



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Asociación de Antígenos Leucocitarios Humanos de Clase II (HLA-II) con Esclerosis Sistémica Progresiva en una cohorte de pacientes colombianos**

**Daniel Jaramillo Arroyave**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Interna  
Bogotá D.C., Colombia

2014

# **Asociación de Antígenos Leucocitarios Humanos de Clase II (HLA-II) con Esclerosis Sistémica Progresiva en una cohorte de pacientes colombianos**

**Daniel Jaramillo Arroyave**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título  
de:

**Especialista en Reumatología**

Director (a):

Dr. Jorge Eduardo Caminos M.D., PhD.

Línea de Investigación:

Esclerosis Sistémica - Inmunogenética

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Interna  
Bogotá D.C., Colombia

2014

*A mi esposa Dulcinea, motor de mi vida y musa inspiradora para cumplir mis  
sueños...*

*A mis padres Sergio e Inés y mi hermana Ana María, motivadores y apoyo para  
seguir creciendo...*

**Agradecimientos**

A mis queridos maestros: Antonio Iglesias, Jorge Eduardo Caminos y Federico Rondón, gracias por la paciencia y la entrega.

A la unidad de reumatología, al departamento de bioquímica, al laboratorio de genética humana, todos parte de la gloriosa Universidad Nacional de Colombia.

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>Lista de Tablas -----</b>	<b>7</b>
<b>Resumen -----</b>	<b>8</b>
<b>Introducción-----</b>	<b>14</b>
<b>1. Marco Teórico-----</b>	<b>15</b>
1.1 HLA y Esclerosis sistémica progresiva-----	15
<b>2. Planteamiento del Problema y Justificación Científica-----</b>	<b>18</b>
<b>3. Objetivos del trabajo e impacto esperado-----</b>	<b>19</b>
3.1 Objetivo general-----	19
3.2 Objetivos específicos-----	19
3.3 Resultados esperados-----	20
3.4 Impacto esperado-----	20
<b>4. Metodología-----</b>	<b>22</b>
4.1 Diseño-----	22
4.2 Población-----	22
4.3 Definición de Caso-----	22
4.4 Definición de Control-----	23
4.5 Variables clínicas de medición-----	23
4.6 Variables paraclínicas de medición-----	23
4.7 Recolección de datos-----	24
4.8 Estudio de HLA-II-----	24
4.9 Análisis estadístico-----	25
4.10 Costos y Financiación-----	25
4.11 Métodos-----	26

5. <b>Resultados</b> -----	27
6. <b>Discusión</b> -----	31
A. <b>Anexo:</b> Formulario recolección de datos-----	33
B. <b>Anexo:</b> Formulario recolección de muestras biológicas-----	38
7. <b>Referencias Bibliográficas</b> -----	39

<b>Lista de Tablas</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Características clínicas y serológicas de la población estudiada-----	28
<b>Tabla 2.</b> Tipificación de HLADRB1 en casos y controles-----	29
<b>Tabla 3.</b> HLADRB1 asociado a esclerosis sistémica descrito en otras poblaciones-----	29
<b>Tabla 4.</b> HLADRB1*0407 y asociaciones clínicas – serológicas-----	30.

## Resumen

**Introducción:** La Esclerosis Sistémica (ES) es una enfermedad inflamatoria crónica de etiología desconocida caracterizada por fibrosis de piel y órganos internos, además de proliferación micro vascular y fenómenos de autoinmunidad. Su patogénesis sigue en estudio y se ha determinado la importancia que juega la parte genética en su desarrollo. El HLA de clase II ha resultado ser un parámetro importante desde el punto de vista de probabilidad de desarrollo de la enfermedad, perfil clínico y serológico. Existen variaciones entre las diferentes razas con relación a la presentación de la enfermedad, lo que resalta la importancia de los genes en esta patología.

En vista que se ha demostrado efectivamente en otras poblaciones, que diferentes haplotipos y alelos del HLA se asocian a susceptibilidad y protección frente a la enfermedad, manifestaciones clínicas y serológicas, se requiere información de los diferentes grupos étnicos para encontrar la relación directa entre el perfil inmuno genético poblacional y la ES. Considerando los estudios poblacionales realizados en otras latitudes, es necesario explorar los antígenos del HLA-DRB1/B3/B4/B5 y HLA-DQB1/A1; en búsqueda de definir su presencia y relación con la enfermedad en nuestra población.

**Objetivos:** Explorar la asociación entre los alelos del HLA-DRB1 con la susceptibilidad para la presencia de esclerosis sistémica y su expresión clínica en una cohorte de pacientes del centro de Colombia.

Determinar las características clínicas y serológicas de los pacientes con esclerosis sistémica evaluados en los servicios de consulta externa y hospitalización de la unidad de reumatología de la Universidad Nacional de Colombia.



Evaluar la presencia de los alelos del HLA-DRB1 en los pacientes con esclerosis sistémica evaluados en los servicios de consulta externa y hospitalización de la unidad de reumatología de la Universidad Nacional de Colombia

Establecer posibles asociaciones entre los perfiles de auto anticuerpos de los pacientes con esclerosis sistémica del servicio y los diferentes tipos de HLA tipo II encontrados.

Establecer posibles asociaciones entre las manifestaciones clínicas de los pacientes con esclerosis sistémica del servicio y los diferentes tipos de HLA tipos II encontrados.

**Material y métodos:** Estudio de casos y controles. Pacientes con diagnóstico de ES del servicio de reumatología de la UNAL. Controles sanos mayores de 50 años, sin presencia de enfermedad autoinmune. Caracterización clínica y serológica. Toma de muestras para aislamiento de DNA de células mononucleares y estudio de HLA clase II (HLA-DRB1). Correlación de variables clínicas y serológicas con alelos y haplotipos específicos. La descripción de las variables numéricas se realizó mediante medianas o promedios dependiendo de la distribución normal o no. Igualmente las medidas de dispersión fueron la desviación estándar o los rangos según corresponda. Las variables se presentan mediante frecuencias. Las asociaciones entre los alelos del HLA y esclerosis sistémica, entre alelos de HLA y auto anticuerpos o entre alelos del HLA y manifestaciones clínicas se evaluarán mediante la prueba de  $\chi^2$  con 1 grado de libertad o el test T exacto de Fisher. Los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron significativos después de la corrección para el número de alelos con una frecuencia  $\geq 5\%$  (alelo no raro). Igualmente se calculó el OR con un intervalo de confianza del 95% para las diferencias significativas encontradas según los estratos evaluados.

**Resultados:** 86 pacientes y 206 controles se estudiaron para determinar los haplotipos del HLADRB1. El promedio de edad fue de 55 años, siendo más frecuente la presencia de la enfermedad en el género femenino 91.9%, las variedades limitada (69,8%) y la pre esclerosis (20.9%) fueron las más frecuentes. El 74,4% de los pacientes cursaban con anticuerpos anti centrómero. Con relación al HLA, se encontró que el haplotipo HLADRB1\*0407 fue el más frecuente en los pacientes con ES,  $p < 0,0000$ , OR 42,1 IC 95%(12,4-142,7), igualmente la presencia de este alelo se asocio con positividad para anti centrómero en un 76% de los pacientes y con la variedad limitada en un 67% de los pacientes. No se pudo determinar una asociación directa entre el HLADRB1\*0407 y manifestaciones de la enfermedad como hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar de predominio intersticial o úlceras digitales.

**Conclusión:** En conclusión, en el presente estudio se observa una relación directa entre el alelo HLADRB1\*0407 y la presencia de esclerosis sistémica progresiva variedad limitada en una muestra de pacientes de la región central de Colombia, dato que muestra una diferencia desde el punto de vista genético, serológico y clínico con relación a otras poblaciones estudiadas.

**Palabras Clave:** Esclerosis sistémica, HLADRB1, Inmunogenética

**Abstract**

**Background:** Systemic Sclerosis (SSc) is a chronic inflammatory disease of unknown etiology characterized by fibrosis of the skin and internal organs, as well as microvascular proliferation and autoimmune phenomena. Its pathogenesis is still under investigation and the important part played by genetics in its development has been determined. HLA class II has proven to be a significant parameter from the point of view of likelihood of developing the disease, and its clinical and serological profile. There are variations between different races in relation to the presentation of the disease, underscoring the importance of the genes in this pathology.

Given that it has been proven effective in other populations, that different HLA haplotypes and alleles are associated with susceptibility and protection against disease, clinical and serological information is required from different ethnic groups to find a direct relationship between the immunogenic population profile and SSc. Considering the population studies elsewhere, it is necessary to explore HLA-DQB1/A1 and HLA-DRB1/B3/B4/B5 antigens, seeking to define their presence and relationship to the disease in our population.

**Objectives:** To explore the association between HLA - DRB1 alleles with susceptibility to systemic sclerosis and the presence of clinical expression in a cohort of patients in central Colombia .

To determine the clinical and serological features of patients with systemic sclerosis assessed in the outpatient services and hospital rheumatology unit of the National University of Colombia.

To evaluate the presence of HLA - DRB1 alleles in patients with systemic sclerosis assessed in the outpatient services and hospital rheumatology unit of the National University of Colombia.

Establish possible associations between autoantibody profiles of patients from the outpatient service with systemic sclerosis and the different types of HLA class II found.

Establish possible associations between clinical manifestations of systemic sclerosis patients and service different types of HLA types II found

**Material and methods:** Case-control study . Patients diagnosed with SSc at the rheumatology unit of UNAL .Controls healthy persons above 50 years, without the presence of autoimmune disease. Clinical and serological characterization. DNA isolation of mononuclear cells from blood samples and HLA class II study ( HLA -DRB1 ) . Correlation of specific alleles with clinical and serological variables. The description of the numerical variables was performed using descriptive statics . Similarly, dispersion measurements were the standard deviation or the range accordingly to the variable. The associations between HLA alleles and systemic sclerosis , among HLA alleles and autoantibodies or between HLA alleles and clinical manifestations were assessed by X2 test with 1 degree of freedom or Fisher exact t test . P values  $\leq 0.05$  were considered significant after correction for the number of alleles with frequency  $\geq 5\%$  ( no rare allele ) . Likewise, the OR was calculated with a confidence interval of 95% for the significant differences found according to the strata evaluated.

**Results:** 86 patients and 206 controls were tested for HLA-DRB1 haplotypes . The average age was 55 years , being more frequent occurrence of the disease in females 91.9 % ; the limited subset (69.8% ) and preesclerosis (20.9 %) were the most frequent . 74.4 % of patients were found with anticentromere antibodies. In relation to HLA , it was found that the HLA-DRB1 \* 0407 haplotype was more frequent in patients with SSc,  $p < 0.0000$  , OR 42.1 (95% CI 12.4 to 142.7 ) , also the presence of this allele was associated with positivity for anti centromere in 76% of patients and the limited subset of the disease in 67% of patients. We could not determine a direct association between the HLA-DRB1 \*

0407 and disease manifestations such as pulmonary hypertension, interstitial lung disease prevalence or digital ulcers .

**Conclusion:** In conclusion, in this study a direct relationship between HLA-DRB1 \* 0407 allele and the presence of progressive systemic sclerosis, limited subset, in a sample of patients from the central region of Colombia , data showing a difference from the genetic point of view is observed , serological and clinical comparison with other populations studied .

**Key Words:** Systemic sclerosis, HLADRB1, immunogenetics.

## **Introducción**

La esclerosis sistémica (ES) es una enfermedad crónica autoinmune, poco frecuente, que afecta múltiples órganos de la economía con una incidencia variable de acuerdo a la población estudiada. Su incidencia en Estados Unidos es de 19 casos por 1.000.000 de habitantes/año y su prevalencia es de alrededor de 242 casos por 1.000.000 de adultos. Lastimosamente en nuestro medio no se tienen estadísticas claras de su frecuencia de presentación, sin embargo en el servicio de reumatología de la Universidad Nacional de Colombia es una de las cinco primeras patologías de consulta. Es una enfermedad devastadora para el paciente y para el médico; para el primero por la morbilidad y mortalidad que confiere, para el segundo por lo frustrante que se torna el tratamiento en momentos avanzados de la enfermedad.

Es por esta razón que con los nuevos avances desde el punto de vista de las ciencias básicas y clínicas, se busca establecer un diagnóstico precoz que facilite intervenciones tempranas que modifiquen los desenlaces de la enfermedad. En la actualidad se cuentan con criterios clasificatorios de fases preclínicas o estadios muy tempranos de esclerosis sistémica que impactan en el comportamiento de esta entidad. Desde el punto de vista genético se han tratado de establecer asociaciones con distintos genes, que ayudan a predecir el riesgo de sufrir este padecimiento, sin embargo dichos estudios se han realizado en otras latitudes, ninguno en Colombia. Se hace entonces necesario explorar desde el punto de vista genético si nuestra población se comporta igual que las de otras regiones, ya que desde el punto de vista de clínico no somos iguales, generando profundización en el conocimiento sobre esta enfermedad para enfrentarla de una mejor manera que conlleve a desenlaces óptimos en cuanto a la calidad de los pacientes que la sufren.

## **1. Marco Teórico**

### **1.1 HLA y Esclerosis Sistémica Progresiva**

La Esclerosis Sistémica Progresiva (ESP), es una enfermedad inflamatoria crónica de etiología desconocida caracterizada por fibrosis de piel y órganos internos, además de proliferación micro vascular y fenómenos de autoinmunidad<sup>1</sup>. Desde el punto de vista clínico y de acuerdo al compromiso cutáneo se ha clasificado en 2 variedades: limitada, donde el compromiso fibroso de la piel es acral y en cara; y difusa, que además del compromiso distal involucra las zonas proximales del cuerpo<sup>2</sup>. Esta es una enfermedad incurable, motivo por el cual se viene trabajando en intervenciones precoces con miras a modificar el curso de la entidad, es así como a esta clasificación se le adiciona un tercer grupo de pacientes catalogados como pacientes en fase preclínica (pre esclerosis) o muy temprana de la enfermedad y que presentan fenómeno de Raynaud, anticuerpos anti celulares totales positivos, hallazgos capilaroscópicos anormales y edema de dedos<sup>3</sup>. La importancia radica en que no importa el tipo de variedad con la cual curse el paciente, el riesgo de compromiso de órgano interno es tangible y ameritan estudios de extensión en busca de descartarlo (hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar de predominio intersticial, anormalidades en tracto gastrointestinal, entre otros).

La patogénesis de la enfermedad continúa en desarrollo, sin embargo se considera que los factores inmunogenéticos contribuyen de manera importante al desarrollo de la enfermedad, tanto en sus aspectos inmunológicos como vasculopáticos y fibróticos<sup>4-7</sup>.

Diferentes genes del HLA del tipo II, han sido implicados en la susceptibilidad de los individuos para el desarrollo de la enfermedad; igualmente se considera que la genética individual se asocia con la expresión fenotípica e inmunológica de la ESP<sup>6,7</sup>. El HLA del tipo II, también contribuye a la patogénesis de la enfermedad, a través de la transducción

de señales a nivel fibroblástico que promueven el proceso fibrótico al activar dicho elemento celular<sup>4,7,8</sup>.

La etnicidad se relaciona fuertemente con la presentación de la ES: en la actualidad es claro, que diferentes grupos poblacionales, como afros americanos o nativos norteamericanos, cursan con una predisposición mayor para manifestaciones clínicas determinadas, al igual que perfiles de auto anticuerpos específicos y dificultades terapéuticas por no respuesta a los tratamientos convencionales<sup>6-10</sup>.

Desde principios de la década de los 90s, se iniciaron estudios en donde se buscó establecer relaciones de susceptibilidad o de protección entre la presencia de haplotipos del HLA tipo II específicos y la ES, con varios estudios poblacionales, la mayoría reproducidos en distintas latitudes, que demostraron que la herencia, en específico alteraciones en el HLA-DRB1, se asociaba con la enfermedad<sup>9,17,18</sup>.

Sin embargo, las réplicas de los primeros estudios generaron interés ya que se pudieron identificar diferencias en los alelos presentes en las diferentes poblaciones estudiadas.

Varios estudios de casos y controles han identificado estas asociaciones, incluyendo un incremento significativo del HLA-DR5 clase II DRB1\*1101 y DRB1\*1104; HLA-DR3 (DRB1\*0301), HLA-DQA1\*0501 y HLA-DQB1\*0201. Estos alelos se identificaron en pacientes norteamericanos y europeos ambos caucásicos<sup>9-25</sup>. También en estudios multiétnicos se han encontrado haplotipos como factor de riesgo independiente para el desarrollo de crisis renal, complicación severa de la enfermedad, como el HLADRB1\*0407 y el HLADRB1\*1304<sup>21</sup>.

En pacientes Japoneses se han identificado el HLA-DRB1\*1502 y HLA-DQB1\*0601<sup>13</sup>; en nativos americanos HLA-DRB1\*1602, HLA-DQA1\*0501 y HLA-DQB1\*0301<sup>9,10,12</sup>. Población Koreana HLADRB1\*0405, DRB1\*04<sup>27,28</sup>. Es por esta razón que se demuestra



que la diferencia del HLA entre las poblaciones, resalta la importancia de la etnicidad y los perfiles genéticos en la expresión de la enfermedad<sup>16</sup>.

A pesar de esto, no hay estudios que demuestren que en nuestra población existen los mismos haplotipos de susceptibilidad o protección. Los únicos estudios que han incluido poblaciones latinoamericanas han contado con la participación de pacientes de centro américa, que desde el punto de vista genético son diferentes a poblaciones del sur del continente<sup>15</sup>. Dato corroborado por un estudio Brasileño en donde se determino la asociación de la enfermedad con el HLADRB1\*01<sup>24</sup>.

La población hispánica es una mezcla genética de nativos americanos, europeos y africanos del este, por lo que ha sido difícil establecer de manera clara los haplotipos de esta población.

El objetivo de este estudio es establecer si un grupo de pacientes de la región central de Colombia con diagnóstico de ESP, atendidos en el servicio Reumatología de la Universidad Nacional de Colombia, cursan con alelos de específicos del HLADRB1 y si existe relación con características clínicas y serológicas de la enfermedad que nos diferencien a nivel poblacional.

## **2. Planteamiento del problema y Justificación científica**

En vista que se ha demostrado efectivamente en otras poblaciones, que diferentes haplotipos y alelos del HLA se asocian a susceptibilidad y protección frente a la enfermedad, manifestaciones clínicas y serológicas, se requiere información de los diferentes grupos étnicos para encontrar la relación directa entre el perfil inmuno genético poblacional y la ES.

Igualmente, los estudios de los haplotipos aventajan los estudios sobre polimorfismos individuales ya que incrementan el poder de la detección de asociaciones en presencia de múltiples alelos de susceptibilidad, especialmente en los estudios de casos y controles.

Por lo tanto se busca identificar si en la cohorte de pacientes con diagnóstico de ES del servicio de reumatología de la Universidad Nacional de Colombia se presentan antígenos del HLA del tipo II que confieran susceptibilidad para la presencia de la enfermedad, al igual que la asociación de los diferentes alelos con algunas manifestaciones clínicas y serológicas (auto anticuerpos) en este grupo de pacientes.

Considerando los estudios poblacionales realizados en otras latitudes, es necesario explorar los antígenos del HLA-DRB1 en búsqueda de definir su presencia y relación con la enfermedad en nuestra población.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo General**

Explorar la asociación entre los alelos del HLA-DRB1 con la susceptibilidad para la presencia de esclerosis sistémica y su expresión clínica en una cohorte de pacientes de la región central de Colombia.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Determinar las características clínicas y serológicas de los pacientes con esclerosis sistémica evaluados en los servicios de consulta externa y hospitalización de la unidad de reumatología de la Universidad Nacional de Colombia.
- Evaluar la presencia de los alelos del HLA-DRB1 en los pacientes con esclerosis sistémica evaluados en los servicios de consulta externa y hospitalización de la unidad de reumatología de la Universidad Nacional de Colombia
- Establecer posibles asociaciones entre los perfiles de auto anticuerpos de los pacientes con esclerosis sistémica del servicio y los diferentes tipos de HLA- II encontrados.
- Establecer posibles asociaciones entre las manifestaciones clínicas de los pacientes con esclerosis sistémica del servicio y los diferentes tipos de HLA- II encontrados.

### **3.3. Resultados Esperados**

Describir las características clínicas y serológicas de un grupo poblacional colombiano con esclerosis sistémica, en donde prevalecerá en género femenino en cuanto al más afectado y la variedad limitada de la enfermedad como la más frecuente. Se buscará definir si existe un haplotipo del HLA-II que se asocie con una frecuencia significativa a la presencia de la enfermedad, tratando de establecer si este alelo es compartido con otras poblaciones ya estudiadas o por el contrario se demuestra la presencia de un marcador genético que diferencie a este grupo de pacientes de los de otras latitudes. Igualmente en presencia de un haplotipo específico se describirá si existe una relación significativa entre esta variante alélica y las características clínicas y serológicas del grupo de pacientes objeto de estudio. Será el primer estudio de estas características en población colombiana permitiendo así conocer que tan diferentes somos desde el punto de vista de genética poblacional y en presencia de una enfermedad catastrófica como la ES, explorar a futuro la posibilidad de abordajes precoces desde el punto de vista genético para predecir el riesgo de desarrollo de la enfermedad para así poder realizar intervenciones tempranas.

### **3.4. Impacto esperado**

Aportar al conocimiento mundial con el primer estudio de HLA-II en pacientes con esclerosis sistémica de población colombiana, el segundo que incluye población suramericana y el tercero que incluye solo población latinoamericana.

Establecer factores de riesgo propios para el desarrollo de la enfermedad, sus manifestaciones clínicas y complicaciones.

Seguir avanzando en el desarrollo del grupo de investigación en esclerosis sistémica de la universidad nacional de Colombia.

Permitir la interacción de las ciencias básicas con las clínicas para aportar al bienestar de los pacientes con enfermedades reumáticas.

Generar la inquietud en otros grupos de investigación de regiones diferentes del país para establecer los perfiles genéticos poblacionales de pacientes con esta dolencia, con el fin de definir claramente el estándar genético promedio del colombiano con esclerosis sistémica.

Formación de recurso humano a nivel de la especialidad en Reumatología: Tesis de grado de un estudiante de postgrado, participante como investigador del proyecto.

Publicación de los resultados en una revista científica indexada en *pubmed*, con un buen factor de impacto.

Divulgación del Trabajo en el congreso colombiano de reumatología del año 2015 y envió de resumen al Congreso Anual Europeo de Reumatología (*EULAR*) o del Colegio Americano de Reumatología del año en curso.

## **4. Metodología**

### **4.1. Diseño**

Estudio de Casos y Controles

### **4.2. Población**

La selección de la población del presente estudio, se realizó por medio de muestreo por conveniencia de pacientes y sus historias clínicas con diagnóstico de Esclerosis sistémica, asistentes al servicio de Reumatología de la Universidad Nacional en 2 hospitales de la ciudad de Bogotá (Fundación Universitaria Carlos Lleras Restrepo y Hospital el Tunal) durante el período comprendido entre enero de 2010 a noviembre de 2013. Si el paciente elegido no cumplía los criterios de elegibilidad se tomó el siguiente y así sucesivamente

### **4.3. Definición de caso**

Se incluyeron todos los pacientes con diagnóstico de esclerosis sistémica, ya sea variedad difusa o limitada, de acuerdo a los criterios clasificatorios del American College of Rheumatology<sup>2</sup>; además se incluyen pacientes con diagnóstico de pre-esclerosis de acuerdo a los criterios de LeRoy<sup>3</sup>.

Todos los pacientes incluidos hacen parte de la base de datos de esclerosis sistémica del servicio de reumatología de la Universidad Nacional, la cual contiene toda la información pertinente con relación a características clínicas, serológicas y de ayudas diagnósticas (evaluación de función renal, pulmonar, hepática, cardíaca) de estos pacientes.

#### **4.4. Definición de control**

Se consideraron controles a aquellos pacientes evaluados en el servicio de consulta externa de medicina interna, mayores de 50 años, que no cursan con ninguna enfermedad autoinmune y que no presentan antecedentes de estas patologías en familiares de primer grado de consanguinidad.

#### **4.5. Variables clínicas de medición**

Género, edad actual, edad de inicio de la sintomatología, edad al momento del diagnóstico, antecedentes personales y familiares, primer síntoma no Raynaud, frecuencia cardiaca, presión arterial, examen físico con énfasis en: esclerodactilia, Fenómeno de Raynaud, edema de dedos, telangiectasias, poiquilodermia, microstomia, artralgias, sinovitis, calcinosis cutis, estertores.(33).

#### **4.6. Variables paraclínicas de medición**

Hemograma, Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) por método de Westergren, Parcial de Orina, Proteína C Reactiva (PCR) por método de turbidimetría, Aspartato Transaminasa (AST), Alanino Transaminasa (ALT), Creatinina, Nitrógeno Ureico Sanguíneo (*BUN*), Glucemia en ayunas mg/dL, Anticuerpos Antinucleares (*ANAS*) por IFI con sustrato de células HEp-2, evaluando patron anti-centromero y nucleolar, Anticuerpos Anti-DNAs por IFI con sustrato de *Crithidia lucilliae*, Anti-Ro/SS-A, Anti-La/SS-B, Factor Reumatoideo por turbidimetría, TAC de tórax de alta resolución, PSAP, jet de regurgitación de la válvula tricúspide por ecocardiograma transtoracico dopler color, capilaroscopia por estereoscopio, CVF% predicho, VEF1/CVF% predicho, patrón por espirometría, DLCO, DLCO/VA, Score Rodnan modificado

#### **4.7. Recolección de datos**

A todos los pacientes se les realizó historia clínica completa y detallada, al igual que un minucioso examen físico, todo se incluyó dentro del formato de recolección de datos diseñado en el servicio de reumatología (Anexo). Se les dio una explicación acerca de la naturaleza del estudio y se obtuvo la firma del consentimiento informado de participación y para la toma de muestra de sangre venosa periférica. Las muestras se enviaron para su procesamiento, bajo normas de bioseguridad y conservación, al laboratorio de bioquímica de la Universidad Nacional de Colombia.

Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia y cada uno de los participantes dio su aprobación y firmó el consentimiento informado para toma de datos y de muestras biológicas.

#### **4.8. Estudio de HLA clase II**

Una vez recolectada la muestra se realizó el aislamiento de leucocitos a través de la metodología de separación por gradientes de sucrosa utilizando para ello el reactivo LSM (lymphocyte Separation Medium), el pellet de células que se obtuvo se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. La extracción de DNA se realizó a partir de los pellets almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , utilizando el kit PureLink™ Genomic DNA, (Invitrogen), siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante. La pureza y calidad de cada una de las extracciones se determinó mediante espectrofotometría realizando lecturas a 260nm y determinando así la pureza mediante la relación 260/280 nm, siendo aceptables las relaciones por encima de 1,5. Esta medición se realizó usando el equipo Nanodrop 2000, Thermo.

Se estudiaron los haplotipos del HLADRB1 que han mostrado ser los más prevalentes en las diferentes poblaciones estudiadas, sin orientar la amplificación a alelos específicos. Para el análisis de HLA se utilizó la siguiente técnica: 1 ul de cada producto de PCR



amplificado se mezcló con 9  $\mu$ l de HiDi Formamida (Applied Biosystems) y 1  $\mu$ l de LIZ600. La electroforesis se llevó a cabo en un equipo ABI 3130XL con capilar de 36 cms y polímero POP7. Las muestras fueron analizadas con el software GeneMapper 3.2, para obtener la altura y tamaño en pares de bases del producto amplificado. Todos los estudios de biología molecular y genética se realizarán en los laboratorios de la Universidad Nacional de Colombia.

#### **4.9. Análisis estadístico**

La descripción de las variables numéricas se realizó mediante medianas o promedios dependiendo de la distribución normal o no. Igualmente las medidas de dispersión fueron la desviación estándar o los rangos según corresponda. Las variables se presentan mediante frecuencias. Las asociaciones entre los alelos del HLA y esclerosis sistémica, entre alelos de HLA y auto anticuerpos o entre alelos del HLA y manifestaciones clínicas se evaluarán mediante la prueba de  $\chi^2$  con 1 grado de libertad o el test T exacto de Fisher. Los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron significativos después de la corrección para el número de alelos con una frecuencia  $\geq 5\%$  (alelo no raro). Igualmente se calculó el OR con un intervalo de confianza del 95% para las diferencias significativas encontradas según los estratos evaluados. Los datos se analizaron en el programa Statistical Package for the Social Sciences versión 15.0 (SPSS 15.0).

#### **4.10. Costos y financiación**

El presente trabajo de investigación hace parte de un estudio de casos y controles que participó y resultó favorecido para su financiación por medio de la Convocatoria para el Estímulo a la Investigación a través de Proyectos y Trabajos de Investigación en los Posgrados de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Apoyo a

la Investigación en Salud. Facultad de Medicina y Dirección de Investigación Sede Bogotá 2013.

#### **4.11. Métodos**

El estudio se realizará dentro de los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos según la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. El presente estudio cumplió con los requisitos para la investigación en humanos según la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, en lo concerniente a “la investigación en órganos, tejidos y sus derivados, productos y cadáveres de seres humanos” (Título II, Capítulo VI), “las investigaciones de nuevos recursos profilácticos, de diagnóstico, terapéuticos y de rehabilitación” (título III) y de “la bioseguridad de las investigaciones en lo referente a la investigación con microorganismos patógenos o material biológico” (Título IV Capítulo I) y se identificó categoría de riesgo inferior al mínimo.

Los paraclínicos evaluados son considerados de rutina al diagnóstico y seguimiento de pacientes con la enfermedad. El presente estudio no pretende evaluar recursos terapéuticos en el tratamiento de la esclerosis sistémica. Los pacientes continuarán con el esquema de tratamiento validado actualmente en las guías de manejo.

## 5. Resultados

En el periodo de tiempo estimado, se obtuvieron datos clínicos de 122 pacientes con diagnóstico clínico y serológico de ESP. De estos, se consiguieron muestras de sangre en 88 de los casos (72%), los pacientes de los cuales no se obtuvo muestra por diferentes razones como no firma de consentimiento informado o desacuerdo con la investigación, no se tuvieron en cuenta para el análisis final, tanto de perfil clínico como genético. En 2 de los casos no fue posible la tipificación de HLA por problemas en la muestra, quedando un total de 86 casos (70%) para incluir en el estudio. Para aumentar el poder de los resultados en cuanto a la frecuencia de las diferentes variables alélicas se estudiaron 206 controles sanos, que cumplían con los criterios de inclusión como controles, y a los cuales también se les realizó tipificación de HLADRB1.

En concordancia con otros estudios, esta enfermedad en nuestro medio es más frecuente en mujeres (91,9%) en la sexta década de la vida (55,4 años); desde el punto de vista clínico la variedad más frecuente en esta población es la limitada 69,8%, seguida por la preesclerosis en el 20,9% de los pacientes. El subtipo de autoanticuerpo más prevalente es el anti centrómero presente en el 74.4% de los estudiados. Hay una baja frecuencia de manifestaciones sistémicas asociadas en este grupo poblacional, la presencia de enfermedad pulmonar intersticial e hipertensión pulmonar son respectivamente del 20,9% y del 18,6%. Tabla 1.

VARIABLE	N=86 (%)
EDAD	55,4 +/- 10
FEMENINO	79 (91,9)
MASCULINO	7 (8,1)
PREESCLEROSIS	18 (20,9)
LIMITADA	60 (69,8)
DIFUSA	8 (9,3)
RAYNAUD	81 (94,2)
RODNAN < 20	84 (97)
DISNEA	25 (29,1)
TELANGIECTASIAS	57 (66,3)
EDEMA DE DEDOS	73 (84,9)
ESCLERODACTILIA	62 (72,1)
ARTRALGIAS	23 (26,7)
SINOVITIS	12 (14)
ULCERAS	
DIGITALES	13 (15)
SCL 70	6 (7)
EPID	18 (20,9)
HTP	16 (18,6)
ANTI CENTROMERO	64 (74,4)
NUCLEOLAR	9 (10,5)
MOTEADO	9 (10,5)

**Tabla 1. Características clínicas y serológicas de la población estudiada**

La tipificación de HLADRB1, mostró que el alelo HLADRB1\*0407 es el más frecuente en la población estudiada ( $p < 0,0000$ ) con una razón de riesgo de 42,1 IC 95% (12,4 - 142,7), alelo no descrito como de riesgo en otras poblaciones (Tabla 2 – 3).

		SANOS		
	SSc (n=86)	(n=206)	OR (IC 95%)	p
HLADRB1*0101	8	24	0,78 (0,35-1,8)	0,558
HLADRB1*0102	9	11	2,07 (0,82- 5,1)	0,114
HLADRB1*0301	7	15	1,12 (0,44-2,8)	0,8
HLADRB1*0404	7	12	1,14 (0,54-3,7)	0,465
HLADRB1*0405	8	11	1,8 (0,70-4,6)	0,211
<b>HLADRB1*0407</b>	<b>33</b>	<b>3</b>	<b>42,1 (12,4-142,7)</b>	<b>&lt;0,0000</b>
HLADRB1*0701	8	49	0,32 (0,14-0,72)	0,004
HLADRB1*0802	17	28	1,5 (0,8-3,40)	0,183
HLADRB1*1101	5	23	0,49 (0,18-1,33)	0,157
HLADRB1*1301	8	13	1,5 (0,60-3,81)	0,367
HLADRB1*1533	5	0	0,9 (0,89-0,99)	<0,0000
HLADRB1*1602	5	3	4,1 (0,97-17,8)	0,038

**Tabla 2. Tipificación de HLADRB1 en casos y controles**

POBLACIÓN	HLADRB1	REFERENCIA
ESPAÑA	HLADRB1*1104	11,14
ITALIA	HLADRB1*1104	14
KOREA	HLADRB1*0405/0401	27,28
JAPON	HLADRB1*0501/1502	13
FRANCIA	HLADRB1*1104	20
ESTADOS UNIDOS	HLADRB1*1104	9,10,12,15
BRASIL	HLADRB1*01	24
AFROAMERICANOS	HLADRB1*0804	11
HISPANOS (MX-C. AM)	HLADRB1*1104	11
GRECIA	HLADRB1*1104	26

**Tabla 3. HLADRB1 asociado a esclerosis sistémica descrito en otras poblaciones.**

Igualmente, este haplotipo tiene una relación directa con la expresión fenotípica de la enfermedad, encontrando que el 67% de los pacientes positivos para este gen se expresan como variedad difusa y serológicamente con una frecuencia del 76% para positividad para anticuerpos anti celulares totales con patrón anti centrómero. No se encontró una relación directa con manifestaciones clínicas de la enfermedad como hipertensión pulmonar o enfermedad pulmonar intersticial con el alelo mas frecuente (HLADRB1\*0407). En la población estudiada solo hubo un caso de crisis renal, no asociada al haplotipo más frecuente, este paciente tenia el HLADRB1\*0803/1102 (Tabla 4).

	<b>LIMITADA</b>	<b>DIFUSA</b>	<b>PREESCLEROSIS</b>		
<b>HLADRB1*0407</b>	67%	9%	23%		
	<b>ACA</b>	<b>NUCLEOLAR</b>	<b>MOTEADO</b>	<b>HOMOGENEO</b>	<b>NINGUNO</b>
<b>HLADRB1*0407</b>	76%	12,00%	9,00%	2%	2%
	<b>HTP</b>	<b>EPID</b>	<b>ULCERAS DIG.</b>		
<b>HLADRB1*0407</b>	15,20%	9%	9%		
<b>CRISIS RENAL</b>	HLADRB1*0803/1102				

**Tabla 4. HLADRB1\*0407 y asociaciones clínicas – serológicas.**

## 6. Discusión

Este estudio arroja unos resultados bastante interesantes de analizar; aportando nuevas perspectivas en cuanto al entendimiento de las diferencias poblacionales que impactan en la expresión de la enfermedad. Se resalta que en este grupo poblacional colombiano estudiado existe una relación directa entre la presencia del HLADRB1\*0407 y el desarrollo de la enfermedad, especialmente la variedad limitada de esta. Es llamativo que los diferentes estudios realizados en otras poblaciones muestran frecuencias de alelos no encontrados en nuestro trabajo. Al iniciar el trabajo se consideraba bastante factible que se compartieran haplotipos con poblaciones caucásicas y afroamericanas dado el mestizaje derivado de la colonización de los territorios colombianos, sin embargo, no se pudo demostrar tal asociación y por el contrario se define un nuevo espectro genético poblacional previamente no descrito en la literatura. A la fecha solo hay un estudio que reporta la asociación de este gen con la enfermedad, especialmente con riesgo de crisis renal, sin embargo la frecuencia de esta complicación en la población objeto de estudio fue casi ausente, y en el único evento presentado, la tipificación de HLA demostró un alelo diferente. No es frecuente en la población estudiada el desarrollo de complicaciones clásicas de la enfermedad, en especial del tipo de variedad más observado, como es la limitada, con relación a hipertensión pulmonar o enfermedad pulmonar de predominio intersticial, puede considerarse que la intervención farmacológica temprana que por protocolo del servicio se les hace a los pacientes, con medicamentos inmunomodulares y vasoactivos (metotrexate, ácido acetil salicílico, estatinas), modifica la expresión de la enfermedad haciendo menos frecuentes estas manifestaciones.

El estudio tiene varias limitaciones; entre ellas el número de casos, razón por la cual se trato de elevar el poder del estudio utilizando más controles con el fin de tener datos de mayor impacto; igualmente estos datos son ciertos para un grupo poblacional específico

colombiano, nuestro país es multiétnico y tiene influencias genéticas muy diferentes por regiones, lo que no implica que estos datos sean aplicables para toda la población colombiana. Se hace necesario establecer las frecuencias de otros alelos del HLA de clase II, especialmente del grupo DQ, que también se han descrito en diferentes estudios como prevalentes y de riesgo para el desarrollo de la enfermedad.

Los datos de este estudio son importantes, pues en una enfermedad en donde las intervenciones terapéuticas buscan ser cada vez más precoces para impactar en la evolución de la patología, el hecho de conocer los factores genéticos asociados conlleva a un diagnóstico aún más temprano con mejores desenlaces para los pacientes.

En conclusión, en el presente estudio se observa una relación directa entre el alelo HLADRB1\*0407 y la presencia de esclerosis sistémica progresiva variedad limitada en una muestra de pacientes de la región central de Colombia, dato que muestra una diferencia desde el punto de vista genético, serológico y clínico con relación a otras poblaciones estudiadas.



## A. Anexo

<b>Nombres y Apellidos:</b>				<b>Doc. Identidad:</b>				<b>Fecha nacimiento:</b> / /				
<b>Dirección:</b>				<b>Ciudad:</b>				<b>Natural:</b>				
<b>Teléfonos:</b>				<b>Ocupación:</b>								
<b>Edad:</b> _____ años		<b>Sexo:</b> <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F		<b>Raza:</b> <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> N <input type="checkbox"/> A I								
<b>1. Historia Actual de la enfermedad</b>												
<b>Años cumplidos al diagnóstico:</b>			<b>Año del diagnóstico:</b>			<b>Tiempo de evolución de la enfermedad desde 1 síntoma:</b>						
<b>2. Compromiso</b>		<b>Sistémico:</b> <input type="checkbox"/>		<b>Limitada:</b> <input type="checkbox"/>		<b>pre-escleros:</b> <input type="checkbox"/>						
<b>3. Antecedentes personales</b>												
<b>Médicos:</b>	DM	IC	IA	IR	OS	OA	DI	TE	TV	HIP	OTRO:	NO
HTA		C	M	C	T		S	P	P	OT		
<b>Hospitalarios:</b>											NO	
<b>Alérgicos:</b>											NO	
<b>Tóxicos:</b>		<b>Paquete/año</b>		<b>Exposición a humos:</b>		<b>¿Cuál?</b>					NO	
<b>CIGARRILLO:</b>												
<b>Infecciosos:</b>	VH	VH	VI	NE	IV	CE	MEN	<b>OTRO:</b>				NO
VHA	B	C	H	U	U	L						
<b>4. Presenta alguna de estas enfermedades al momento del ingreso</b>												
EPO	ASM	FIBROSIS			HT	TB	ENFISEMA		CA/METASTASIS		NO	
C	A	PULMONAR			P	C	PULMONAR		PULMONAR			
<b>Enfermedad ocupacional de cualquier tipo:</b>											NO	
<b>5. Antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes (Padres, hermanos, abuelos,</b>												



Compromiso	<input type="checkbox"/>	ena	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>									
SI	NO												
<b>7. Examen físico</b>													
TA:	/	FC:		PESO (Kg):		TALLA (Mts):		IMC:					
Raynaud:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Esclerodactilia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Edema dedos/m	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Telangiectasi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	SI
SI	NO			SI	NO		SI	NO		NO			
Poiquiloderma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Microstomía	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Artralgias:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Sinovitis:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	SI
SI	NO			SI	NO		SI	NO		NO			
Calcinosis	cu	line	<input type="checkbox"/>	Estertores:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Derrame	p	ura	Arritmias:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	SI
SI	NO			SI	NO		SI	NO		NO			
<b>8. Resultado de exámenes</b>													
ANAS:	/	Factor		SCL- 70:		AST:		ALT:					
Patrón:		Reumatoide:											
Hb:		Hct:		VCM:		Plaquetas:							
Leucocitos:		N %	L%	E %	M%	Albúmina:							
VSG (mm/h):		PCR (mg/dl):		Creatinina:		BUN:							
Capilaroscopia #1:													
Patron:													
<b>9. Candidato de ingreso base de datos esclerosis sistémica:</b> <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO													
<b>10. Comentarios:</b>													
<b>11. VISITA No 2. Fecha:</b>													



Hb:	Hct:	VCM:	Plaquetas:	Leucocitos:	N%	L%	E%	M%
VSG (mm/h):	PCR (mg/dl):		Creatinina:	BUN:	AST:	ALT:		
ANAS: /	Patrón:		Scl 70:					

## B. Formato Toma de Muestras



### FORMATO DE REGISTRO DE PACIENTES PARA TOMA DE MUESTRAS UNIDAD DE REUMATOLOGÍA

NOMBRE				FECHA		HORA	
DOCUMENTO			EDAD				
TELEFONO			FECHA DE NACIMIENTO				
TITULO DEL PROTOCOLO							
TIPO DE TUBO	LILA		AMARILLO/ROJO		OTRO		
NUMERO DE TUBOS							
PRIMERA MUESTRA		SEGUNDA MUESTRA			OTRO		
CONSENTIMIENTO INFORMADO FIRMADO	SI		NO				
INVESTIGADOR QUE REMITE							
NOMBRE DE PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA							
OBSERVACIONES							

### Referencias Bibliográficas

1. Charles C, Clements P, Furst DE. Systemic Sclerosis: hypothesis-driven treatment strategies. *Lancet*.2006;367(9523):1683-1691.
2. Van Den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson S, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*.2013;72:1747-1755.
3. LeRoy EC, Medsger TA Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2001;28:1573-1576.
4. Gladman D, Kung T, Siannis F, Pellet F, Farewell VT, Lee P. HLA markers for susceptibility and expression in scleroderma. *J Rheumatol*. 2005;8:1481-1487
5. Gorlova O, Martin JE, Rueda B, Koeleman B, Ying J, Teruel M, et al. Identification of novel genetic markers associated with clinical phenotypes of systemic sclerosis through a genome-wide association strategy. *PLoS Genet*.2011;7(7):e1002178.
6. Luo Y, Wang Y, Wang Q, Xiao R, Lu Q. Systemic sclerosis: genetics and epigenetics. *Journal of Autoimmunity*. 2013;41:161-167.

7. Bhattacharyya S, Wei J, Tourtellote W, Hinchcliff M, Gottardi C, Varga J. Fibrosis in systemic sclerosis: common and unique pathobiology. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5 (Suppl 1):S18.
8. Bernatsky S, Joseph L, Pineau CA, Belisle P, Hudson M, Clarke AE. Scleroderma prevalence: demographic variations in a population-based sample. *Arthritis Care Res*. 2009;61:400-404.
9. Kuwana M, Kaburaki J, Arnett F, Howard R, Medsger T, Wright T. Influence of ethnic background on clinical and serologic features in patients with systemic sclerosis and anti-DNA topoisomerase I antibody. *Arthritis Rheum*. 1999;42(3):465-474.
10. Reveille J, Fishbach M, McNearney T, Friedman A, Aguilar M, Lisse J, et al. Systemic sclerosis in 3 US ethnic groups: a comparison of clinical, sociodemographic, serologic and immunogenetic determinants. *Semin Arthritis Rheum*. 2001;30(5):332-346.
11. Simeón C, Fonollosa V, Tolosa C, Palou E, Selva A, Solans R, et al. Association of HLA class II genes with systemic sclerosis in spanish patients. *J Rheumatol*. 2009;36:2733-2736.



12. Krzyszczyk M, Li Y, Ross S, Ceribelli A, Chan E, Bubb M, et al. Gender and ethnicity differences in the prevalence of scleroderma-related autoantibodies. *Clin Rheumatol.* 2011;30(10):1333-1339.
  
13. Kuwana M, Okano Y, Kaburaki J, Inoko H. HLA class II genes associated with anticentromere antibody in Japanese patients with systemic sclerosis (scleroderma). *Ann Rheum Dis.* 1995;54:983-987.
  
14. Beretta L, Rueda B, Marchini M, Santaniello A, Simeón C, Fonollosa V, et al. Analysis of class II human leukocyte antigens in Italian and Spanish systemic sclerosis. *Rheumatology.* 2012;51:52-59.
  
15. Arnett F, Gourh P, Shete S, Ahn C, Honey R, Agarwal S, et al. Major histocompatibility complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic sclerosis: analyses in 1300 caucasian, African-american and Hispanic cases and 1000 controls. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:822-827.
  
16. Steen V, Domsic R, Lucas M, Fertig N, Medsger T. A clinical and serologic comparison of African-american and Caucasian patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2012; 64(9):2986-2994.

17. Reveille J, Owerbach D, Goldstein R, Moreda R, Isem R, Arnett F. Association of polar amino acids at position 26 of the HLA-DQB1 first domain with the anticentromere autoantibody response in systemic sclerosis (scleroderma). *J Clin Invest.* 1992;89:1208-1213.
18. Reveille J, Durban E, MacLeod M, Goldstein R, Moreda R, Altman R, et al. Association of amino acid sequences in the HLA-DQB1 first domain with the antitopoisomerase I autoantibody response in scleroderma (progressive systemic sclerosis). *J Clin Invest.* 1992;90:973-980.
19. Kuwana M, Inoko H, Kameda H, Nojima T, Sato S, Nakamura K, et al. Association of human leukocyte antigen class II genes with autoantibody profiles, but not with disease susceptibility in Japanese patients with systemic sclerosis. *Internal Medicine.* 1999;38:336-344.
20. Azzouz D, Rak J, Fajardy I, Allanore Y, Thiev K, Farge-Bancel D, et al. Comparing HLA shared epitopes in French Caucasian patients with scleroderma. *PLoS ONE.* 2012;7(5):e36870.
21. Lambert N, Distler O, Müller-Ladner U, Tylee T, Furst D, Nelson J. HLA-DQA1\*0501 is associated with diffuse systemic sclerosis in Caucasian men. *Arthritis Rheum.* 2000;43(9):2005-2010.

22. McNearney T, Hunnicutt S, Fischbach M, Friedman A, Aguilar M, Ahn C, et al. Perceived functioning has ethnic-specific associations in systemic sclerosis: another dimension of personalized Medicine. *J Rheumatol.* 2009;36(12):2724-2732.
23. Nguyen B, Mayes M, Arnett F, Del Junco D, Reveille J, Gonzalez E. HLADRB1\*0407 and \*1304 are risk factors for scleroderma renal crisis. *Arthritis Rheum.* 2011;63:530-534.
24. Del Rio AP, Sachetto Z, Sampaio-Barros PD, Marques-Neto JF, Londe AC, Bertolo MB. HLA markers for poor prognosis in systemic sclerosis Brazilian patients. *Dis Markers.* 2013;35:73-78.
25. Loubi re LS, Lambert NC, Madeleine MM, Porter AJ, Mullarkey ME, Pang JM, et al. HLA allelic variants encoding DR11 in diffuse and limited systemic sclerosis in Caucasian women. *Rheumatology (Oxford).*2005;44:318-322.
26. Vlachoyiannopoulos PG, Dafni UG, Pakas I, Spyropoulou-Vlachou M, Stravopoulos-Giokas C, Moutsopoulos HM. Systemic scleroderma in Greece: low mortality and strong linkage with HLADRB1\*1104 allele. *Ann Rheum Dis.* 2000;59:359-367.
27. Zhou X, Lee JE, Arnett FC, Xiong M, Park MY, Yoo YK, et al. HLA-DPB1 and DPB2 are genetic loci for systemic sclerosis: a genome-wide association study in Koreans with replication in North Americans. *Arthritis Rheum.* 2009;60;3807-3814.

28. Kuwana M, Pandey JP, Silver RM, Kawakami Y, Kaburaki J. HLA class II alleles in systemic sclerosis patients with anti-RNA polymerase III antibody: associations with subunit reactivities. *J Rheumatol.* 2003; 30:2392-2397.