

DETERMINACION POR PCR DE LA ASOCIACION ENTRE ANTIGENOS HLA CLASE II Y PENFIGO VULGAR

ROBERTO R. GLORIO¹, GRACIELA RODRIGUEZ COSTA¹, ROXANA HAAS², JULIAN LARRIBA³,
LEONARDO FAINBOIM³, ALBERTO WOSCOFF¹

¹ División Dermatología, ² División Alergia e Inmunología, ³ División Inmunogenética,
Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Resumen El pénfigo vulgar (PV) es una enfermedad cutaneomucosa que se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra la desmogleína 3, causando acantolisis y formación de ampollas. En el presente estudio se analiza la asociación de los antígenos HLA DR y HLA DQ en 30 pacientes caucásicos argentinos que padecen esta enfermedad comparada con una población control (N = 199) del mismo grupo étnico. La técnica utilizada fue PCR SSO. Los resultados muestran una asociación con HLA DR 4 (RR = 3.80, P = 0.001) y HLA DR 14 (RR = 5.97, P = 0.0001). En el caso de los subtipos moleculares DRβ1* y DQβ1*, los que están positivamente asociados con PV pertenecen a 2 alelos diferentes, tal como en otras poblaciones. El primero es DRβ1* 0402 (RR = 44.70, P = 10.7) y DQβ1* 0302 (RR = 71.82, P = 10.7) y el segundo es DRβ1* 1401 (RR = 117.94, P = 10.7) y DQβ1* 0503 (RR = 86.95, P = 10.7).

Abstract *PCR determination of an association between Class II HLA and pemphigus vulgaris* Pemphigus vulgaris (PV) is an autoimmune blistering disease affecting the skin and mucous membranes. It is characterized by the presence of an autoantibody directed against desmoglein 3, which causes acantholysis and blister formation. In this study, we examined the HLA antigens of 30 caucasian argentinian patients compared with 199 controls. We used the PCR-SSO method (*Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Oligonucleotide*). We found that PV patients had significantly increased frequencies of HLA DR4 (RR = 3.80, P = 0.001) and HLA DR 14 (RR = 5.97, P = 0.0001). As in other populations, two associated alleles were found: the first was DRβ1*0402 (RR = 44.70, P = 10.7) and DQβ1* 0302 (RR = 71.82, P = 10⁻⁷) and the second was DRβ1* 1401 (RR = 117.94, P = 10⁻⁷) y DQβ1* 0503 (RR = 86.95, P = 10⁻⁷).

Key words: *Pemphigus vulgaris*, HLA DR4

Los pénfigos representan un grupo de enfermedades crónicas recidivantes, de fisiopatogenia autoinmune, que tienen en común la característica de presentar ampollas intraepidérmicas, cuyo mecanismo de formación es la acantolisis producida por autoanticuerpos dirigidos contra un epítipo localizado en los desmosomas de los epitelios planos estratificados.

Se caracterizan por su respuesta al tratamiento esteroideo, pronóstico reservado y mortalidad elevada. El pénfigo vulgar (PV) es la forma clínica más frecuente y se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra la desmogleína 3, que es una glicoproteína de transmembrana de la familia de las cadherinas presente en los desmosomas^{1, 2, 3}.

La incidencia de este cuadro varía de 0.1 a 0.5 casos por 100 000 habitantes, siendo mayor en judíos⁴. Se ha

descrito una susceptibilidad genética (o disposición) a padecer pénfigo ligada al sistema de antígenos de histocompatibilidad (HLA) destacándose 2 haplotipos: DRβ1* 0402 (DR4) DQβ1* 0302 (DQ8) y DRβ1* 1401 (DR14) DQβ1* 0503 (DQ5)^{5, 9, 16-20}.

Las relaciones entre HLA y patología no son estrictamente causales, es decir que lo conferido por los antígenos HLA no es la enfermedad misma, sino la tendencia o predisposición a padecerla.

Podríamos definir como disposición a contraer determinada enfermedad a la sumatoria de susceptibilidad y resistencia que rigen la probabilidad de que un sujeto contraiga realmente la enfermedad en cuestión¹⁰. El presente trabajo fue realizado considerando los recientes avances en las técnicas inmunogenéticas, que permiten profundizar el estudio de estos antígenos y la descripción de nuevas variantes alélicas de los mismos. En base a que existe una susceptibilidad genética a padecer pénfigo ligada al sistema de antígenos de histocompatibilidad (HLA) y a que no hay ningún trabajo de este tipo en nuestra población, decidimos realizar un estudio colaborativo entre la División Dermatología y la División

Inmunogenética del Hospital de Clínicas José de San Martín, con el objetivo de:

a. Determinar la frecuencia de los antígenos HLA de clase II en pacientes con PV y el Riesgo Relativo (RR) que confieren para padecer dicha enfermedad.

b. Describir las variantes alélicas de los antígenos de clase II DR y DQ en los pacientes con PV y determinar el RR que aportan para la enfermedad.

c. Relacionar estos datos con las manifestaciones cutaneomucosofanerales.

d. Comparar nuestros hallazgos con lo informado en la bibliografía.

Material y métodos

Se efectuó un estudio observacional, prospectivo, transversal y controlado, entre los meses de marzo de 1995 y julio de 1997, en el cual se incluyeron 30 pacientes con diagnóstico de PV que concurren a la División Dermatología del Hospital de Clínicas José de San Martín y 199 pacientes control.

Población: Se realizó un tipo de muestreo consecutivo a partir de la consulta espontánea, dentro de una población de 60 pacientes anuales, incluyendo sólo los casos con diagnóstico histopatológico confirmado. Los pacientes y los controles corresponden al mismo grupo étnico, caucásicos argentinos, pertenecientes a una población homogénea cuyos ancestros son españoles, italianos o argentinos.

Como criterios de inclusión se tuvieron en cuenta los casos de PV con diagnóstico basado en la clínica de las lesiones de piel y mucosas confirmado con histopatología e inmunofluorescencia.

Se consideraron criterios de exclusión: Penfigoide ampollar, penfigoide cicatrizal, epidermolisis ampollar adquirida, dermatitis herpetiforme, herpes gestationis, eritema polimorfo, impétigo ampollar, dermatosis por Ig A lineal, dermatosis acantolítica transitoria, dermatosis pustular subcórnea, enfermedad de Darier o queratosis folicular.

La evaluación dermatológica fue realizada a partir de un protocolo previamente elaborado donde se consignaron las manifestaciones mucosocutaneofanerales en base al porcentaje de superficie corporal afectada (SCA) con la "regla de los nueve" descripta por Pulasky y Tenisson que asigna valores de 9 o múltiplos de 9 a los diferentes segmentos del cuerpo, por ejemplo, cabeza y cuello 9%, cada miembro superior 9%, parte anterior de tronco 18%, parte posterior de tronco 18%, cada miembro inferior 18% y región genital y periné 1%.

Tipificación HLA: Los alelos HLA-DR β 1* y DQ β 1* fueron determinados por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de hibridización por oligonucleótidos específicos de secuencia (PCR-SSO) (EXON 2). Los *primers* utilizados se muestran a continuación:

Amplificación genérica HLA-DR β 1*:

Nombre: 2DR AMP A Secuencia:

CCCCACAGCACGTTTC

(c/t) Tg (#)

Nombre: 2DRB AMP B Secuencia:

CCGCTGCACTGTGAAGCTCTA (*)

Amplificación específica DR β 1* DR4:

Nombre: 2DRB AMP 4 Secuencia:

GTTTCTTGGAGCAGGTTAAAC

Nombre: 2DRB AMP B Secuencia:

CCGCTGCACTGTGAAGCTCTA (*)

Amplificación específica DR β 1* DR14:

Nombre: 2DRB AMP 3 Secuencia:

CACGTTTCTTGGAGTACTCTAC

Nombre: 2DRB AMP B Secuencia:

CCGCTGCACTGTGAAGCTCTA (*)

Amplificación específica DQ β 1*:

Nombre: 2DQB AMP A Secuencia:

CATGTGGTACTTCCCAACGG

Nombre: 2DRB AMP B Secuencia:

CCGCTGCACTGTGAAGCTCTA (*)

(*) Complementario. (#) mezcla de *primers* degenerados.

A partir de sangre periférica de los pacientes (variable en estudio) se realiza una extracción de ADN con el método de *Salting out*. Con 2 μ l de ADN de cada paciente y *primers* específicos para los *loci* HLA DR β 1* y DQ β 1* se realizó la amplificación por PCR de dichos *loci*.

El producto de la amplificación se siembra en una membrana de nylon y se hibridiza con oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO) marcados con ATP (γ P³²). Para determinar los alelos del locus HLA-DR β 1* se utilizaron aproximadamente 120 SSOs y para los del locus HLA-DQ β 1*, 36 SSOs. Las membranas hibridizadas se exponen a película autorradiográfica y luego se analizan los resultados¹¹.

Análisis Estadístico: Las frecuencias independientes de los haplotipos y de los alelos fueron determinadas por recuento directo. La significación estadística de las diferencias en las frecuencias individuales de los alelos y haplotipos en los pacientes con PV y en la población control, fueron estimados por el método del chi cuadrado (χ^2). La fuerza de la asociación fue estimada calculando el RR, contando con el asesoramiento de la Sección de Asesoría Científica del Hospital de Clínicas José de San Martín.

RR = número de pacientes con antígeno x número de controles sin antígeno/número de pacientes sin antígeno x número de controles con antígeno

También se determinó la fracción etiológica

$$(FE) = \left(\frac{RR - 1}{RR} \right) \left(\frac{a}{a + b} \right)$$

se aplica cuando el RR es > 1 y expresa la proporción en que influye la tenencia del antígeno entre los otros factores para que la enfermedad se produzca; y además la fracción preventiva

$$(FP) = \frac{(1 - RR)(a / a + b)}{RR (1 - (a / a + b) + (a / a + b))}$$

que se aplica cuando el RR es < 1, expresando la participación del antígeno en la resistencia de la enfermedad.

Recordemos que *a* es el número de los pacientes con el antígeno y que *b* es el número de los pacientes sin el antígeno, por lo tanto *a* + *b* es el número total de pacientes.

Resultados

Se evaluaron 30 pacientes con diagnóstico confirmado de PV. En cuanto a la edad, la media aritmética (\bar{X}) fue de 56.3 con un desvío estándar (DS) de 4.4 y un intervalo de confianza (IC) calculado con un $\alpha = 0.05\%$ (IC 95%) de 54.3 – 58.5. La distribución por sexos mostró predominio de mujeres (19 pacientes) (63.3%) en relación a los hombres (11 pacientes) (36.7%).

Se analizaron los antígenos de clase II y se presentan los resultados más destacados en la Tabla 1.

En 16 pacientes con DR 4: 7 pacientes con < 10% de SCA (23.3%); 7 pacientes con compromiso de 10-30% de SCA (23.3%) y 2 pacientes con > 30% de SCA (6.7%).

TABLA 1.- Resultados de la determinación por PCR de la asociación entre antígenos HLA clase II-DR en 30 pacientes de pénfigo vulgar (PV) y en 199 controles.

	Pénfigo Vulgar N = 30		Controles N = 199		P	RR (I C 95%)	\bar{X}	FE/FP
	Nº	%	Nº	%				
DR4	16	53.33	46	23.11	0.0011464	3.80 (1.59-9.06)	10.57	0.39
DR 14	12	40.00	20	10.05	0.0001153	5.97 (2.25-15.2)	17.04	0.33
DR 8	9	30.00	29	14.57	0.0342347	2.51 (0.92-6.41)	3.44	0.18
DR 15	1	3.33	39	19.59	0.0287278	0.14 (0.00-0.91)	3.72	0.028
DR 3	2	6.66	42	21.10	0.0613141	0.27 (0.03-1.14)	2.63	0.048

RR: Riesgo relativo. IC: Intervalo de confianza. X-: media
FE: Fracción etiológica
FP: Fracción preventiva

TABLA 2.- Variantes alélicas DRβ1* y DQβ1* en 30 pacientes con pénfigo vulgar (PV) y en 199 controles

	Pénfigo Vulgar N = 30		Controles N = 199		P	RR (I C 95%)	\bar{X}	FE/FP
	Nº	%	Nº	%				
DRβ1* 0402	13	43.33	6	3.01	10.7	44.70 (13.96-143.14)	103.01	0.42
DQβ1* 0302	15	50.00	18	9.04	10.7	71.82 (9.82-524.98)	65.73	0.49
DRβ1* 1401	11	36.66	7	3.51	10.7	117.94 (16.13-862.27)	101.69	0.36
DQβ1* 0503	11	36.66	10	5.02	10.7	86.95 (11.81-640.05)	74.83	0.52

RR: Riesgo relativo. IC: Intervalo de confianza. X-: media
FE: Fracción etiológica
FP: Fracción preventiva

Se halló afectación cutaneomucosa en 11 pacientes, sólo cutánea en 2 pacientes y sólo mucosa en 3 pacientes, con episodios recurrentes en 13 pacientes y episodio único en 3 pacientes.

En 12 pacientes con DR 14: 7 pacientes con < 10% de SCA (23.3%); 3 pacientes con compromiso de 10-30% de SCA (10.0%) y 2 pac. con > 30% de SCA (6.7%). Hubo afectación cutaneomucosa en 7 pacientes, sólo mucosa en 3 y sólo cutánea en otros 2; con episodios recurrentes en 8 pacientes y episodio único en otros 4. Además se presentan los datos acerca de las variantes alélicas DRβ1* y DQβ1* de los 30 pacientes con PV en relación a los controles, en la Tabla 2.

En cuanto a la superficie corporal afectada (SCA) en cada uno de estos grupos, se observó:

En 13 pacientes con DRβ1*0402: 7 pacientes con < 10% de SCA (53.8%); 4 con compromiso de 10-30% de SCA (30.8%) y 2 con > 30% de SCA (15.4%). Por otra parte, en 9 pacientes se halló afectación cutaneo-mucosa y en 10 recurrencia. En 11 pacientes con DRβ1* 1401: 7 con < 10% de SCA (63.6%); 3 con compromiso de 10-30% de SCA (27.3%) y uno con > 30% de SCA (9.1%). Hubo afectación cutaneomucosa y recurrencia en 8 pacientes. En 16 pacientes con DQβ1* 0302: 6 con < 10% de SCA (37.5%), 8

con compromiso de 10-30% de SCA (50%) y 2 con > 30% de SCA (12.5%). Se observó recurrencia en 12 pacientes y afectación cutaneomucosa en 9.

En 11 pacientes con DQβ1* 0503: 7 con (37.5%); 8 con compromiso de 10-30% de SCA (50%) y 2 con > 30% de SCA, 10% de SCA (63.6%); 3 con compromiso de 10-30% de SCA (27.3%) y uno con > 30% de SCA (9.1%); con recurrencia en 7 pacientes y afectación cutaneomucosa en 6 pacientes.

Discusión

El inicio y desarrollo del PV puede resultar de la interacción entre factores externos (drogas, virus, etc.) y factores genéticos (genes desconocidos y especialmente alelos del CMH). Como hoy sabemos, los alelos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), juegan un papel importante en la susceptibilidad para padecer la enfermedad, por ello es trascendente conocer cuáles son los alelos asociados con mayor frecuencia. En el presente estudio se demuestra una asociación significativa entre el PV y el CMH, en particular con antígenos de clase II.

La mayoría de los pacientes provenían del norte del país, y se destacó la baja proporción de judíos askenazi, lo que representa un hecho interesante ya que en otras casuísticas, ésta ha sido la población predominante. Hubo predominio de mujeres y el promedio de edad fue de 56 años, coincidente con otras publicaciones. Se aprecia una asociación positiva con los antígenos DR 4 y DR 14 (los que actuaron como factor de riesgo) en pacientes con PV y una asociación negativa para los antígenos DR 15 y DR 3.

El DR 4 y DR 14 tuvieron una Fracción Etiológica (FE) de 0.39 y 0.33 respectivamente, lo que significa que el 39% o 33% del peso causal depende de la presencia del antígeno.

El antígeno DR 8 fue hallado con mayor frecuencia en los pacientes con PV que en los controles aunque esta asociación no fue significativa.

En los pacientes con DR 4, hubo una cantidad similar de pacientes con < 10% y entre 10-30% de la SCA con episodios recurrentes en la mayoría de los casos.

En los pacientes DR 14, el compromiso < 10% de la SCA fue el predominante, con episodios recurrentes en un gran porcentaje de casos.

En el caso de los subtipos moleculares DR β 1* y DQ β 1*, los más positivamente asociados con PV, forman parte de 2 haplotipos diferentes: el primero es (DR β 1* 0402) (DQ β 1* 0302) y el segundo es (DR β 1* 1401) (DQ β 1* 0503).

Es decir que en los haplotipos DR 4, el subtipo molecular DR β 1* 0402 es el que confiere mayor susceptibilidad, resultando la asociación con DQ β 1* 0302 secundaria a desequilibrio de ligamiento. Si se remueven los individuos con DR β 1* 0402, la asociación con DQ β 1* 0302 desaparece.

Algo similar ocurre con el DR 14, siendo el alelo DR β 1* 1401 el que confiere mayor susceptibilidad, resultando el DQ β 1* 0503 en desequilibrio de ligamiento.

La importancia de identificar los alelos que confieren susceptibilidad radica en su papel trascendente en la respuesta inmune con el fin de diseñar estrategias inmunoterapéuticas en el futuro.

Se debe destacar que el alelo DR β 1* 1401 fue más frecuente en los pacientes que tenían un compromiso menor del 10% de la superficie corporal afectada, mientras que la presencia del alelo DR β 1* 0402 fue predominante en los pacientes que tenían un compromiso entre el 10 y el 30% de la superficie corporal, lo que podría ser de valor en la evaluación de estos pacientes aunque se requieren otros estudios para comprobarlo.

El genotipo DR β 1* 0402-DR β 1* 1401 fue hallado en pacientes con PV más frecuentemente que lo esperado (5 pacientes) lo que sugiere un sinergismo entre ambos haplotipos para conferir susceptibilidad. Desde hace tiem-

po, se conoce una susceptibilidad genética asociada con HLA A26 B38 y DR4 y una mayor incidencia de la enfermedad en judíos askenazi en un trabajo realizado sobre 65 pacientes¹².

Luego se encontró una asociación del DR4 con la variante alélica DQ β 1* 0302 (DQ8) en 26 pacientes judíos askenazi¹³, y de DR4, DQ8 junto a DR6 DQ5 en 25 pacientes caucasoides no judíos^{14, 15}.

Por otra parte, entre los japoneses, sobre 32 pacientes, se destacaron 2 haplotipos predisponentes, DR14 DQ5 y DR6 DQ5 y uno que confería resistencia a PV que es DR7 DQ6^{16, 17}.

También se presentó en la India un trabajo sobre 37 pacientes siendo la asociación significativa con PV de DR β 1* 1401 (DR14) DQ β 1* 0503 (DQ5) y en italianos, sobre 32 pacientes, 2 haplotipos DR β 1* 0402 (DR4) DQ β 1* 0302 (DQ8) y DR β 1* 1401 (DR14) DQ β 1* 0503 (DQ5), esto último es coincidente con la población argentina^{18, 19, 20}.

El análisis de los haplotipos predisponentes muestra que la frecuencia de los componentes alélicos y la fuerza de su asociación con PV se incrementa progresivamente hacia la dirección telomérica, con un valor pico para los alelos DR y DQ.

Esto es concordante con la hipótesis de que los factores genéticos responsables de la susceptibilidad al PV están más probablemente situados en la región clase II del sistema HLA.

Los estudios llevados a cabo sobre el locus DP, están todos de acuerdo en la exclusión de este locus en la susceptibilidad al PV. Por consiguiente parece que los factores genéticos involucrados son teloméricos con respecto al locus DP y más probablemente localizados alrededor de la región DR y DQ.

Se postula que existe una base estructural de los alelos asociados que permite que éstos presenten correctamente péptidos del autoantígeno desmogleína 3 a linfocitos T autorreactivos, de ahí que la presentación antigénica sea el mecanismo más probable para explicar las asociaciones de ciertos alelos HLA con PV²¹.

La fuerte asociación con antígenos de clase II y la vinculación con otros fenómenos clínicos autoinmunes sugieren que ésta es una enfermedad inmunológicamente mediada.

El hecho de que la mayoría de las enfermedades relacionadas al sistema HLA-clase II, tales como artritis reumatoidea, diabetes insulino dependiente o lupus eritematoso tengan una base inmunológica, sugieren que DR y DQ son ellos mismos, genes que predisponen a padecer la enfermedad y que la base genética para el desarrollo de la misma involucra una serie de disturbios en la inmunorregulación, que van desde la presentación antigénica inadecuada hasta la pérdida de la autotolerancia.

Agradecimientos: A la Asesoría Científica del Hospital de Clínicas José de San Martín.

Bibliografía

1. Amagai M, Koch PJ, Nishikawa T, Stanley JR. Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 351-5.
2. Amagai M, Ishii K, Takayanagui A, Shimizu J. Transport to endoplasmic reticulum by signal peptide, but not proteolytic processing, is required for formation of conformational epitopes of Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein). *J Invest Dermatol* 1996; 107: 539-42.
3. Rohr JY, Stanley JR. Plakoglobin binding by human desmoglein 3 (pemphigus vulgaris antigen) in keratinocytes requires the cadherin-like intracytoplasmic segment. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 720-4.
4. Becker BA, Gaspari AA. Pemphigus vulgaris and vegetans. *Dermatol Clin* 1993; 11: 429-52.
5. Scharf SJ, Long CM, Erlich HA. Sequence analysis of the HLA DR β and HLA DQ β loci from three Pemphigus Vulgaris patients. *Human Immunol* 1988; 22: 61-9.
6. Scharf SJ, Friedmann A, Steinman L, Brautbar C, Erlich HA. Specific HLA DQ β and HLA DR β 1 alleles confer susceptibility to Pemphigus Vulgaris. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 6215-9.
7. Scharf SJ, Friedmann A, Brautbar C, Szafer SJ, Steinman L, Horn G, et al. HLA class II allelic variations and susceptibility to Pemphigus Vulgaris. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 3504-8.
8. Sinha AA, Brautbar C, Szafer SJ, Friedmann A, Tzfon E, Todd JA, et al. A newly characterised HLA DQ β allele associated with Pemphigus Vulgaris. *Science* 1989; 239: 1026-9.
9. Szafer F, Brautbar C, Tzfon E, Frankel G, Sherman L, Cohen I, et al. Detection of disease specific restriction fragment length polymorphisms in Pemphigus Vulgaris linked to the DQWL and DQW3 alleles of the HLA region. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 6542-5.
10. Haas E, Verruno L, Raimondi EH. HLA y enfermedad. El sistema HLA. Buenos Aires: Edit Universitaria 1986; p. 132-56.
11. Charron D, Fauchet R. Twelfth International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA DNA typing Technique, Paris, 1996.
12. Ahmed AR, Park MS, Tiwari JL, Terasaki PI. Association of DR4 with pemphigus. *Exp Clin Immunogenet* 1987; 4: 8-16.
13. Ahmed AR, Yunis EJ, Khatri K, Wagner R, Notani G, Awdeh Z, et al. Major Histocompatibility Complex haplotype studies in ashkenazi Jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 7658-62.
14. Ahmed AR, Wagner R, Khatri K, Notani G, Awdeh Z, Alper CA, et al. Major Histocompatibility Complex haplotype and class II genes in non jewish patients with pemphigus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 5056-60.
15. Ahmed AR, Mohimen A, Yunis EJ, Mirza NM, Kumar V, Beutner EH, et al. Linkage of pemphigus vulgaris antibody to the Major Histocompatibility Complex in healthy relatives of patients. *J Exp Med* 1993; 177: 419-24.
16. Nizeki H, Inoko H, Narimatsu H, Takata H, Sonoda A, Tadakuma T, et al. HLA class II antigens are associated with japanese pemphigus patients. *Human Immunol* 1991; 31: 246-50.
17. Nizeki H, Inoko H, Mizuki N, Inamoto N, Watababe K, Hashimoto T, et al. HLA DQA1, DQB1 and DRB1 genotyping in japanese pemphigus vulgaris patients by the PCR RFLP method. *Tissue Antigens*. 1994; 44:248-51.
18. Delgado JC, Yunis M, Bozon M, Salazar R, Deulofeut D, Turbay NK, et al. MHC class alleles and haplotypes in patients with pemphigus vulgaris from India. *Tissue Antigens* 1996; 48: 668-72.
19. Carcasi C, Cottoni F, Floris L, Vacca A, Mulargia M, Arras M, et al. HLA haplotypes and class II molecular alleles in sardinian and italian patients with pemphigus vulgaris. *Tissue Antigens* 1996; 48: 662-7.
20. Matzner Y, Erlich HA, Brautbar C, Sanilevitch A, Landau M, Brenner S, et al. Identical HLA class II alleles predispose to drug triggered and idiopathic pemphigus vulgaris. *Acta Derm Veneorol* 1995; 75: 12-4.
21. Wucherpennig KW, Yu B, Bhol K, et al. Structural basis for major histocompatibility complex (MHC) linked susceptibility to autoimmunity: charged residues of a single MHC binding pocket confer selective presentation of self peptides in Pemphigus Vulgaris. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 11935-9.

Una novela profunda surge frente a situaciones límite de la existencia, dolorosas encrucijadas en que intuimos la insoslayable presencia de la muerte. En medio de un temblor existencial, la obra es nuestro intento, jamás del todo logrado, por reconquistar la unidad inefable de la vida.

Ernesto Sábato

Antes del fin. Buenos Aires: Seix Barral, 1998; p 90