



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Informe final

Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud

(nombre del programa universitario de investigación de la Digi)

Caracterización alélica de los genes HLA-DQB1 y HLA-DRB1 en pacientes con diagnóstico de nefritis lúpica.

nombre del proyecto de investigación

4.8.63.4.59

Partida presupuestaria

Dirección de Investigación, Facultad de Ciencias Médicas

unidad académica o centro no adscrito a unidad académica avaladora

MSc Lilian Isabel Cayax Menchú
PhD. Karla Odett Escobar Castro
Lic. Juan Carlos Barrios Menéndez
Br. Andrea Gabriela Jiménez Barrientos

nombre del coordinador del proyecto y equipo de investigación contratado por Digi

Guatemala, 29/02/2024

lugar y fecha de presentación del informe final dd/mm/año

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Contraportada

Autoridades

Dra. Alice Burgos Paniagua
Directora General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Dra. Hilda Elena Valencia de Abril
Coordinadora del Programa de Investigación Interdisciplinaria en Salud PUIIS.

Autores

MSc Lilian Isabel Cayax Menchú
PhD. Karla Odett Escobar Castro
Lic. Juan Carlos Barrios Menéndez
Br. Andrea Gabriela Jiménez Barrientos

Colaboradores

Lic. César Camilo Carias Alvarado
Escuela de Biología, Universidad de San Carlos de Guatemala

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (Digi), 2023.
El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada con recursos del Fondo de Investigación de la Digi de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la partida presupuestaria 4.8.63.4.59 en el Programa Universitario de Investigación de Investigación Interdisciplinaria en Salud.

Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Índice general (incluir índice de tablas y figuras)

| | |
|--|----|
| Resumen | 4 |
| Palabras clave | 4 |
| Abstract | 4 |
| Keywords | 5 |
| Introducción | 5 |
| Antecedentes | 6 |
| Planteamiento del problema | 7 |
| Marco teórico | 8 |
| Estado del arte | 12 |
| Objetivos | 12 |
| Hipótesis | 13 |
| Materiales y métodos | 13 |
| Aspectos éticos y legales | 23 |
| Resultados y discusión | 23 |
| Conclusiones | 28 |
| Recomendaciones | 28 |
| Referencias | 29 |
| Apéndice | 35 |
| Vinculación | 40 |
| Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual | 40 |
| Aporte de la propuesta de investigación a los Prioridades Nacionales de Desarrollo | 40 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Operacionalización de las variables o unidades de análisis | 19 |
| Tabla 2. Coherencia de la propuesta de investigación | 21 |
| Tabla 3. Análisis a nivel de locus | 22 |
| Tabla 4. Frecuencias alélicas y OR para el gen HLA-DRB1 | 23 |
| Tabla 5. Frecuencias alélicas y OR para el gen HLA-DQB1 | 24 |
| Tabla 6. Frecuencias haplotípicas y OR para los genes HLA-DRB1 y DQB1 | 25 |



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

2 Resumen

La nefritis lúpica (NL) es un padecimiento asociado a pacientes que sufren de lupus eritematoso sistémico (LES). Consiste en una patología que produce daño glomerular y puede significar un riesgo a la vida del paciente. La incidencia y prevalencia de esta enfermedad es mayor en poblaciones de Asia (55%), África (51%) y Latinoamérica (43%). El HLA es un complejo proteico que participa en la respuesta inmunitaria. Aún no se ha determinado un polimorfismo específico que produzca la patogénesis de la NL, pero los genes del antígeno leucocitario humano HLA-DQB1 y HLA-DRB1 han sido estudiados como responsables de la susceptibilidad y desarrollo de la enfermedad. Se realizó la caracterización alélica de los alelos HLA-DQB1 y HLA-DRB1 en pacientes con diagnóstico de nefritis lúpica que visitan el Hospital General San Juan de Dios. Esto se realizó por medio de PCR-SSO. Los perfiles de HLA-DQB1 y HLA-DRB1 fueron analizados para determinar frecuencias alélicas, haplotípicas, equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento. La tipificación de los alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1 es importante para conocer las características genéticas asociadas con el desarrollo de la NL en la población guatemalteca. Finalmente, dado que este estudio es la continuación del estudio DIGI B17-2022, llevado a cabo durante el año 2022 por nuestro mismo equipo de investigadores, fue posible comparar las frecuencias alélicas y los haplotipos de los alelos de HLA entre los pacientes con LES, los pacientes con NL y personas sin diagnóstico de estas enfermedades. Este es el primer análisis de esta naturaleza y aporta al desarrollo de la investigación molecular de estas enfermedades en el país.

Palabras clave: sistema antígeno leucocitario humano, enfermedad autoinmune, inmunogenética, desequilibrio de ligamiento.

Abstract

Lupus nephritis (LN) is a condition associated with patients suffering from systemic lupus erythematosus (SLE). It consists of a pathology that produces glomerular damage and can pose a risk to the patient's life. The incidence and prevalence of this disease is higher in populations in Asia (55%), Africa (51%) and Latin America (43%). HLA is a protein complex that participates in the immune response. A specific polymorphism that causes the pathogenesis of LN has not yet been determined, but the human leukocyte antigen genes HLA-DQB1 and HLA-DRB1 have been studied as responsible for the susceptibility and development of the disease. Allelic characterization of the HLA-DQB1 and HLA-DRB1 alleles was carried out in patients with a diagnosis of lupus nephritis who visit the San Juan de Dios General Hospital. This was done by means of PCR-SSO. The HLA-DQB1 and HLA-DRB1 profiles were analyzed to determine allele frequencies, haplotypes, Hardy-Weinberg equilibrium, and linkage disequilibrium. The typing of the HLA-DQB1 and HLA-DRB1 alleles is important to understand the genetic characteristics associated with the development of LN in the Guatemalan population. Finally, since this study is the continuation of the DIGI



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

B17-2022 study, carried out during 2022 by our same team of researchers, it was possible to compare the allele frequencies and haplotypes of HLA alleles among patients with SLE, patients with LN and people without a diagnosis of these diseases. This is the first analysis of this nature and contributes to the development of molecular research of these diseases in the country.

Keywords: human leukocyte antigen system, autoimmune disease, immunogenetics, linkage disequilibrium.

3 Introducción

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune que afecta a una gran variedad de órganos y tienen diferentes presentaciones clínicas (Fava y Petri, 2019). El diagnóstico se basa en un conjunto de características clínicas y la presencia de anticuerpos antinucleares (Kuhn et al., 2015). Es una enfermedad caracterizada por la destrucción de tejidos sanos como consecuencia de la activación de células B y T autorreactivas (Craft, 2011). Uno de los órganos más afectados por el LES es el riñón, produciendo daño nefrótico en aproximadamente el 50% de los pacientes, dando origen a nefritis lúpica (NL) (Almaani et al., 2017). La NL se refiere a la inflamación del riñón, que puede incluir patología glomerular, tubointerstitial y vascular (Imran et al., 2015). Es una patología que puede variar en cuanto a su presentación histopatológica y el daño causado a los glomérulos, la NL se clasifica en clases de I a VI, siendo I la menos riesgosa y siendo VI una etapa terminal (Weening et al., 2004). La NL es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad entre los pacientes diagnosticados con LES, esto a pesar del desarrollo de potentes terapias antiinflamatorias e inmunosupresoras. La NL afecta a los riñones, siendo la mayor parte de los diagnósticos de NL sucedidos entre los 5 años siguientes al diagnóstico con LES (Pons-Estel et al., 2011). Es de suma importancia mencionar que la mortalidad para los pacientes con NL disminuyó notablemente entre los años 1975 y 1995, pero se ha mantenido estable desde ese momento (Anders et al., 2020). Además, la incidencia y prevalencia de esta enfermedad varía dependiendo de la población, ya que se ha reportado mayor incidencia acumulada en poblaciones de Asia (55%), África (51%) y latinoamericanos (43%) (Ortega et al., 2010). La causa de la NL es compleja y multifactorial, incluye aspectos genéticos y ambientales (Lech & Anders, 2013). En el ámbito genético, no se ha determinado un polimorfismo específico que produzca la patogénesis de la NL, pero los genes del antígeno leucocitario humano (HLA) han recibido una atención considerable entre los genes candidatos que puede ser responsable de la susceptibilidad y el desarrollo del LES (Boackle, 2013).

El HLA es un complejo proteico que participa en un gran número de funciones fisiológicas, entre ellas, la respuesta inmunitaria (Guerrero et al., 2015). Este complejo molecular es conocido por ser la región más variable del genoma humano, por lo que ha sido vinculado con un gran número de enfermedades (Arnaiz-Villena et al., 2021). Para la NL, se han realizado algunos estudios alrededor del mundo, resaltando el metaanálisis de Niu y

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

colaboradores (2014), en el que proponen a los alelos DRB1*03 y DRB1*15, como los alelos de riesgo para el desarrollo de NL y por el otro lado, a los alelos DRB1*04 y DRB1*11 como los protectores contra NL. Sin embargo, el riesgo que presentan los pacientes puede variar dependiendo de la etnia (Castaño-Rodríguez et al., 2008). De Holanda y colaboradores (2018) realizaron un estudio en pacientes brasileños con NL, en los que los alelos de HLA más frecuentes fueron B*08, DRB1*08 y DRB1*15. Así mismo, un estudio realizado en Marruecos, concluyó que el alelo DRB1*15 es significativamente más frecuente en los pacientes con NL (Bhallil et al., 2016). Además, para una población italiana, los alelos más frecuentes fueron DRB1*15, DRB1*03 y DRB1*07 (Marchini et al., 2003). Estos resultados hacen visible la variación que puede presentarse entre las diferentes etnias. Guatemala, es un país con una gran población maya, grupo poco estudiado, por lo que es importante conocer las características de la población para poder tomar decisiones a futuro que favorezcan a los pacientes que sufren de NL en el país.

En el presente estudio se exploraron los alelos de la clase II de HLA en pacientes que asisten a un hospital en la ciudad de Guatemala. Esto se realizó por medio de la metodología conocida como PCR-SSO en la plataforma Luminex, y se obtuvieron los alelos HLA-DRB1 y HLA-DQB1 de cada paciente. Es importante mencionar, que este estudio fue la segunda parte del estudio realizado durante el año 2022, en el que se caracterizó los alelos HLA-DRB1 y HLA-DQB1 de pacientes con LES en Guatemala, en el que también se incluyeron datos de guatemaltecos sanos. De esta manera se pudo evaluar si existen diferencias entre las frecuencias de los alelos y haplotipos de HLA-DRB1 y HLA-DQB1, entre las poblaciones sanas, pacientes con LES y pacientes con LES y NL. Con ello fue posible seguir contribuyendo con la caracterización genética del LES y la NL, permitiendo definir asociaciones y haplotipos de los alelos de HLA con la enfermedad.

4 Antecedentes

Estudios anteriores han abordado el papel de HLA clase II (DR y DQ) en la patogénesis de la enfermedad (Ramos et al., 2010). De tal manera, múltiples estudios han logrado determinar que los genes HLA-DRB1 y HLA-DQ predisponen y representan un riesgo para el desarrollo de LES y NL, por lo cual sus polimorfismos han sido ampliamente estudiados (Bastian et al., 2007; Shimane et al., 2013). Estos genes han sido considerados como los más polimórficos por contar con alrededor de 1000 alelos descubiertos (Graham et al., 2002). Por otra parte se ha determinado que los genes HLA-DR y HLA-DQ permanecen en un estado de desequilibrio de ligamiento y las diferentes combinaciones de haplotipos podrían modular la susceptibilidad a LES y NL (Graham et al., 2002). Se ha logrado determinar una gran variedad de variantes genéticas para LES, sin embargo, son muy limitados los biomarcadores correlacionados para LN. Durante un estudio realizado en Italia se tipificó los alelos HLA-DRB1*, HLA-DQA1*, HLA-DQB1* y HLA-DPB1* en pacientes con NL. De ellos, se obtuvo que el alelo HLA-DQA1*0101 se asoció fuertemente con NL mientras que el alelo HLA-DRB1*1501 se asoció de una forma marginal. Por el contrario, al analizarse los haplotipos HLA-DRB1*1501 en pacientes con LES se concluyó que el alelo HLA-



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

DRB1*1501 aumentaba el riesgo de desarrollar NL lo cual es conferido por el alelo DQA1*0101 (Marchini et al., 2003). Dentro de los biomarcadores de riesgo para NL dentro de la región del CMH se encuentran 5 variantes de riesgo HLA-DR β 1 aminoácido 11, HLA-DQ β 1 aminoácido 45, HLA-A aminoácido 156, HLA-DP β 1 aminoácido 76 y una variante sin sentido PRRC2A. Estas variantes fueron determinadas en pacientes provenientes de China (Xu et al., 2017). Estudios recientes han seguido evaluando la relación de los alelos de HLA con el desarrollo de la enfermedad. Un estudio realizado en Malasia demostró que el alelo HLA-DRB1*04 se encuentra asociado al desarrollo de NL. Esto fue comprobado por el desarrollo de una respuesta inflamatoria intensa en pacientes con LES (Selvaraja et al., 2021). Así mismo, un estudio realizado en Brasil ha logrado determinar que la presencia de HLA-DRB1*15 consiste en un factor de predisposición al desarrollo de LES y NL, sin embargo, dicha variante no está relacionada con la supervivencia en pacientes con trasplante renal (de Holanda et al, 2018).

5 Planteamiento del problema

La NL consiste en una común y severa manifestación del LES. Esta se observa entre el 20 - 60% de pacientes con LES, causando daño renal y representando una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes (Pons-Estel et al., 2011). La incidencia y prevalencia de la NL se ve influenciada por la edad, el sexo, la etnia y la región geográfica. La mayor ocurrencia de la enfermedad se presenta en pacientes de origen asiático, africano, nativo americano y latinos, llegando a representar entre el 40 - 70% de casos, mientras que en pacientes con LES de origen europeo se observa en un 30% de casos (Mejia-Vilet & Rovin, 2019). No obstante, en Guatemala la información es limitada, habiendo pocos estudios epidemiológicos sobre la enfermedad en el país. Recientemente, se publicó una prevalencia del 16.9% (32/190 casos evaluados) entre los años 2017 - 2021 (Benavides et al., 2021), lo cual indica que es una enfermedad de importancia clínica de la cual se deberían enfocar más esfuerzos de investigación acerca de su patogénesis y características genéticas en pacientes guatemaltecos.

Debido a que la NL es una manifestación del LES, muchos de los factores de riesgo presentes en LES se observan en la NL. De tal manera, la asociación entre el LES y los genes HLA-DQB1 y HLA-DRB1 también es estudiada en pacientes con NL (Kuo et al., 2015). A pesar de que los estudios específicos en pacientes con NL no son tan comunes como los que evalúan pacientes a LES en general, actualmente se conoce que los alelos HLA-DRB1*15, HLA-DQB1*06:02, HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DRB1*04 y HLA-DR15 representan un incremento del riesgo a desarrollar la enfermedad (Obrișcă et al., 2021; Parikh et al., 2020; Selvaraja et al., 2021). Dicha información sugiere que deben ser llevados a cabo estudios de caracterización alélica del gen HLA en la población guatemalteca con NL.

Caracterizar los genes HLA en pacientes con NL es útil por sus aplicaciones en medicina de precisión y preventiva. Así mismo, representa una contribución científica importante para el país en el área de la reumatología. Los resultados obtenidos de la caracterización de los genes

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

HLA serían útiles para la aplicación de tratamientos. Esto debido que se conoce que la resistencia a fármacos en el tratamiento del LES se encuentra asociada a algunos de los alelos de HLA -DRB1 (HLA-DRB1*04 y DRB1*1112) y HLA-DQB1 (Foschi et al., 2019; Yang et al., 2020), lo cual sugiere que en la NL podría observarse una asociación similar. La contribución científica para el país reside en la generación de información inmunogenética que puede ser utilizada por reumatólogos para la toma de decisiones acerca del tratamiento de la enfermedad y para definir planes sobre el manejo de la enfermedad en el país.

6 Marco teórico

Sistema del Antígeno Leucocitario Humano (HLA)

El sistema del antígeno leucocitario humano (HLA) juega un rol importante en la regulación de la función inmune del organismo. Los genes del HLA se encuentran localizados en el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), localizado en el cromosoma 6p21.3, pueden presentar un alto nivel polimórfico y estar sujetos a desequilibrio de ligamiento. Los genes del CMH se dividen en tres clases: la Clase I altamente polimórfica que presenta los genes clásicos HLA-A, HLA-B y HLA-C, y los no clásicos HLA-E, HLA-F y HLA-G los cuáles poseen polimorfismo limitado; la Clase II que presenta los genes HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQA2, HLA-DQB1, HLA-DQB2, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB2, HLA-DRB3, HLA-DRB4 y HLA-DRB5 involucrados en el procesamiento y presentación de antígenos; finalmente la Clase III presenta genes involucrados en la respuesta inflamatoria y en la maduración de leucocitos. Las proteínas de la Clase I se expresan en la superficie de todas las células nucleadas y están conformadas por una cadena pesada transmembrana con tres dominios extracelulares y una cadena ligera que une la cadena pesada a la membrana citoplasmática. Por su parte, la expresión de las proteínas de la Clase II se encuentra limitada a células inmunes específicas como células B, células T activadas, macrófagos, células dendríticas y epitelio del timo. Además, se encuentran conformadas por una cadena alfa y una beta, y cada una de ellas posee dos dominios extracelulares. Las moléculas de HLA interactúan con los receptores de las células T en el timo para modular la respuesta inmune y determinar aquellas células que son reconocidas como propias del organismo (Dendrou et al., 2018; Klein & Sato, 2000; Madden & Chabot-Richards, 2019; Mosaad, 2015). La nomenclatura actual para HLA incluye campos numéricos basados en la secuencia de ADN obtenida: 1) grupo alélico o de antígeno, 2) la secuencia de aminoácidos específica del alelo, 3) presencia de polimorfismos sinónimos y 4) diferencias en regiones no codificantes. A ello se le agrega un asterisco cuando el alelo ha sido determinado con metodología molecular (Marsh et al., 2010).

Nefritis Lúpica

La nefritis lúpica es una forma de glomerulonefritis y constituye una de las manifestaciones más complicadas y graves del LES (Hanly et al., 2015; Anders et al., 2020). La NL se

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

clasifica histológicamente en 6 clases distintas las cuales se manifiestan en diferentes grados de daño renal. Esta patología se encuentra asociada a una muy baja supervivencia, alta morbilidad y se presenta particularmente en pacientes que desarrollan una enfermedad renal terminal (Hanly et al., 2015). A pesar de esto, recientes hallazgos indican que ha aumentado la tasa de supervivencia en pacientes sin una enfermedad renal terminal. Actualmente el tratamiento de NL se basa en medicamentos inmunosupresores. Sin embargo, a pesar de los buenos resultados de dichos medicamentos al aumentar la tasa de supervivencia en los pacientes entre las décadas de 1980 y 1990, aún no se ha logrado disminuir la incidencia de enfermedades renales terminales (Fanouriakis & Bertias, 2019; Anders et al., 2020). Existen múltiples factores por los cuales se produce la NL, dentro de estos se encuentran los factores ambientales y genéticos (Alarcon et al., 2005). La prevalencia y la incidencia de esta patología depende principalmente de la población de estudio y los criterios de diagnóstico. Un estudio realizado en Estados Unidos durante los años 2000-2004 determinó una mayor prevalencia e incidencia de NL en afroamericanos seguido de latinos y asiáticos (Feldman et al., 2013) Por otra parte, durante un estudio de cohorte internacional se determinó que la frecuencia de NL en la población afroamericana fue de 39,9%, en latinoamericanos fue de 49,3% y en asiáticos 36,8% (Hanly et al., 2016). En Guatemala hay muy poca información sobre la prevalencia de NL, sin embargo, durante el 2021 se logró determinar que la incidencia de la NL representó el 16.9% de glomerulopatías en el Hospital General San Juan de Dios (Benavides et al., 2021).

Loci HLA-DQB1 y HLA-DRB1 y Nefritis Lúpica

Dentro de los factores genéticos más estudiados se encuentra el papel de HLA clase II (DR y DQ) en la patogénesis de la enfermedad (Ramos et al., 2010). Se ha logrado establecer que siete alelos de HLA clase II están asociados con la susceptibilidad del desarrollo de LES y NL en diferentes etnias (Ceccarelli et al., 2015). Múltiples estudios han logrado determinar que los genes HLA-DRB1 y HLA-DQ predisponen y representan un riesgo para el desarrollo de LES y NL, por lo cual sus polimorfismos han sido ampliamente estudiados (Bastian et al., 2007; Shimane et al., 2013). Estos genes han sido considerados como los más polimórficos por contar con miles de alelos descubiertos (Graham et al., 2002). Por otra parte, se ha determinado que los genes HLA-DR y HLA-DQ permanecen en un estado de desequilibrio de ligamiento y las diferentes combinaciones de haplotipos podrían modular la susceptibilidad a LES y NL (Graham et al., 2002). Se ha logrado determinar una gran variedad de variantes genéticas para LES, sin embargo, son muy limitados los biomarcadores correlacionados para LN. Durante un estudio realizado en Italia se tipificó los alelos HLA-DRB1*, HLA-DQA1*, HLA-DQB1* y HLA-DPB1* en pacientes con NL. De ellos, se obtuvo que el alelo HLA-DQA1*0101 se asoció fuertemente con NL mientras que el alelo HLA-DRB1*1501 se asoció de una forma marginal. Por el contrario, al analizarse los haplotipos HLA-DRB1*1501 en pacientes con LES se concluyó que el alelo HLA-DRB1*1501 aumentaba el riesgo de desarrollar NL lo cual es conferido por el alelo DQA1*0101 (Marchini et al., 2003). Dentro de los biomarcadores de riesgo para NL dentro



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

de la región del CMH se encuentran 5 variantes de riesgo HLA-DR β 1 aminoácido 11, HLA-DQ β 1 aminoácido 45, HLA-A aminoácido 156, HLA-DP β 1 aminoácido 76 y una variante sin sentido PRRC2A. Estas variantes fueron determinadas en pacientes provenientes de China (Xu et al., 2017). Estudios recientes han seguido evaluando la relación de los alelos de HLA con el desarrollo de la enfermedad. Un estudio realizado en Malasia demostró que el alelo HLA-DRB1*04 se encuentra asociado al desarrollo de NL. Esto fue comprobado por el desarrollo de una respuesta inflamatoria intensa en pacientes con LES (Selvaraja et al., 2021). Así mismo, un estudio realizado en Brasil ha logrado determinar que la presencia de HLA-DRB1*15 consiste en un factor de predisposición al desarrollo de LES y NL, sin embargo, dicha variante no está relacionada con la supervivencia en pacientes con trasplante renal (de Holanda et al, 2018).

Principio de Hardy-Weinberg

A partir del principio de Hardy-Weinberg (HW) se puede comprender el por qué una población se mantiene en equilibrio genético y sus frecuencias alélicas y genotípicas no varían de una generación a otra, dando como resultado que dicha población no evoluciona con respecto al locus de estudio (Solomon et al., 2013). El principio de HW establece dos postulados fundamentales en la genética de poblaciones. El primero de los postulados indica que las frecuencias genotípicas se expresan como una función simple de las frecuencias alélicas después de un evento de apareamiento aleatorio. Esto implica que las características genéticas de las poblaciones pueden ser descritas como las frecuencias alélicas en lugar de matrices con todos los genotipos posibles. El segundo postulado explica que las frecuencias genotípicas y alélicas permanecen constantes a lo largo del tiempo mientras haya una ausencia de fuerzas evolutivas como la selección natural, deriva genética, mutación y migración (May, 2004; Waples, 2015). En estudios de genética de poblaciones, el principio de HW es empleado como un modelo nulo para evaluar los mecanismos del cambio evolutivo en poblaciones que presentan reproducción sexual (Griffiths et al., 2012).

Desequilibrio de ligamiento

El desequilibrio de ligamiento (LD, por sus siglas en inglés) se presenta cuando existe una asociación no aleatoria entre los alelos de dos loci. El LD funciona como un indicador con el cual es posible conocer las fuerzas de la genética de poblaciones que estructuran el genoma de los organismos (Griffiths et al., 2012). Así mismo, el LD es utilizado para realizar aproximaciones acerca de los distintos eventos demográficos del pasado, mapear genes asociados a caracteres cuantitativos y a enfermedades hereditarias, y para estudiar la evolución de grupos de genes en específico. El análisis de LD es útil para la obtención de información acerca de eventos pasados y restringe las posibles respuestas a la selección natural y artificial, como principales responsables evolutivos. Así mismo, al estudiar el LD se puede obtener un reflejo a lo largo de todo el genoma acerca de la historia poblacional, el sistema de reproducción y los distintos patrones de subdivisión geográfica existentes. Por

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

otro lado, al estudiar regiones específicas del genoma se puede conocer la historia de la selección natural, la conversión de genes, las mutaciones y otras fuerzas evolutivas que son las responsables de los cambios en las frecuencias de los genes (Slatkin, 2008; Wall & Pritchard, 2003; Zhao et al., 2007). Además, la aparición excesiva de ciertos haplotipos en una población se explica en que ambos alelos son heredados en conjunto (Nepom, 2010). En el caso de HLA se conoce que los genes HLA-DQB1 y HLA-DRB1 presentan desequilibrio de ligamiento (Cabrera-Calzadilla et al., 2018). Sin embargo, es necesario conocer cuáles son los haplotipos que se encuentran mayormente asociados al LES en nuestra población de estudio.

Haplotipos HLA

La reconstrucción de haplotipos es una herramienta de gran utilidad para la determinación de haplotipos asociados a las enfermedades y es ampliamente usada en genética clínica (Mitsui et al., 2020). Los genes del sistema HLA se heredan en conjunto de generación en generación, contando con bajas probabilidades de recombinación genética. Los conjuntos de genes que son heredados de esa manera son conocidos como haplotipos y son definidos analizando la herencia de los alelos en familias. El estado de estabilidad genética consiste en que los haplotipos se comportan de manera conservada entre individuos no relacionados de un grupo humano y en un periodo de tiempo determinado. El estado de estabilidad genética permite que diferentes grupos humanos cuenten con haplotipos de HLA distintivos, característicos y específicos a las relaciones de ancestría (Barquera & Granados, 2013; Yunis et al., 2006). Como parte de un estudio realizado en Marruecos, se encontró que el haplotipo mayormente encontrado en pacientes con LES es el HLA-DRB1*15-DQB1*06, haplotipo que ha sido asociado con LES en otras regiones y países del mundo como América, China y Arabia Saudita (Bhallil et al., 2017).

7 Estado del arte

En años recientes, el estudio del LES y la NL ha sido de amplio interés dentro de la comunidad científica especializada en reumatología. Ejemplo de ello son estudios que buscan comprender la relación de la NL con los genes HLA, llegando a descubrirse que los alelos HLA-DR4 y HLA-DR11 poseen un aparente efecto protector, mientras que los alelos HLA-DR3 y HLA-DR15 representan un incremento del riesgo a desarrollar la enfermedad (Parikh et al., 2020). Otros alelos que han sido reportados como factores de riesgo son el HLA-DRB1*15 y el HLA-DQB1*06:02 en población asiática, y el HLA-DR2 en población caucásica (Obrışcă et al., 2021). Así mismo, en años recientes se han publicado diversos estudios sobre la prevalencia y asociación de los alelos de HLA en distintas poblaciones de pacientes con NL. De ellos, se puede mencionar el estudio de Selvaraja y colaboradores (2021) en el que reportan el alelo HLA-DRB1*04 como factor de riesgo en pacientes malayos de Malasia. También destaca un estudio brasileño en el que se obtuvo una mayor prevalencia de los alelos B*08, DRB1*08 y DRB1*15 en pacientes con LES y NL al ser



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

comparados con grupos control, destacando el alelo DRB1*15 como un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad (de Holanda et al., 2018).

Por otro lado, debido a que la NL es una complicación severa del LES, recientes estudios buscan conocer la asociación de diversos factores de riesgo que pueden ser compartidos entre la NL y el LES. Ejemplo de ello son los GWAS (Genome-wide association studies, por sus siglas en inglés) que han identificado más de 80 genes asociados al LES y se encuentran potencialmente asociados a la NL. De ellos, destacan polimorfismos de nucleótido único (SNP, por sus siglas en inglés) en genes que codifican proteínas involucradas en la señalización y función de células B y T, inflamación y factores de transcripción. Por último, diversos GWAS han evaluado la variación en el número de copias y los patrones de metilación de genes en LES, los cuáles podrían estar asociados a la NL (Anders et al., 2020; Imgenberg-Kreuz et al., 2018; Song et al., 2020).

Respecto al conocimiento más novedoso y relevante de la NL en Guatemala, Benavides y colaboradores (2021) reportaron la prevalencia de la enfermedad durante los años 2017-2021 en el Hospital General San Juan de Dios, siendo esta del 16.9%, la cual consiste en 32 casos de una muestra de 190 con enfermedad glomerular (Benavides et al., 2021). No obstante, no existen otras investigaciones recientes en epidemiología de la enfermedad y que analicen los alelos de HLA portados por la población de pacientes con NL en el país.

8 Objetivos

8.1 Objetivo general

Caracterizar los alelos de los genes HLA-DQB1 y HLA-DRB1 en pacientes diagnosticados con nefritis lúpica y personas sin la enfermedad en el Hospital General San Juan de Dios.

8.2 Objetivos específicos

8.2.1 Identificar los alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1 que se presentan en los pacientes con diagnóstico de nefritis lúpica del Hospital General San Juan de Dios.

8.2.2 Conocer las frecuencias de los alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1 que se presentan en los pacientes con diagnóstico de nefritis lúpica del Hospital General San Juan de Dios.

8.2.3 Definir la asociación de los alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1 con la presencia de nefritis lúpica del Hospital General San Juan de Dios.

8.2.4 Establecer los haplotipos de los pacientes con diagnóstico de nefritis lúpica del Hospital General San Juan de Dios, según los alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1.

8.2.5 Realizar una comparación de la caracterización genética de los genes HLA-DQB1 y HLA-DRB1 y los haplotipos presentes entre los pacientes con NL, pacientes con LES y controles sanos guatemaltecos.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

9 Hipótesis

Al ser un estudio exploratorio, no se plantea la formulación de una hipótesis.

10 Materiales y métodos

Delimitación en tiempo

El proyecto fue realizado entre los meses de febrero a noviembre de 2023. Durante dicho periodo de tiempo se realizó el reclutamiento de pacientes y la recolección de información mediante entrevistas y lecturas de consentimientos informados de investigación. Se realizó la toma de muestras en aquellos pacientes que dieron su consentimiento para entrar al estudio. Posteriormente, se llevaron a cabo los análisis genéticos y moleculares (que se irán realizando conforme se lleve a cabo la recolección de la muestra). Finalmente, se realizó la interpretación de resultados, el análisis de datos y la escritura del informe final.

Delimitación espacial

El reclutamiento de pacientes, la recolección de información mediante entrevistas y lecturas de consentimientos informados de investigación y la toma de muestras, en aquellos pacientes que dieron su consentimiento para entrar al estudio, se llevó a cabo en las áreas de reumatología y nefrología del Hospital General San Juan de Dios, ubicado en la zona 1 de la Ciudad de Guatemala. El procesamiento de las muestras para su análisis genético y molecular se realizó en el Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Hospital General San Juan de Dios. Por último, el análisis de los datos y la redacción del informe final fue realizado en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Enfoque de la investigación

Cuantitativo.

Método

Se llevó a cabo la recolección de muestras sanguíneas de pacientes con NL que acudían a control rutinario de las consultas externas de reumatología y/o nefrología del Hospital General San Juan de Dios. La muestra fue tomada por el médico nefrólogo y colocada en un tubo de recolección de sangre con EDTA. Únicamente se tomaron y analizaron las muestras de los pacientes que aceptaron participar en el estudio, posterior a la realización de una entrevista a los pacientes, en la que se explicaron todos los términos y condiciones del estudio. Con un consentimiento informado se obtuvo la autorización por escrito para tomar y utilizar las muestras sanguíneas para las pruebas genéticas de genotipificación de los alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1 de estos pacientes. Así mismo, a los pacientes incluidos al

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

estudio, se les realizó una entrevista para recolectar datos demográficos y antecedentes de la enfermedad.

Para los análisis genéticos y moleculares, se utilizó el método conocido como técnica PCR-SSO en la plataforma Luminex. Esto se realizó utilizando los termocicladores que se encuentran en el Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Hospital General San Juan de Dios y empleando cebadores específicos para los loci de interés. El instrumento que permite tipificar los alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1, es el LabScan 100/200 System y también se encuentra dentro de las instalaciones de este laboratorio. Los kits necesarios para el procesamiento de las muestras son dos: Kit LabTypeTMSSo Class II Locus DQ typing test – 20 test y Kit LabTypeTMSSo Class II Locus DR typing test – 20 test. Es decir, se deben realizar dos genotipificaciones a cada muestra, una por cada gen. Estos kits cuentan con los reactivos para la tipificación de los locus HLA-DRB1 y HLA-DQB1. Por su parte, la Facultad de Ciencias Médicas aportó con el análisis de los datos, así como con la escritura del informe final. Los investigadores cuentan con capacitaciones para la utilización del LabScan 100/200 System y con conocimientos teóricos y prácticos sobre biología molecular.

El presente proyecto representa una continuación de proyectos de investigación pasados y de una línea de investigación que involucra a profesionales en las ciencias biomédicas. Dentro de los proyectos de investigación previos destaca el proyecto DIGI B17-2022 *“Caracterización alélica de los genes HLA-DQB1 y HLA-DRB1 en pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico”*, llevado a cabo durante el año 2022 por nuestro mismo equipo de investigadores. De tal manera, las muestras de controles sanos y los pacientes con lupus eritematoso sistémico sin nefritis lúpica ya fueron tipificadas, sin embargo no se han realizado los análisis comparativos pertinentes. Se realizarán los análisis comparativos y de correlación que nos permitan establecer la manera en la que los diferentes alelos de HLA-DRB1 y HLA-DQB1 están asociados con la NL en pacientes guatemaltecos. La selección de la muestra responde a lo escaso de los casos diagnosticados con NL y a los elevados costos de las pruebas de tipificación para HLA, por lo que fueron seleccionados a conveniencia los 40 participantes que acudieron al área de reumatología y nefrología que hayan sido previamente diagnosticados con NL. Se contó con los datos de 50 pacientes diagnosticados con LES obtenidos del proyecto DIGI B17-2022. Los datos de las personas sanas incluidas se refieren a donadores de órgano sólido, a los cuales se le han realizado pruebas de laboratorio que permiten descartar algún padecimiento, Todos los pimentacientes de LES y personas sanas fueron entrevistados para la obtener su consentimiento del uso de los datos obtenidos en los estudios previos. El trabajo fue presentado ante el comité de ética de la Universidad de San Carlos de Guatemala obteniendo un aval bioético.

Recolección de información

Pacientes que visitaron el área de reumatología y nefrología entre los meses de febrero de 2023 a noviembre de 2023 del Hospital General San Juan de Dios y que tuvieron un diagnóstico de NL, fueron incluidos en el estudio. A todos los pacientes que entraron al

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

estudio, se les tomó un consentimiento informado en el que se les explicó los objetivos y procedimientos necesarios para el estudio y en el cual autorizó participar en la entrevista y la toma de una muestra de sangre periférica y el uso de sus datos para ser analizados y posteriormente publicados (Apéndice 1). Seguido a esto, fueron entrevistados de manera privada. Una copia del consentimiento fue entregada al paciente y otra fue conservada y resguardada por el equipo de investigación. La entrevista fue realizada por el investigador en el área de nefrología, únicamente a los pacientes con diagnóstico de NL. A los pacientes se les asignó un código de identificación para mantener el anonimato durante el estudio, la confidencialidad (es la garantía que proporciona el investigador sobre la no divulgación de la información personal, sensible) a lo largo del estudio. El estudio fue totalmente voluntario por lo que los pacientes tuvieron la libertad de retirarse. Durante la entrevista y lectura de consentimiento informado de investigación no se realizó ninguna grabación audiovisual. Durante la entrevista se tomó una hoja de datos en la que incluyó algunos datos demográficos y relacionados con el diagnóstico de la enfermedad (Apéndice 2).

En condiciones asépticas y haciendo uso de buenas prácticas clínicas, se tomaron 10 mililitros de sangre periférica, empleando una jeringa de extracción de 10 mililitros. La sangre extraída fue guardada en un tubo con EDTA para su almacenamiento hasta el momento de la extracción de ADN. Seguido a esto, las muestras sanguíneas fueron utilizadas para la extracción de ADN por medio de extracción automatizada. A partir del ADN extraído, se realizó un PCR de punto final, específico para los loci HLA-DQB1 y HLA-DRB1. Para el análisis del perfil de HLA, se empleó la técnica conocida como PCR-SSO y Luminex. Para ello, se desnaturalizan los amplicones y se neutraliza la solución. Seguido a esto, se hibridan con sondas de ADN complementarias conjugadas con microesferas que presentan diferente fluorescencia. El instrumento LabScan 100, perteneciente al Laboratorio de Inmunogenética del Hospital General San Juan de Dios, permite la identificación de la fluorescencia de cada microesfera, luego de ser etiquetadas con un reactivo denominado estreptavidina- ficoeritrina (SA-PE, por sus siglas en inglés). El instrumento LabScan 100 detectó la intensidad de la fluorescencia, dependiendo de cuántos fragmentos de ADN se unieron a las microesferas. A partir de esto, el software es capaz de genotipificar el HLA de cada muestra. Todo el análisis genético y molecular fue realizado en el Laboratorio de Inmunogenética del Hospital General San Juan de Dios con el equipo perteneciente a éste.

Dado que este proyecto propone la continuación de un estudio realizado anteriormente, los datos genéticos del control de personas sanas y personas con diagnóstico de LES sin NL, ya se encontraron analizados molecularmente. Esta sección del estudio fue para obtener los datos genéticos de los pacientes con diagnóstico de NL, lo cual permitió realizar las comparaciones y correlaciones pertinentes. Es decir, durante este proyecto se procesaron únicamente muestras de pacientes con NL, aunque en los análisis estadísticos y en el trabajo final se incluyeron los datos de toda la muestra, incluyendo el control de personas sanas.

Únicamente el equipo de investigadores tuvo acceso al manejo de muestras, resultados y datos generados durante el desarrollo del presente proyecto. Las muestras no serán utilizadas

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

en futuros estudios. No obstante, a partir del consentimiento informado se solicitó la autorización del paciente para el uso de sus resultados y datos en futuras investigaciones.

Universo o población: pacientes con diagnóstico de NL en Guatemala.

Muestra: muestra a conveniencia de 40 pacientes con diagnóstico de NL que se presentan al área de reumatología y nefrología del Hospital General de Dios.

Criterios de inclusión: pacientes que presenten un diagnóstico de NL, que acepten participar en el estudio.

Criterios de no inclusión: pacientes que presenten un diagnóstico de NL y no acepten participar en el estudio.

Criterios de selección de informantes: profesionales especialistas en el área de reumatología y nefrología del Hospital General San Juan de Dios.

Instituciones: Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de San Carlos de Guatemala y el Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética, Hospital General San Juan de Dios.

Técnicas e instrumentos

Consentimiento informado

A los pacientes diagnosticados con NL que visitaron las áreas de reumatología y nefrología del Hospital General San Juan de Dios y que cumplieron con los criterios de inclusión del estudio, se le explicaron todos los términos y condiciones de su inclusión en la investigación, explicando las bases científicas, éticas y legales del estudio por medio de la lectura de un consentimiento informado de investigación, y al otorgar su consentimiento, estos fueron entrevistados. Los pacientes que dieron su consentimiento a entrar al estudio firmaron una copia del consentimiento informado y otra copia le fue dada al paciente. La entrevista y toma de datos fue realizada exclusivamente a los pacientes que accedieron voluntariamente a participar en la investigación, el investigador llenó una hoja de datos generales obtenidos durante la entrevista al paciente.

Entrevista

La entrevista fue realizada al momento que el paciente otorgó su consentimiento para participar en el estudio. En esta entrevista se incluyeron datos demográficos e información relacionada con su enfermedad. Los datos fueron anotados en una hoja de toma de datos (Apéndice 2).

Toma de muestra sanguínea

La muestra sanguínea fue tomada por el médico reumatólogo. El paciente debió llegar en ayunas y sin haber consumido exceso de grasas el día anterior. En condiciones asépticas y haciendo uso de buenas prácticas clínicas, se tomaron 5 mililitros de sangre periférica,

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

empleando una jeringa de extracción de 5 mililitros. La sangre extraída fue guardada en un tubo con EDTA para su almacenamiento hasta el momento de la extracción de ADN. Las muestras de los pacientes que fueron analizadas fueron seleccionados de manera aleatoria, de tal manera que se incluyó a cualquier paciente con diagnóstico de NL que aceptó ingresar al estudio hasta completar con la muestra establecida de 40 pacientes.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó de manera automatizada por medio del sistema de extracción MagNA Pure 24 System de la empresa Roche Diagnostics. Este sistema emplea el kit de extracción de ADN MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I. Se programó el protocolo de extracción a partir de sangre completa con un volumen de 50 μ l de ADN eluido. Para preparar el sistema de extracción se colocó el número necesario de tubos de eluido en el sistema, el rack con las muestras, el rack con las perlas magnéticas de extracción y los consumibles necesarios. Los consumibles y reactivos utilizados son: piercing tools, puntas de pipeta, perlas magnéticas, proteinasa K, buffer de lisis, buffer de lavado y buffer de elusión. Dichos consumibles y reactivos se encuentran incluidos en el kit de extracción de ADN MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I. Para dar inicio a la extracción, se colocaron las muestras de sangre en tubos etiquetados con un código de barras, que permite su reconocimiento por el sistema. Estas se colocaron en los racks de las muestras y al haber posicionado todos los consumibles y reactivos necesarios, se puso en funcionamiento el protocolo de extracción del sistema MagNA Pure 24 System, previamente seleccionado. Al ser un sistema de extracción automatizada, el usuario no debe intervenir en ningún momento de la extracción. Al concluir la extracción automatizada, se obtuvieron 50 μ l de ADN eluidos en las tiras de tubos de eluido. A continuación, el ADN se pudo emplear para los siguientes pasos de la genotipificación.

Preparación de las muestras y el equipo

Para dar inicio a la tipificación de HLA se programaron los instrumentos antes de iniciar el procesamiento de la muestra. En el analizador LABScan TM 100 se programó el procedimiento de puesta en marcha. Seguido a esto, se estableció un protocolo de incubación a 60°C haciendo uso de un termociclador. Simultáneamente, se preparó un baño de hielo triturado (añadiendo una pequeña cantidad de agua para permitir que la bandeja de PCR se pare directamente sobre hielo). Seguidamente, se descongeló el D-Mix y la muestra de ADN. Para homogeneizar se realizó un breve vortex. Los reactivos (excepto la botella SA-PE 100x) fueron retirados de la refrigeradora y se colocaron a temperatura ambiente para poder ser utilizados. Como último paso, antes de iniciar el procesamiento de la muestra, se mezcló a fondo todo el volumen de buffer de hibridación y toda la mezcla de microesferas en un tubo limpio; protegiéndolos de la luz.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Amplificación y desnaturalización

El primer paso correspondió a la preparación de los reactivos de amplificación. El descongelamiento de los reactivos se realiza sobre hielo para mantener su estabilidad. Para cada reacción de amplificación se emplearon 2 μ l de ADN extraído por cada muestra. En un tubo de microcentrifuga se colocaron 4 μ l de Primer mix, 13 μ l de D-Mix y 1 μ l de taq polimerasa por cada muestra. Los reactivos fueron mezclados gentilmente para homogeneizar la mezcla. Además, se añadieron 18 μ l del master mix a cada pozo en el que se desee aplicar una muestra de ADN y 2 μ l de ADN extraído. Se cubre la bandeja de PCR y se coloca dentro del termociclador. La amplificación, inicia por la desnaturalización del ADN con un ciclo a 95°C por 10 minutos. Seguido a esto, se mantuvo la temperatura a 95°C por 10 minutos y luego, a 58°C durante 10 minutos. Esto se repite durante 45 ciclos. Por último, se llevó a 38°C por 5 segundos y con esto se concluyó la amplificación. La bandeja de PCR fue retirada del termociclador.

Para la desnaturalización del ADN, se utilizó una nueva placa de PCR en la que se añadieron 5 μ l de ADN amplificado de cada muestra, sumado a 2.5 μ l de buffer de desnaturalización. Se mezcló la placa y el líquido contenido en la placa se tornó de color rosado brillante. Seguido a ello, fue incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos. Como siguiente paso, se colocaron 5 μ l de buffer de neutralización en cada pozo, esto se mezcló hasta que se tornó de color amarillo claro y se colocó en un baño de hielo.

Hibridación, lavado y etiquetado

Utilizando la misma placa de PCR del paso anterior, se colocaron 38 μ l de mezcla de hibridación en cada pozo con ADN amplificado, desnaturalizado y neutralizado. Se cubrió la bandeja y se realizó un vortex. Así mismo, se colocaron en el termociclador para su incubación a 60°C durante 15 minutos. Posteriormente, se añadieron 100 μ l de Wash Buffer, se cubrió la placa y se realizó una centrifugación a 1000 gravedades durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y se volvió a agregar Wash Buffer, se sometió a una nueva centrifugación a 1000 g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Dicho paso se repitió hasta concluir con 3 lavados. Durante la última centrifugación, se preparó el 1X SA-PE y se dejó reposar a temperatura ambiente. 50 μ l de SA-PE fueron añadidos a cada pozo, se tapó y homogeneizó. Al mezclar la muestra, se colocó en incubación a 60°C durante 5 minutos. Al concluir la incubación, fueron agregados 100 μ l de Wash Buffer a cada pozo. Se realizó una nueva centrifugación a 1000 g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se añadió nuevamente un total de 80 μ l de Wash Buffer y se transfirió a una microplaca que permite introducir las muestras al instrumento LabScan 100, el cual realizó la genotipificación de los alelos de HLA que presenta cada muestra.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Tabla 1

Operacionalización de las variables o unidades de análisis

| Objetivos específicos | Variables o unidades de análisis que serán consideradas | Forma en que se medirán, clasificarán o cualificarán |
|---|---|--|
| Identificar los alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1 que se presentan en los pacientes con diagnóstico de NL. | Alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1 en pacientes con NL. | Genotipificación por medio de PCR-SSO en la plataforma <i>Luminex</i> . Los resultados obtenidos son los alelos con una genotipificación de alta resolución. |
| Conocer las frecuencias de los alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1 que se presentan en los pacientes con diagnóstico de NL. | Frecuencias de los alelos HLA-DQB1 y HLA-DRB1 de pacientes con NL. | Análisis de frecuencias de los alelos HLA-DQB1 y HLA-DRB1 de pacientes con NL. |
| Definir la asociación de los alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1 con la presencia de NL. | Valor de p que exprese la asociación entre el NL y los diferentes alelos HLA-DQB1 y HLA-DRB1 de pacientes con NL, pacientes con LES y personas sanas. | Prueba exacta de Fisher. |
| Establecer los haplotipos de los pacientes con diagnóstico de nefritis lúpica, según los | Haplotipos de pacientes con NL. | Análisis de frecuencias de los haplotipos. Análisis de desequilibrio de ligamiento. |

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

| | | |
|--|---|--------------------------|
| alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1. | | |
| Realizar una comparación de la caracterización genética de los genes HLA-DQB1 y HLA-DRB1 y los haplotipos presentes entre los pacientes con NL, pacientes con LES y controles sanos guatemaltecos. | Valor de p que exprese las diferencias entre los alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1 presentes en pacientes con NL, pacientes con LES y personas sanas. | Prueba exacta de Fisher. |

Procesamiento y análisis de la información

Los alelos obtenidos fueron analizados con el software Xponent® y el software HLA Fusion 4.1®. Una vez determinado molecularmente el perfil HLA-DQB1 y HLA-DRB1 de la muestra, este fue analizado con el software Arlequin v. 3.5 para determinar frecuencias alélicas, haplotípicas y equilibrio de Hardy-Weinberg. A partir de los análisis de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento se obtuvieron los haplotipos más relevantes que se encuentran asociados a NL.

Para establecer una correlación entre los diferentes alelos de los genes HLA-DQB1 y HLA-DRB1 con la NL se utilizó el test exacto de chi cuadrado con significancia de $p = 0.05$. Para este análisis se utilizó el paquete BIGDAWG del programa RStudio v. 1.4 (RStudio Team, 2015). Para encontrar las diferencias que se presentan en las frecuencias de alelos entre los grupos de pacientes con NL, pacientes con LES y personas sanas, se utilizó la prueba de chi cuadrado con significancia de $p = 0.05$, empleando la misma versión del software RStudio.

Para la determinación de los haplotipos más asociados con la NL se realizó una prueba de desequilibrio de ligamiento por medio del software Arlequin v. 3.5. con el fin de reportar los haplotipos encontrados con mayor frecuencia en los pacientes diagnosticados con NL en Guatemala.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Coherencia de la propuesta de investigación

Tabla 2

Coherencia de la propuesta de investigación

| Objetivos específicos | Métodos, técnicas, instrumentos | Resultados |
|---|--|--|
| Identificar los alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1 que se presentan en los pacientes con diagnóstico de nefritis lúpica. | Genotipificación de HLA por medio de PCR-SSO y Luminex. Empleando LabScan 100, con el software Xponent® y el software HLA Fusion 4.1®. | Alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1 en pacientes con NL. |
| Conocer las frecuencias de los alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1 que se presentan en los pacientes con diagnóstico de NL. | Establecer las frecuencias de los diferentes alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1 en los pacientes con NL, con el software <i>Arlequin</i> v. 3.5. | Frecuencias de los alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1 en pacientes con NL. |
| Definir la asociación de los alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1 con el desarrollo de NL. | Genotipificación de HLA por medio de PCR-SSO y Luminex. Empleando LabScan 100, con el software Xponent® y el software HLA Fusion 4.1®. Test exacto de Fisher. | Fuerza de asociación de los alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1 con el desarrollo de NL. |
| Establecer los haplotipos de los pacientes con diagnóstico de NL, según los alelos de HLA-DQB1 y HLA-DRB1. | Determinación de las frecuencias haplotípicas, equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento con el software <i>Arlequin</i> v. 3.5. Prueba de desequilibrio de ligamiento. | Frecuencia de haplotipos según los alelos HLA-DQB1 y HLA-DRB1. Y haplotipos según los alelos HLA-DQB1 y HLA-DRB1 que presenten desequilibrio de ligamiento en pacientes con diagnóstico de NL. |
| Realizar una comparación de la caracterización genética de los genes HLA-DQB1 y HLA-DRB1 y los haplotipos presentes entre los pacientes con | Genotipificación de HLA por medio de PCR-SSO y Luminex. Empleando LabScan 100, con el software Xponent® y el software HLA Fusion 4.1® y prueba de Prueba exacta de Fisher. | Diferencias estadísticas entre las frecuencias de alelos HLA-DQB1 y HLA-DRB1 presentes en pacientes con NL, LES y personas sanas. |



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

| | | |
|--|--|--|
| NL, pacientes con LES y controles sanos guatemaltecos. | | |
|--|--|--|

11 Aspectos éticos y legales

Este trabajo fue revisado y aprobado por el Comité de bioética en investigación en Salud de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, dictaminado el día 23 de agosto del año 2022.

12 Resultados y discusión

12.1 Resultados

La tabla 1 muestra los resultados del análisis a nivel de locus. Esto nos permite conocer la heterogeneidad de los datos de los genes estudiados, dado que se espera cumplir con el enunciado que implica una alta heterogeneidad en las frecuencias alélicas de los genes polimórficos. En este caso, ninguno de los locus presentó un valor significativo, demostrando una baja heterogeneidad en nuestros datos.

Tabla 3

Análisis a nivel de locus

| Locus | X cuadrado | df | Valor de p | Nivel de alfa con corrección de Bonferroni |
|--------------|-------------------|-----------|-------------------|---|
| DRB1 | 15.626 | 7 | 0.02875 | 0.0167 |
| DQB1 | 7.9511 | 4 | 0.09339 | 0.0167 |
| DRB1-DQB1 | 6.5947 | 5 | 0.25257 | 0.0167 |

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

La tabla 2 presenta las frecuencias relativas de cada alelo del gen HLA-DRB1, además muestra los valores de odds ratio para cada uno de ellos y el valor de p para la prueba de significancia. El alelo DRB1*04 es el más frecuente tanto entre pacientes como entre controles. Sumado a ello, se encontró una gran cantidad de alelos con frecuencias menores a 5, por lo que se encuentran en una categoría denominada “binned” (OR: 0.52, IC:0.18-1.28, p=0.191. Se determinó que ninguno de los alelos presenta un valor de p significativo después de la corrección de Bonferroni (alfa de Bonferroni: 0.006).

Tabla 4

Frecuencias alélicas y OR para el gen HLA-DRB1

| Alelo DRB1 | NL (2n=72) | Controles sin NL (2n=384) | OR (95%CI) | P |
|-------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------|----------|
| *01 | 0.05556 | 0.07031 | 0.78 (0.19-2.34) | 0.802 |
| *03 | 0.125 | 0.04427 | 3.07 (1.15-7.68) | 0.012 |
| *04 | 0.44444 | 0.40365 | 1.18 (0.69-2.02) | 0.517 |
| *07 | 0.01389 | 0.04427 | Binned | Binned |
| *08 | 0.13889 | 0.08594 | 1.71 (0.72-3.79) | 0.189 |
| *09 | 0 | 0.01042 | Binned | Binned |
| *10 | 0.02778 | 0.01042 | Binned | Binned |
| *11 | 0.01389 | 0.04948 | Binned | Binned |
| *12 | 0 | 0.01042 | Binned | Binned |
| *13 | 0.05556 | 0.10156 | 0.52 (0.13-1.51) | 0.275 |
| *14 | 0.02778 | 0.09115 | 0.29 (0.03-1.16) | 0.096 |
| *15 | 0.06944 | 0.05469 | 1.29 (0.37-3.68) | 0.583 |
| *16 | 0.02778 | 0.02344 | Binned | Binned |



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

En la tabla 3 encontramos las frecuencias relativas de cada alelo del gen HLA-DQB1, así como sus odds ratios y valores de p para la prueba de significancia. En este caso, el alelo HLA-DQB1*03 fue el más frecuente en ambos grupos. Sin embargo, las frecuencias fueron muy similares, por lo que no presentó diferencias significativas. Ninguno de los otros alelos presentó un valor significativo después de la corrección de Bonferroni (alfa de Bonferroni: 0.01).

Tabla 5

Frecuencias alélicas y OR para el gen HLA-DQB1

| Alelo DQB1 | NL (2n=72) | Controles sin NL (2n=384) | OR (95%CI) | P |
|------------|------------|---------------------------|------------------|-------|
| *02 | 0.19444 | 0.10677 | 2.02 (0.95-4.07) | 0.047 |
| *03 | 0.47222 | 0.57292 | 0.67 (0.39-1.14) | 0.122 |
| *04 | 0.13889 | 0.08333 | 1.77 (0.74-3.93) | 0.179 |
| *05 | 0.09722 | 0.09375 | 1.04 (0.37-2.51) | 1 |
| *06 | 0.09722 | 0.14323 | 0.64 (0.24-1.51) | 0.353 |

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

La tabla 4 muestra las frecuencias de los haplotipos DRB1-DQB1, sus odds ratios y valores de p. Concordando con los resultados de las tablas anteriores, el haplotipo más frecuente en ambos grupos es el DRB1*04-DQB1*03. Así mismo, una gran cantidad de haplotipos presentaron frecuencias menores a 5, por lo que fueron agrupados en una categoría denominada “binned” (OR: 1.23, IC: 0.70-2.13, p=0.496). Ninguno de los haplotipos presentó valores de p significativos después de la corrección de Bonferroni (alfa de Bonferroni: 0.008).

Tabla 6

Frecuencias haplotípicas y OR para los genes HLA-DRB1 y DQB1

| Haplotipo (DRB1-DQB1) | NL (n=36) | Controles sin NL (n =192) | OR (95%CI) | P |
|-----------------------|-----------|---------------------------|------------------|--------|
| *01-*03 | 0 | 0.002 | Binned | Binned |
| *01-*05 | 0.056 | 0.065 | 0.85 (0.21-2.56) | 1 |
| *01-*06 | 0 | 0.002 | Binned | Binned |
| *03-*02 | 0.111 | 0.039 | Binned | Binned |
| *03-*03 | 0.014 | 0.005 | Binned | Binned |
| *04-*02 | 0.083 | 0.021 | Binned | Binned |
| *04-*03 | 0.361 | 0.378 | 0.93 (0.53-1.62) | 0.895 |
| *04-*04 | 0 | 0.005 | Binned | Binned |
| *07-*02 | 0 | 0.036 | Binned | Binned |
| *07-*03 | 0.014 | 0.005 | Binned | Binned |
| *07-*04 | 0 | 0.003 | Binned | Binned |
| *08-*03 | 0 | 0.008 | Binned | Binned |
| *08-*04 | 0.139 | 0.076 | 1.97 (0.81-4.42) | 0.104 |
| *08-*06 | 0 | 0.003 | Binned | Binned |

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

| | | | | |
|---------|-------|-------|------------------|--------|
| *09-*02 | 0 | 0.005 | Binned | Binned |
| *09-*03 | 0 | 0.005 | Binned | Binned |
| *10-*05 | 0.010 | 0.028 | Binned | Binned |
| *11-*03 | 0.014 | 0.039 | Binned | Binned |
| *11-*06 | 0 | 0.010 | Binned | Binned |
| *12-*05 | 0 | 0.005 | Binned | Binned |
| *13-*02 | 0 | 0.003 | Binned | Binned |
| *13-*03 | 0.014 | 0.026 | Binned | Binned |
| *13-*06 | 0.042 | 0.073 | 0.55 (0.10-1.87) | 0.448 |
| *14-*03 | 0.028 | 0.081 | 0.33 (0.04-1.33) | 0.139 |
| *14-*05 | 0 | 0.005 | Binned | Binned |
| *15-*02 | 0 | 0.003 | Binned | Binned |
| *15-*03 | 0.014 | 0.003 | Binned | Binned |
| *15-*05 | 0 | 0.005 | Binned | Binned |
| *15-*06 | 0.056 | 0.044 | Binned | Binned |
| *16-*03 | 0.014 | 0.021 | Binned | Binned |
| *16-*05 | 0.014 | 0.003 | Binned | Binned |

12.2 Discusión de resultados

Para las complicaciones del lupus eritematoso sistémico, como la nefritis lúpica, se encuentran menormente estudiada las relaciones entre los genes del complejo mayor de histocompatibilidad y estas enfermedades. Algunos estudios asiáticos, han relacionado el alelo HLA-DRB1*04 con el desarrollo de SLE y de NL (Selvaraja et al., 2020). Sin embargo, para el gen HLA-DRB1, no pudimos encontrar una relación significativa entre este alelo y el desarrollo de la enfermedad. Esto muy probablemente se explica debido a que es el alelo mayormente encontrado en poblaciones de nuestra región y no parece ser exclusivo de esta enfermedad. Ya que, tanto en los pacientes con NL como en los controles sanos, este alelo



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

fue el más frecuente. Agregando, un estudio africano obtuvo que este alelo representa un alelo protector, presentando un OR de 0.47. Mientras que el alelo DRB1*15 era un alelo de riesgo (Bhalil et al., 2016). De la misma manera, un estudio realizado en pacientes de origen turco reportó la importancia de este mismo alelo, mostrándose como el único alelo de riesgo en su población (Gunawan et al., 2018). En nuestra población, este alelo se encontró con una frecuencia menor de 5, por lo que fue ubicado en la categoría que agrupó a todos los alelos denominados “raros”. Por último, es importante mencionar que el alelo DRB1*03 presentó un OR mayor de 3 y un valor de p significativo antes de la corrección de Bonferroni, por lo que podría ser un candidato para ser catalogado como alelo de riesgo. Este alelo ha sido relacionado con la producción de ranti-SSA, estos autoanticuerpos se encuentran asociadas con enfermedades como el LES (Díaz-Gallo et al., 2022).

Adicional, en los alelos del gen HLA-DQB1, se han reportado en países latinoamericanos que los alelos DQB1*03, DQB1*04, y DQB1*05 para el desarrollo de SLE y de nefritis lúpica (Cabrera-Calzadilla et al., 2018). Así mismo, un estudio realizado en India encontró resultados muy similares, en los que DQB1*03 y DQB1*05 demostraron ser alelos de riesgo ante el desarrollo de nefritis lúpica (Dedhia et al., 2018). Pocos estudios se pueden encontrar que establezcan la relación entre los alelos de HLA-DQB1 y el desarrollo de nefritis lúpica. A pesar de los resultados expuestos en la literatura de la relación entre los alelos DQB1*03, DQB1*04 y DQB1*05, nuestros resultados no mostraron diferencias significativas entre estos y el desarrollo de nefritis lúpica, en la que el alelo DQB1*03 sí fue el más frecuente entre los pacientes con nefritis lúpica, sin embargo, también fue el más frecuente entre los controles sanos, lo que diluyó el efecto y no mostró un valor significativo. Sumado a esto, un estudio realizado en Marruecos concluyó que ninguno de los alelos de DQB1 presentaban diferencias significativas entre los pacientes y los controles sanos (Bhalil et al., 2016), tal como lo encontramos en nuestra población.

Por último, encontramos los resultados de la relación entre los haplotipos y el desarrollo de nefritis lúpica. Nuestros resultados no mostraron una relación entre ninguno de los haplotipos con la enfermedad, más bien, la mayor parte de los haplotipos presentaban una frecuencia menor a 5, por lo que fueron categorizados como “raros” y comparados como un mismo grupo. El haplotipo más frecuente en nuestra población fue DRB1*04-DQB1*03, lo cual coincide con los resultados obtenidos por cada uno de los alelos por separados. Además de ello, los resultados de la prueba de significancia no arrojaron ningún resultado e importancia, ya que ninguno presentó una relación con NL. En África, se encontró que el haplotipo DRB1*15-DQB1*06 tiene relación con el desarrollo de nefritis lúpica (Bhalil et al., 2017). Pero en nuestra población, este haplotipo se presentó con una frecuencia menor a 5, por lo que no fue calculado su valor de p individual. Además de este estudio, una investigación realizada en una población jordana concluyó que el mismo haplotipo DRB1*15-DQB1*06 era significativamente más frecuente en los pacientes con NL que en los controles sanos, pero agregó que además, DRB1*03-DQB1*02 también representaba un haplotipo de riesgo (Khdairet et al., 2022).



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Por último, algunos factores que pudieron influir directamente en nuestros resultados. En especial el tamaño de la muestra, ya que el grupo de pacientes con NL fue un grupo sumamente pequeño, al ser un grupo de 25 pacientes, la heterogeneidad de los datos fue muy baja. Dado que una fracción grande de los pacientes, presentaban alelos similares, como en el caso de los alelos de DRB1, en los que solamente 3 de los alelos presentan frecuencias mayores a 5. Dado que la mayor parte de los alelos presentan una frecuencia menor a 5, fueron agrupados en una misma categoría, lo que no permitió calcular individualmente los valores de significancia de varios alelos. De haber obtenido una muestra mayor, la diversidad alélica habría ayudado a determinar la diferencia en las frecuencias entre los pacientes con nefritis lúpica y controles sanos.



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

13 Conclusiones

Dentro de la población estudiada, no se pudo encontrar algún alelo o haplotipo que tuviera una relación significativa con la nefritis lúpica. Sin embargo, para el gen DRB1, los alelos más frecuentes entre pacientes y controles sanos fueron DRB1*04, DRB1*08 y DRB1*14, aunque ninguno presentó diferencia significativa entre el grupo control y los pacientes con la enfermedad.

Por su parte, para el gen DQB1, no fue encontrado algún alelo que muestre una relación específica con la enfermedad. Y el alelo más frecuente entre los controles sanos y pacientes con NL, fue DQB1*03. Dicho esto, resultaba previsible que el haplotipo más frecuente fuera DRB1*04-DQB1*03, ya que fueron los dos alelos más frecuentes en nuestra población.

Por último, pudimos concluir que es de suma importancia el tamaño de la muestra y la heterogeneidad de los datos, más aún al utilizar el paquete de R especializado en el análisis de estudios de casos y controles y su relación con genes de HLA. Ya que, afecta la manera en la que agrupa los alelos “raros” en una misma categoría y no es posible determinar las diferencias entre ambos grupos para todos los alelos.

14 Recomendaciones

Basándonos en los resultados de nuestro estudio sobre la relación entre los alelos de los genes HLA-DRB1 y HLA-DQB1 con la nefritis lúpica en Guatemala, recomendamos enfocar futuras investigaciones en la identificación de marcadores genéticos adicionales que puedan influir en la predisposición a la enfermedad. Además, sugerimos la implementación de estrategias de tamizaje genético en poblaciones de riesgo para una detección temprana de la nefritis lúpica. Este enfoque permitirá una intervención más precisa y personalizada en pacientes con predisposición genética, mejorando así la gestión clínica y la calidad de vida de aquellos afectados por esta condición en la población guatemalteca.

Una de las razones de nuestro estudio es la importancia de continuar estudiando enfermedades autoinmunes en nuestra población, como la nefritis lúpica. La diversidad genética y los factores ambientales únicos en esta región pueden influir en la expresión de genes relacionados con estas patologías. Recomendamos ampliar la investigación para comprender mejor las bases genéticas y los desencadenantes ambientales específicos que contribuyen a la susceptibilidad de enfermedades autoinmunes en Guatemala. Además, abogamos por la sensibilización y educación pública sobre estas condiciones para mejorar el diagnóstico temprano y la gestión eficaz, así como por la implementación de programas de salud que faciliten un acceso equitativo a los recursos necesarios para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Esta atención centrada en la población local promoverá una atención médica más precisa y adaptada a las necesidades de la comunidad guatemalteca, mejorando la calidad de vida y la salud pública en general.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

15 Referencias

- Alarcón-Segovia, D., Alarcón-Riquelme, M.E., Cardiel, M.H., Caeiro, F., Massardo, L., Villa, A.R., Pons-Estel, B.A. and (2005), Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arthritis & Rheumatism*, 52, 1138-1147. <https://doi.org/10.1002/art.20999>.
- Almaani, S., Meara, A., & Rovin, B. H. (2017). Update on lupus nephritis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 12(5), 825-835. <https://doi.org/10.2215/CJN.05780616>.
- Anders, H.-J., Saxena, R., Zhao, M., Parodis, I., Salmon, J. E., & Mohan, C. (2020). Lupus nephritis. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0141-9>.
- Arnaiz-Villena, A., Juarez, I., Suarez-Trujillo, F., López-Nares, A., Vaquero, C., Palacio-Gruber, J., & Martin-Villa, J. M. (2021). HLA-G: Function, polymorphisms and pathology. *International Journal of Immunogenetics*, 48(2), 172-192. <https://doi.org/10.1111/iji.12513>.
- Barquera, R., & Granados, J. (2013). La diversidad biológica en los haplotipos del sistema HLA en las poblaciones mestizas de México. *Cuicuilco*, 20(58), 197-225.
- Benavides, A., Rodríguez, C., Toledo, D., Girón, E., Pérez, E., Pineda, M., ... & De-León, W. (2021). Prevalencia de enfermedad glomerular en el Hospital General San Juan de Dios, Guatemala. *Revista médica (Colegio de Médicos y Cirujanos de Guatemala)*, 160(3), 237-241. <https://doi.org/10.36109/rmg.v160i3.441>.
- Bhallil, O., Ibrahimi, A., Ouadghiri, S., Ouzeddoun, N., Benseffaj, N., Bayahia, R., & Essakalli, M. (2017). HLA class II with lupus nephritis in moroccan patients. *Immunological Investigations*, 46(1), 1-9. <https://doi.org/10.1080/08820139.2016.1208218>.
- Bastian, H. M., Alarcon, G. S., Roseman, J. M., McGwin Jr, G., Vila, L. M., Fessler, B. J., ... & LUMINA study group*. (2007). Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort (LUMINA) XL II: factors predictive of new or worsening proteinuria. *Rheumatology*, 46(4), 683-689. <https://doi/10.1093/rheumatology/kel347>.
- Boackle, S. A. (2013). Advances in lupus genetics. *Current Opinion in Rheumatology*, 25(5), 561-568. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e328363eb4e>.
- Cabrera-Calzadilla, S, Sosa-Tordoya, L F, Terán de Baudoim, M de 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(1), 22-30.



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

- Ceccarelli, F., Perricone, C., Borgiani, P., Ciccacci, C., Rufini, S., Cipriano, E., ... & Conti, F. (2015). Genetic factors in systemic lupus erythematosus: contribution to disease phenotype. *Journal of immunology research*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/745647>.
- Craft, J. E. (2011). Dissecting the immune cell mayhem that drives lupus pathogenesis. *Science translational medicine*, 3(73), 73ps9-73ps9. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002138>.
- Dendrou, C. A., Petersen, J., Rossjohn, J., & Fugger, L. (2018). HLA variation and disease. *Nature reviews. Immunology*, 18(5), 325–339. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.143>.
- Diaz-Gallo, L. M., Oke, V., Lundström, E., Elvin, K., Ling Wu, Y., Eketjäll, S., ... & Svenungsson, E. (2022). Four systemic lupus erythematosus subgroups, defined by autoantibodies status, differ regarding HLA-DRB1 genotype associations and immunological and clinical manifestations. *ACR open rheumatology*, 4(1), 27-39. <https://doi.org/10.1002/acr2.11343>.
- de Holanda, M. I., Klumb, E., Imada, A., Lima, L. A., Alcântara, I., Gregório, F., Christiani, L. F., Martins, C. O., Timoner, B. E., Motta, J., Pozzan, R., & Pôrto, L. C. (2018). The prevalence of HLA alleles in a lupus nephritis population. *Transplant immunology*, 47, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2018.02.001>.
- Fanouriakis, A., & Bertsias, G. (2019). Changing paradigms in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Lupus Science & Medicine*, 6(1), e000310. <https://doi.org/10.1136/lupus-2018-000310>.
- Fava, A., & Petri, M. (2019). Systemic lupus erythematosus: diagnosis and clinical management. *Journal of autoimmunity*, 96, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.11.001>.
- Feldman, C. H., Hiraki, L. T., Liu, J., Fischer, M. A., Solomon, D. H., Alarcón, G. S., ... & Costenbader, K. H. (2013). Epidemiology and sociodemographics of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis among US adults with Medicaid coverage, 2000–2004. *Arthritis & Rheumatism*, 65(3), 753-763. <https://doi.org/10.1002/art.37795>.
- Foschi, V., Bortolotti, D., Doyle, A. F., Stratigou, V., Stephens, L., Trivedi, P., Rinaldi, R., Padovan, M., Bortoluzzi, A., Lightstone, L., Cairns, T., Botto, M., Cook, H., Rizzo, R., Govoni, M., & Pickering, M. C. (2019). Analysis of HLA-G expression in renal tissue in lupus nephritis: a pilot study. *Lupus*, 28(9), 1091-1100. <https://doi.org/10.1177/0961203319860582>.
- Graham, R. R., Ortmann, W. A., Langefeld, C. D., Jawaheer, D., Selby, S. A., Rodine, P. R., ... & Behrens, T. W. (2002). Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. *The American Journal of Human Genetics*, 71(3), 543-553. <https://doi.org/10.1086/342290>.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

- Griffiths, A., Wessler, S., Carroll, S. & Doebley, J. (2012). Introduction to Genetic Analysis. W. H. Freeman and Company.
- Guerrero Castillo, L. F., Espinoza Arévalo, F. D. S., & Sobalvarro Rizo, J. J. (2015). Sistema HLA Y Medicina Transfusional [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
- Hanly, J. G., O’Keeffe, A. G., Su, L., Urowitz, M. B., Romero-Diaz, J., Gordon, C., ... & Farewell, V. (2016). The frequency and outcome of lupus nephritis: results from an international inception cohort study. *Rheumatology*, 55(2), 252-262. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kev311>.
- Hanly, J.G., Su, L., Urowitz, M.B., Romero-Diaz, J., Gordon, C., Bae, S.-C., Bernatsky, S., Clarke, A.E., Wallace, D.J., Merrill, J.T., Isenberg, D.A., Rahman, A., Ginzler, E.M., Petri, M., Bruce, I.N., Dooley, M.A., Fortin, P., Gladman, D.D., Sanchez-Guerrero, J., Steinsson, K., Ramsey-Goldman, R., Khamashta, M.A., Aranow, C., Alarcón, G.S., Fessler, B.J., Manzi, S., Nived, O., Sturfelt, G.K., Zoma, A.A., van Vollenhoven, R.F., Ramos-Casals, M., Ruiz-Irastorza, G., Lim, S.S., Kalunian, K.C., Inanc, M., Kamen, D.L., Peschken, C.A., Jacobsen, S., Askanase, A., Theriault, C., Thompson, K. and Farewell, V. (2015), Mood Disorders in Systemic Lupus Erythematosus: Results From an International Inception Cohort Study. *Arthritis & Rheumatology*, 67, 1837-1847. <https://doi.org/10.1002/art.39111>.
- Imgenberg-Kreuz, J., Carlsson Almlöf, J., Leonard, D., Alexsson, A., Nordmark, G., Eloranta, M. L., Rantapää-Dahlqvist, S., Bengtsson, A. A., Jönsen, A., Padyukov, L., Gunnarsson, I., Svenungsson, E., Sjöwall, C., Rönnblom, L., Syvänen, A. C., & Sandling, J. K. (2018). DNA methylation mapping identifies gene regulatory effects in patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of rheumatic diseases*, 77(5), 736–743. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-212379>.
- Khdair, S. I., Al-Bdour, R., Jarrar, W., Hammad, A., Al-Jayeh, A., Masa’deh, M., ... & Farah, R. (2022). Immunogenetic Profiling of SLE and LN among Jordanian Patients. *Journal of Personalized Medicine*, 12(12), 1955. <https://doi.org/10.3390/jpm12121955>.
- Klein, J., & Sato, A. (2000). The HLA system. First of two parts. *The New England Journal of Medicine*, 343(10), 702–709. <https://doi.org/10.1056/NEJM200009073431006>.
- Kuhn, A., Bonsmann, G., Anders, H. J., Herzer, P., Tenbrock, K., & Schneider, M. (2015). The diagnosis and treatment of systemic lupus erythematosus. *Deutsches Ärzteblatt International*, 112(25), 423. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2015.0423>.
- Kuo, C. F., Grainge, M. J., Valdes, A. M., See, L. C., Luo, S. F., Yu, K. H., Zhang, W., & Doherty, M. (2015). Familial Aggregation of Systemic Lupus Erythematosus and Coaggregation of Autoimmune Diseases in Affected Families. *JAMA internal medicine*, 175(9), 1518–1526. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.3528>.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

- Lech, M., & Anders, H. J. (2013). The pathogenesis of lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(9), 1357-1366. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013010026>.
- Madden, K., & Chabot-Richards, D. (2019). HLA testing in the molecular diagnostic laboratory. *Virchows Archive: an International Journal of Pathology*, 474(2), 139-147. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2501-3>.
- Marchini, M., Antonioli, R., Lleò, A., Barili, M., Caronni, M., Origgi, L., Vanoli, M., & Scorza, R. (2003). HLA class II antigens associated with lupus nephritis in Italian SLE patients. *Human immunology*, 64(4), 462-468. [https://doi.org/10.1016/s0198-8859\(03\)00017-x](https://doi.org/10.1016/s0198-8859(03)00017-x).
- Marsh, S. G., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Bontrop, R. E., Dupont, B., Erlich, H. A., Fernández-Viña, M., Geraghty, D. E., Holdsworth, R., Hurley, C. K., Lau, M., Lee, K. W., Mach, B., Maiers, M., Mayr, W. R., Müller, C. R., Parham, P., Petersdorf, E. W., Sasazuki, T., Strominger, J. L., ... Trowsdale, J. (2010). Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue antigens*, 75(4), 291-455. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2010.01466.x>.
- May, R. M. (2004). Uses and abuses of mathematics in biology. *Science*, 303(5659), 790-793. <https://doi.org/10.1126/science.1094442>.
- Mejia-Vilet, J. M., & Rovin, B. H. (2019). Epidemiology and management of lupus nephritis. In Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes (pp. 727-744). Elsevier.
- Mosaad Y. M. (2015). Clinical role of human leukocyte antigen in health and disease. *Scandinavian Journal of Immunology*, 82(4), 283-306. <https://doi.org/10.1111/sji.12329>.
- Nepom, G. T. (2010). The major histocompatibility complex. En a. S. Fauci, d. L. Kasper, d. L. Longo, e. Braunwald, s. L. Hauser, j. L. Jameson, & j. Loscalzo, 104 Harrison's Rheumatology (págs. 44-56). Bethesda: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Niu, Z., Zhang, P., & Tong, Y. (2014). Value of HLA-DR genotype in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 18(1), 17-28. <https://doi.org/10.1111/1756-185x.12528>.
- Obrîșcă, B., Sorohan, B., Tuță, L., & Ismail, G. (2021). Advances in Lupus Nephritis Pathogenesis: From Bench to Bedside. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3766. <https://doi.org/10.3390/ijms22073766>.
- Ortega, L., Schultz, D., Lenz, O., Pardo, V., & Contreras, G. (2010). Review: Lupus nephritis: pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions. *Lupus*, 19(5), 557-574. <https://doi.org/10.1177/0961203309358187>.
- Parikh, S. V., Almaani, S., Brodsky, S., & Rovin, B. H. (2020). Update on lupus nephritis: Core Curriculum 2020. *American Journal of Kidney Diseases*, 76(2), 265-281. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2019.10.017>.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

- Pons-Estel, G. J., Serrano, R., Plasín, M. A., Espinosa, G., & Cervera, R. (2011). Epidemiology and management of refractory lupus nephritis. *Autoimmunity reviews*, 10(11), 655-663. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.04.032>.
- Ramos, P. S., Brown, E. E., Kimberly, R. P., & Langefeld, C. D. (2010, March). Genetic factors predisposing to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. In *Seminars in nephrology* (Vol. 30, No. 2, pp. 164-176). WB Saunders.
- Selvaraja, M., Chin, V. K., Abdullah, M., Arip, M., & Amin-Nordin, S. (2021). HLA-DRB1*04 as a Risk Allele to Systemic Lupus Erythematosus and Lupus Nephritis in the Malay Population of Malaysia. *Frontiers in medicine*, 7, 598665. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.598665>.
- Shimane, K., Kochi, Y., Suzuki, A., Okada, Y., Ishii, T., Horita, T., ... & Yamamoto, K. (2013). An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of* 09: 01 allele on disease phenotypes. *Rheumatology*, 52(7), 1172-1182. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes427>.
- Slatkin, M. (2008). Linkage disequilibrium—understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews Genetics*, 9(6), 477-485. <https://doi.org/10.1038/nrg2361>.
- Solomon, E., Berg, L. & Martin, D. (2013). *Biología*. Cengage Learning.
- Song, K., Liu, L., Zhang, X., & Chen, X. (2020). An update on genetic susceptibility in lupus nephritis. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 210, 108272. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.108272>.
- Wall, J. D., & Pritchard, J. K. (2003). Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nature Reviews Genetics*, 4(8), 587–597. <https://doi.org/10.1038/nrg1123>.
- Waples, R. S. (2015). Testing for Hardy–Weinberg proportions: have we lost the plot?. *Journal of heredity*, 106(1), 1-19. <https://doi.org/10.1093/jhered/esu062>.
- Weening, J. J., D'agati, V. D., Schwartz, M. M., Seshan, S. V., Alpers, C. E., Appel, G. B., ... & Nagata, M. (2004). The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney international*, 65(2), 521-530. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00443.x>.
- Xu, R., Li, Q., Liu, R., Shen, J., Li, M., Zhao, M., Wang, M., Liao, Q., Mao, H., Li, Z., Zhou, N., Yin, P., Li, Y., Tang, X., Wu, T., Zhong, Z., Wang, Y., Ai, Z., Wang, O., Chen, N., ... Yu, X. (2017). Association Analysis of the MHC in Lupus Nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 28(11), 3383–3394. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016121331>.



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

- Yang, R., Hu, Y., & Bo, L. (2020). Genome Variation and Precision Medicine in Systemic Lupus Erythematosus. *Precision Medicine*, 2204, 193-203. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0904-0_17.
- Yunis, E. J., Zúñiga, J., Larsen, C. E., Fernández-Viña, M., Granados, J. Awdeh, Z. L. & Alper, C. A. (2005). Single nucleotide polymorphism blocks and haplotypes: human MHC block diversity. In R. A Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine* (pp. 191-215). Wiley -VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Zhao, H., Nettleton, D., & Dekkers, J. C. (2007). Evaluation of linkage disequilibrium measures between multi-allelic markers as predictors of linkage disequilibrium between single nucleotide polymorphisms. *Genetical Research*, 89(1), 1–6. <https://doi.org/10.1017/S0016672307008634>.

16 Apéndice

Apéndice 1. Consentimiento informado de investigación y hoja de toma de datos.

Consentimiento Informado de Investigación

Caracterización alélica de los genes HLA-DQB1 y HLA-DRB1 en pacientes con diagnóstico de nefritis lúpica.

El presente Consentimiento Informado de Investigación se dirige a pacientes que acudan a la unidad de reumatología y nefrología del Hospital General San de Dios. El Consentimiento Informado de Investigación consta de cuatro partes. La primera parte menciona toda la información, términos y condiciones de la investigación. La segunda parte consiste en un formulario de consentimiento informado de investigación en el cual la paciente declara estar enterada de la información, términos y condiciones de la investigación y proporciona su consentimiento de participación en la investigación. La tercera parte consiste en la revocación del consentimiento informado de investigación. La cuarta parte consiste en un formulario de autorización para el uso de los resultados del estudio en futuras investigaciones.

PARTE I INFORMACIÓN

El presente proyecto consiste en investigar los alelos de los loci HLA-DQB1 y HLA-DRB1 en pacientes con diagnóstico de nefritis lúpica en el Hospital General San Juan de Dios. Es decir, esta investigación permitirá conocer cuáles características genéticas presentan los pacientes con diagnóstico de NL.

Con la lectura del consentimiento informado de investigación se le dará la información y se le invita a participar en la investigación. La participación en el presente estudio es voluntaria y puede dejar de

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

participar en cualquier momento. Puede hablar con alguien con quien usted se sienta cómodo antes de decidir su participación en el estudio. Si en el transcurso de la lectura del consentimiento informado de investigación usted tiene dudas o hay aspectos que no quedan claros, por favor hágalo saber para que se explique nuevamente.

La nefritis lúpica (NL) representa una complicación del lupus eritematoso sistémico (LES). Esta se desarrolla cuando el sistema inmune ataca erróneamente a los riñones, provocando su inflamación. La inflamación puede provocar un daño a la capacidad del sistema renal, impidiendo la eliminación adecuada de los desechos de la sangre, afectando a la contención correcta de líquidos corporales y provocando una desregulación de los niveles hormonales para controlar la presión arterial y el volumen sanguíneo.

Si usted acepta participar en este estudio, le solicitaremos que responda a unas preguntas sobre sus datos, también a que un médico o químico biólogo tome una muestra sanguínea de aproximadamente 5 mililitros. La muestra será tomada en el Hospital General San Juan de Dios. Las complicaciones que pueden presentarse durante la extracción de sangre pueden ser: hematoma en el sitio de extracción, pérdida del conocimiento y mareos. De alguna complicación grave al momento de la extracción de la muestra sanguínea, como la punción accidental de arteria, infección en la zona de punción, lesiones nerviosas, entre otras, el estudio correrá con todos los gastos necesarios para su recuperación. La muestra será procesada para su genotipificación. Finalmente, se identificarán los alelos de HLA-DRB1 y HLA-DQB1. Todos los resultados e información generada en el estudio son codificados, confidenciales y serán almacenados en una base de datos de investigación. Los resultados individuales no serán divulgados a ninguna institución en ninguna circunstancia. La muestra, resultados y demás datos generados por el proyecto serán manejados, analizados y resguardados únicamente por el equipo de investigadores y solamente ellos tendrán acceso a ellos. Los resultados de esta investigación ayudarán a conocer las características genéticas de la población guatemalteca. Usted no recibirá pago ni deberá pagar por los exámenes que se le realizan dentro de esta investigación. Las normas éticas en investigación actuales exigen que usted conozca toda la información, términos y condiciones de la investigación. Si usted está de acuerdo, y sus dudas han sido aclaradas, le solicitamos que firme el formulario del consentimiento informado. Los resultados obtenidos se le serán compartidos por medio de correo electrónico o número telefónico.

PARTE II

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO DE INVESTIGACIÓN

Declaro que he sido informado/a de los términos y condiciones del estudio. Declaro estar de acuerdo con la toma de muestra y con la recogida de datos clínicos y demográficos. Declaro tener conocimiento de que mis datos y resultados serán registrados en una base de datos confidencial. Declaro haber comprendido la información recibida, que las preguntas que realicé fueron aclaradas y que entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que afecte de ninguna manera mi cuidado médico. Ante cualquier duda o comentario, comunicarse a barriosmenendezjuancarlos@gmail.com o camilocc888@gmail.com.

Fecha de ingreso al estudio _____

Nombre de la participante _____



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Número de teléfono _____ Correo electrónico _____

Firma _____ de _____ la
participante _____ - _____

Declaración de testigo (familiar, persona allegada o representante legal) que ha recibido la información por deseo o incompetencia de la participante.

Nombre del testigo _____

Firma del testigo _____

Huella dactilar de la participante

Declaración del médico o investigador que ha informado debidamente a la participante y que se ha proporcionado una copia del Consentimiento Informado de Investigación a la participante.

Nombre del médico o investigador _____

Firma _____ del
Investigador _____ - _____

Posee biopsia y diagnóstico patológicos: _____ Sí _____ No

PARTE III REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO DE INVESTIGACIÓN

Fecha de revocación de consentimiento _____

Nombre de la participante _____

Firma _____ de _____ la
participante _____ - _____

Declaración de testigo (familiar, persona allegada o representante legal) que ha recibido la información por deseo o incompetencia de la participante.

Nombre del testigo _____

Firma del testigo _____

Huella dactilar de la participante

PARTE IV AUTORIZACIÓN PARA USO DE RESULTADOS EN FUTUROS ESTUDIOS



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Fecha de revocación de consentimiento _____

Nombre de la participante _____

Firma _____ de _____ la
participante _____ - _____

Declaración de testigo (familiar, persona allegada o representante legal) que ha recibido la información por deseo o incompetencia de la participante.

Nombre del testigo _____

Firma del testigo _____

Huella dactilar de la participante



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

Apéndice 2. Hoja de toma de datos de la entrevista

Hoja de Toma de Datos de la Entrevista Caracterización alélica de los genes HLA-DQB1 y HLA-DRB1 en pacientes con diagnóstico de nefritis lúpica.

| | |
|------------------------------------|--|
| Código de Estudio | |
| Fecha de Ingreso a Estudio | |
| Nombre Participante | |
| Edad | |
| Etnia | |
| Departamento de Procedencia | |
| Municipio de Procedencia | |
| Número de Teléfono | |
| Correo Electrónico | |



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

17 Vinculación

El proyecto de investigación permitirá establecer un vínculo directo entre el Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Hospital General San Juan de Dios y la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

18 Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual


Los resultados y hallazgos que se obtendrán a partir del desarrollo del presente proyecto de investigación serán presentados en forma de un informe final a la Dirección General de Investigación (DIGI). Posteriormente, se trabajará en un manuscrito para su publicación en una revista indexada (nacional o internacional), de preferencia una revista especializada en inmunología. Además, los resultados y hallazgos serán presentados por medio de conferencias o presentación de pósters en congresos, simposios, seminarios, entre otras actividades académicas y científicas, para su divulgación.

19 Aporte de la propuesta de investigación a los Prioridades Nacionales de Desarrollo (PND) identificando su meta correspondiente:

La presente propuesta de investigación aporta en los objetivos de desarrollo sostenible en la sección de salud y bienestar, especialmente aportando al conjunto de enfermedades huérfanas-autoinmunes. El desarrollo del proyecto de investigación permitirá conocer los alelos de los genes HLA-DQB1 y HLA-DRB1 en la población guatemalteca con NL. Así mismo, se podrán conocer sus frecuencias alélicas y los haplotipos. El conocimiento generado por medio del desarrollo de esta investigación será reportado por primera vez en Guatemala, representando hallazgos científicos novedosos y aportando al estudio de las enfermedades huérfanas-autoinmunes en el país.

Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

20 Orden de pago final (incluir únicamente al personal con contrato vigente al 31 de diciembre de 2023)

| Nombres y apellidos | Categoría (investigador /auxiliar) | Registro de personal | Procede pago de mes (Sí / No) | Firma |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------|-------------------------------|---|
| Juan Carlos Barrios Menéndez | Investigador I | 20200482 | Sí |  |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

21 Declaración del Coordinador(a) del proyecto de investigación

El Coordinador de proyecto de investigación con base en el *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación*, artículos 13 y 20, deja constancia que el personal contratado para el proyecto de investigación que coordina ha cumplido a satisfacción con la entrega de informes individuales por lo que es procedente hacer efectivo el pago correspondiente.



| | |
|--|--|
| Dra. Lilian Isabel Cayax Menchú |  Firma |
| Fecha: 29/02/2024 | |

21 Aval del Director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario


De conformidad con el artículo 13 y 19 del *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación* otorgo el aval al presente informe mensual de las actividades realizadas en el proyecto (escriba el nombre del proyecto de investigación) en mi calidad de (indique: Director del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario), mismo que ha sido revisado y cumple su ejecución de acuerdo a lo planificado.



Informe final de proyecto de investigación. Año 2023

| | |
|---|--|
| <p>Vo.Bo. Dr. César García Director de Investigación Facultad de CCMM. USAC.</p> |   <p>Firma</p> |
| <p>Fecha: 29/02/2024</p> | |

22 Visado de la Dirección General de Investigación

| | |
|---|--|
| <p>Vo.Bo. Hilda Elena Valencia de Abril. PhD. Coordinador del Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud PUIIS.</p> |  <p>Firma</p> |
| <p>Fecha: 29/02/2024</p> | |

| | |
|---|---|
| <p>Vo.Bo. Ing. MARN. Julio Rufino Salazar Coordinador General de Programas Universitarios de Investigación</p> |  <p>Firma</p> |
| <p>Fecha: 29/02/2024</p> | |

/Digi2023