)

*Probabilidad ***p* corregida (Corrección de Bonferroni); ^a Razón de momios (Odds ratio (95%Intervalo de confianza)); ^b Frecuencia alélica; ^c Lupus eritematoso cutáneo; ^d Lupus eritematoso sistémico.

DISCUSION

El análisis de X^2Y mostró diferencias significativas en varios alelos (Tabla 10). En el grupo total de lupus, los alelos DRB1*08:02 y DRB1*14:01 están asociados a susceptibilidad. En los pacientes con LEC el alelo DRB1*04:07 se encontró incrementado significativamente en los pacientes, mientras que en los pacientes con LES, los alelos DRB1*08:02, DRB1*13:02, DRB1*14:01, DRB1*14:02, se asociaron a susceptibilidad. Cuando se compararon los pacientes de LEC vs. LES, se observó que el alelo DRB1*14:02 es de protección para la evolución a lupus sistémico.

En el lupus eritematoso sistémico (LES) el haplotipo HLA-DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201 está asociado con riesgo de lupus eritematoso sistémico, así como el alelo DRB1*1501 y al contrario, el alelo HLA-DRB1 *0802 se asocia como protector (Granados et al., 2022). Cabrera- Calzadilla *et al.*, (2018) evidenciaron que el alelo HLADRB1*08:02 y HLA-DQB1*04:02 presentan un OR = 0,46 ($p=0.004$), asociándose como alelos de protección contra LES. Mientras que los alelos que representan riesgo son HLA-DRB1*03:01, 04:04, 09:01 y HLA-DQB1*03:03, 02:01.

CONCLUSIONES

Se encontró que los alelos de HLA-DR más frecuentes en los pacientes mexicanos, son diferentes entre los pacientes con Lupus cutáneo y Lupus sistémico. Po ello la necesidad de realizar diversos estudios en diferentes poblaciones o regiones demográficas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aldener-Cannavá, A., & Olerup, O. (1994). HLA-DQB1 'LOW-RESOLUTION'TYPING BY PCR AMPLIFICATION WITH SEQUENCE-SPECIFIC PRIMERS (PCR-SSP). *International Journal of Immunogenetics*, 21(6), 447-455.
2. Bielsa, I., Herrero, C., Ercilla, G., Collado, A., Font, J., Ingelmo, M., & Mascaró, J. M. (1991). Immunogenetic findings in cutaneous lupus erythematosus. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 25(2), 251-257.

3. Bignon, J. D., & Fernandez-Vina, M. (1996). PCR-SSO protocol for the HLA-DNA typing technique. In Twelfth International Histocompatibility Workshop Reference Protocol Addendum. Technical Handbook (p. 4). HLA et Medecine.
4. BUYON, J. P. (1992). Neonatal lupus syndromes. *American Journal of Reproductive Immunology*, 28(3-4), 259-263.
5. Cabrera-Calzadilla, S., Sosa-Tordoya, L. F., Terán de Baudoim, M. D. A., & Plata-Cornejo, R. (2018). Asociación genética entre los loci hla-drb1 y hla-dqb1 con la susceptibilidad a padecer lupus eritematoso sistémico. *Cuadernos Hospital de Clínicas*, 59(ESPECIAL), 22-30.
6. Callen, J. P. (2004). Update on the management of cutaneous lupus erythematosus. *British Journal of Dermatology*, 151(4), 731-736.
7. Carvallo, A. (2020). Lupus Eritematoso Cutáneo y Lupus Eritematoso Sistémico. Revisión de una historia sin fin. *Rev. chil. reumatol*, 24-30.
8. David-Bajar, K. M. (1993). Subacute cutaneous lupus erythematosus. *Journal of investigative dermatology*, 100(1), S2-S8.
9. Klein, J. A. N., & Sato, A. (2000). The HLA system. *New England Journal of Medicine*, 343(10), 702-709.
10. Kuroiwa R.S., Segami S I., Díaz V.R., Torres F C. Antígeno Leucocitario Humano (HLA) en Artritis Reumatoide y Lupus Eritematoso Sistémico. *Revista Peruana de Reumatología: Volumen 4 N° 2, Año 1998 LIMA-PERÚ*.
11. McCauliffe, D. P., & Sontheimer, R. D. (2007). Lupus erythematosus-specific skin disease. *Dubois' Lupus Erythematosus*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
12. Millard, T. P., & McGregor, J. M. (2001). Molecular genetics of cutaneous lupus erythematosus. *Clinical and experimental dermatology*, 26(2), 184-191.
13. Mok, C. C., & Lau, C. S. (2003). Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Journal of clinical pathology*, 56(7), 481-490.
14. Navarrete, C. V. (2000). The HLA system in blood transfusion. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 13(4), 511-532.
15. Singh, N., Agrawal, S., & Rastogi, A. K. (1997). Infectious diseases and immunity: special reference to major histocompatibility complex. *Emerging Infectious Diseases*, 3(1), 41.
16. Sontheimer, R. D. (2007). Lupus-specific skin disease (cutaneous LE). *Dubois' lupus erythematosus*, 576-620.

17. Thorsby, E. (1997). Invited anniversary review: HLA associated diseases. *Human immunology*, 53(1), 1-11.
18. Turner, D. (2004). The human leucocyte antigen (HLA) system. *Vox sanguinis*, 87, 87-90.
19. Wakeland, E. K., Liu, K., Graham, R. R., & Behrens, T. W. (2001). Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity*, 15(3), 397-408.