



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**POLIMORFISMOS EN GENES CANDIDATOS Y SU
ASOCIACIÓN CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO EN
PACIENTES PEDIÁTRICOS MEXICANOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

M. en C. RAFAEL VELÁZQUEZ CRUZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. LORENA SOFÍA OROZCO OROZCO

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, S.S., en colaboración con el Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI; el Hospital General Centro Médico “La Raza”; el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”; el Instituto Nacional de Pediatría y el laboratorio Rudbeck del departamento de Genética y Patología de la Universidad de Uppsala, Suecia. La dirección de esta tesis estuvo a cargo la Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco y la asesoría del Dr. Francisco A. Blanco Favela del Centro Médico Nacional Siglo-XXI y el Dr. Eduardo García Zepeda del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

**El trabajo realizado en esta tesis contó con el financiamiento
del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología:
SALUD-2004- 01-153 y del Fondo para el
Fomento de la Investigación Médica
(FOFOI): FP-20003/014.**

DEDICADO A:

- A Dios por haberme permitido llegar al final del camino, porque aunque las circunstancias influyeron mucho en mi vida, su voluntad siempre estuvo presente para modificar a mi favor las circunstancias.
- A Brenda mi más grande tesoro que Dios me mandó, su cariño y amor es la base de mi vida, tu eres mi inspiración y motor para superarme.
- A mi Madre porque siempre fuiste la luz de mis días más negros de mi existencia y que iluminó mis ojos al amanecer para dar un paso adelante en los momentos de dolor. Porque siempre fuiste mi apoyo incondicional y siempre estuviste conmigo cuando más te necesite.
- A mi hermano Jesús por todo su apoyo y comprensión, principalmente en los momentos más difíciles de mi vida. Gracias hermano, por estar conmigo en todo momento, también este triunfo es tuyo “brother”.
- A mi familia (Jesús, Evelia y Consuelo) sabiendo que no existirá una forma de agradecer una vida de sacrificio y esfuerzo, quiero que sientan que el objetivo logrado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudó a conseguirlo fue su apoyo.
- Gracias a mi abuelita Rosita, una segunda madre para mí, por encomendarme siempre con Dios para que saliera adelante, sus oraciones fueron escuchadas.
- A todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de este sueño: a mis tíos José Luis y Jacinto, a mi primo Bonifacio Vega, a mis amigos Cecilio y Rigo quienes me apoyaron cuando los necesite y me brindaron su amistad, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

AGRADECIMIENTOS:

- A Dra. Lorena Orozco Orozco, por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la culminación de este proyecto.
- Al Dr. Vicente Baca Ruiz, por sus enseñanzas, por sus valiosas sugerencias, su paciencia, acertados aportes y por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.
- Al Dr. Francisco Espinosa Rosales, por el apoyo en todo momento para este protocolo. Por su confianza y amistad que me ha brindado. Espero seguir contando con Usted.
- A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Eduardo García Zepeda y Dr. Francisco A. Blanco Favela, por su generosidad científica y valiosas críticas al discutir los resultados de este trabajo.
- A los miembros de mi jurado de examen: Dr. Alejandro García Carranca, Dra. Lorena Orozco Orozco, Dr. Jesús Chimal Monroy, Dra. María Alicia González Manjarrez y el Dr. Julio Granados Arriola; por su disposición y comentarios que sirvieron para enriquecer este trabajo.
- Quiero dar las gracias a todos aquellos que me han devuelto una sonrisa, a todos aquellos que han puesto de su parte para que el trajín diario sea más llevadero ... Yolanda Saldaña, Silvia Jiménez, María Guadalupe Salas, Julián Ramírez, Humberto García, Jesús Mejía, Emilio Córdova, Federico Centeno, Ma. Teresa Villarreal y Ma. Teresa García.
- Por último quiero agradecer a todos aquellos integrantes del laboratorio pasados y presentes que colaboraron en este proyecto: Gaby, Alejandro, Fabiola, Arturo Joel, Norma Deyanira, Adriana, Mirna, María Guadalupe, Osvaldo, Humberto y Jesús.
- Al CONACYT por la beca otorgada con número de registro 176785, para la realización de ésta tesis.

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| DEDICATORIAS | iv |
| AGRADECIMIENTOS | v |
| ABREVIATURAS | ix |
| LISTA DE FIGURAS | x |
| LISTA DE TABLAS | xi |
| RESUMEN | xii |
| ABSTRACT | xiv |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| EL GENOMA HUMANO | 1 |
| VARIACION GENÉTICA | 2 |
| MARCADORES GENÉTICOS | 3 |
| Polimorfismos de un solo nucleótido | 3 |
| Microsatélites | 3 |
| ENFERMEDADES GENÉTICAS | 5 |
| Enfermedades monogénicas | 5 |
| Enfermedades complejas | 5 |
| MÉTODOS DE MAPEO GENÉTICO | 8 |
| Ligamiento | 8 |
| Desequilibrio de ligamiento | 9 |
| Estudios de asociación | 11 |
| Análisis de asociación casos y controles | 11 |
| Análisis de asociación basado en familias | 15 |
| ENFERMEDADES AUTOINMUNES | 17 |
| Tolerancia central de los linfocitos T | 17 |
| Tolerancia periférica de los linfocitos T | 19 |
| Tolerancia de linfocitos B | 20 |
| Procesos patógenicos que conducen a las enfermedades autoinmunes | 22 |

| | |
|---|----|
| LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO: UNA ENFERMEDAD COMPLEJA | 22 |
| LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO PEDIÁTRICO | 23 |
| Epidemiología | 23 |
| Manifestaciones clínicas generales del LES | 24 |
| Manifestaciones cutáneas | 24 |
| Manifestaciones músculo esqueléticas | 24 |
| Alteraciones hematológicas | 25 |
| Manifestaciones cardíacas | 25 |
| Manifestaciones neuropsiquiátricas | 25 |
| Afección pulmonar | 26 |
| Afección renal | 26 |
| DIAGNÓSTICO | 27 |
| PATOGENESIS | 27 |
| Factores ambientales | 27 |
| Alteraciones inmunológicas | 29 |
| Linfocitos T | 29 |
| Linfocitos B y autoanticuerpos | 29 |
| Células dendríticas | 31 |
| Apoptosis | 31 |
| Factores genéticos | 32 |
| ESTUDIOS DE LIGAMIENTO EN LES | 33 |
| GENES CANDIDATO EN LES | 35 |
| JUSTIFICACIÓN | 38 |
| OBJETIVOS | 39 |
| HIPÓTESIS | 39 |
| CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN | 39 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 40 |
| Población de estudio | 40 |
| Criterios de inclusión | 40 |
| Criterios de exclusión | 40 |

| | |
|--|-----|
| Cálculo del tamaño de la muestra | 40 |
| Muestras | 41 |
| ANÁLISIS MOLECULAR | 41 |
| Extracción de DNA | 41 |
| Genotipificación de SNPs en genes candidatos | 42 |
| Método Fluorescente de 5´exonucleasa (TaqMan) | 42 |
| Diseño de oligonucleótidos y sondas específicas | 42 |
| Análisis de secuenciación | 42 |
| UBICACIÓN DEL ESTUDIO | 44 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 44 |
| RESULTADOS | 45 |
| Población de estudio | 45 |
| Polimorfismos del factor de necrosis tumoral (<i>TNF-α</i>) | 49 |
| Asociación del gen de la proteína tirosina fosfatasa 22 (<i>PTPN22</i>) | 51 |
| Análisis de los polimorfismos del gen 1 de muerte celular programada (<i>PDCD1</i>) | 53 |
| Análisis del gen del factor regulador del interferón 5 (<i>IRF5</i>) | 55 |
| Polimorfismos localizados en otros genes candidato | 63 |
| DISCUSIÓN | 66 |
| CONCLUSIONES | 79 |
| PERSPECTIVAS | 81 |
| REFERENCIAS | 83 |
| ANEXO I | 99 |
| ANEXO II | 100 |
| ARTÍCULOS | 106 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| AAF | Anticuerpos antifosfolípidos |
| AR | Artritis reumatoide |
| ANA | Anticuerpos antinucleares |
| ACR | American College of Rheumatology |
| cM | centi Morgan |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dsDNA | DNA de doble cadena |
| DCs | Células dendríticas |
| EAs | Enfermedades autoinmunes |
| FBAT | Prueba de asociación basada en familias |
| FCGR | Receptor para la fracción cristalizable de la inmunoglobulina G. |
| HLA | Antígeno Leucocitario Humano |
| IDDM | Diabetes mellitus insulino dependiente |
| IFN- α | Interferón alfa |
| LESp | Lupus eritematoso sistémico pediátrico |
| LOD | Logaritmo del riesgo relativo |
| LD | Desequilibrio de ligamiento o de enlace |
| MS | Esclerosis múltiple |
| MNP | Manifestación neuropsiquiátrica |
| OR | Riesgo relativo |
| OMIM | Online mendelian inheritance in man |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| pDCs | Células dendríticas plasmacitoides |
| SNP | Polimorfismo de un solo nucleótido |
| SNC | Sistema nervioso central |
| TDT | Prueba de desequilibrio de transmisión |
| VEB | Virus de Epstein Barr |
| WHO | Organización Mundial de la Salud |

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

| | |
|---|----|
| Figura 1. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) | 4 |
| Figura 2. Enfermedades genéticas | 7 |
| Figura 3. Análisis de ligamiento en familias no relacionadas | 10 |
| Figura 4. Estudios de asociación | 12 |
| Figura 5. Estratificación de la población | 14 |
| Figura 6. Prueba de desequilibrio de transmisión (TDT) | 16 |
| Figura 7. Mecanismos generales de la auto tolerancia de los linfocitos | 18 |
| Figura 8. Enfermedades autoinmunes | 21 |
| Figura 9. Patogenesis del LES | 30 |
| Figura 10. Distribución por género de los pacientes | 46 |
| Figura 11. Distribución por género de los controles | 47 |
| Figura 12. Comparación de los ORs para el SNP 1858C/T del gen <i>PTPN22</i> , en poblaciones con LES | 52 |
| Figura 13. Distribución de las frecuencias del SNP PD1.3A del gen <i>PDCD1</i> en pacientes con LES | 54 |
| Figura 14. Frecuencia del genotipo CC del SNP rs2070197 del gen <i>IRF5</i> | 62 |

LISTA DE TABLAS**PÁGINA**

| | |
|--|----|
| TABLA 1. Criterios de clasificación del Lupus eritematoso sistémico | 28 |
| TABLA 2. Estudios de ligamiento en LES | 34 |
| TABLA 3. Genes candidato en LES | 37 |
| TABLA 4. SNPs analizados en este estudio | 43 |
| TABLA 5. Análisis comparativo de las manifestaciones clínicas en pacientes mexicanos y de pacientes franceses | 48 |
| TABLA 6. Distribución de los genotipos y alelos de los SNPs localizados en el promotor del gen <i>TNF-α</i> | 50 |
| TABLA 7. Frecuencias alélicas de los SNPs del gen <i>IRF5</i> en población europea, mestizos-mexicanos e indios mexicanos mazatecos | 56 |
| TABLA 8. Frecuencias alélicas y de haplotipos del gen <i>IRF5</i> de pacientes con LES y controles sanos mexicanos | 58 |
| TABLA 9. Transmisión de los alelos y de haplotipos de los SNPs del gen <i>IRF5</i> en familias mexicanas | 59 |
| TABLA 10. Genotipos de los SNPs del gen <i>IRF5</i> en pacientes mexicanos con LES <i>versus</i> controles | 61 |
| TABLA 11. Frecuencias alélicas de los SNPs que no mostraron asociación | 65 |

RESUMEN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es el prototipo de las enfermedades autoinmunes, se caracteriza por la producción de una gran variedad de autoanticuerpos y daño a múltiples órganos, afecta principalmente al sexo femenino (>90%) y alrededor del 15-17% de todos los casos se manifiestan durante la infancia. En la última década, se han obtenido nuevas visiones de la etiopatogenia del LES, mediante análisis de ligamiento y estudios de asociación de casos y controles; sin embargo, en la mayoría de estos estudios se han incluido principalmente pacientes de inicio en la etapa adulta. Las bases genéticas del LES de inicio en la edad pediátrica, son actualmente inciertas. En la población mexicana, los pocos estudios dirigidos a la caracterización de los factores genéticos involucrados en el desarrollo de esta enfermedad, también se han realizado en pacientes adultos, enfocándose principalmente al análisis de genes localizados en la región del complejo principal de histocompatibilidad (CPH).

En esta tesis, estudios de asociación basados en familias así como en casos y controles fueron utilizados para la identificación de genes involucrados en la susceptibilidad para el LES en pacientes pediátricos mexicanos. Un panel de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en 11 genes candidato fue analizado para su asociación con la enfermedad. En la población pediátrica mexicana se identificaron cuatro SNPs fuertemente asociados con la susceptibilidad para desarrollar la enfermedad. Estos SNPs se localizan en los genes *TNF- α* , *PTPN22*, *PDCD1* e *IRF5*.

Los resultados respaldan una fuerte asociación genética del gen *IRF5* y con LES, en nuestra población. El SNP rs2070197 T/C mostró una fuerte asociación con la enfermedad (OR=3.19, IC:2.50-4.08). Por otra parte, el haplotipo de riesgo es muy frecuente en la población mexicana (40% versus 16% en población Europea). Aún mas interesante es el hecho que los pacientes mexicanos con LES tienen una muy alta frecuencia de individuos homocigotos para el haplotipo de riesgo (19.9%), contrario a los pacientes Europeos entre los cuales solo el 3.3% son homocigotos. El OR conferido para el genotipo homocigoto para el alelo C del SNP rs2070197 (el tag SNP para el haplotipo de riesgo) fue de 10.46.

Hasta la fecha, este es riesgo mas alto conferido por un gen para el desarrollo del LES, a nivel mundial. Los resultados observados, confirman previas asociaciones de estos polimorfismos con la enfermedad descritos en otras poblaciones, principalmente de pacientes adultos. Por otro lado las diferencias interpoblacionales de las frecuencias de los SNPs analizados apoyan, la hipótesis de que en este padecimiento existe una gran heterogeneidad genética y que esta varía entre los diferentes grupos étnicos, por lo que los genes candidatos deben ser estudiados con detalle en cada una de las poblaciones.

Los resultados presentados en esta tesis sientan las bases para el entendimiento de los mecanismos moleculares del LES en nuestra población y podrían contribuir como nuevas herramientas que nos permitan mejorar las estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento del LES y de otras enfermedades autoinmunes comunes en nuestra población.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) it is the prototype of autoimmune disease, characterized by the production of a wide variety of autoantibodies and multi organ damage, affecting mainly women (>90%). Onset occurs during childbearing in most cases, and around 15 to 17% are of childhood-onset. Childhood-onset is apparently more common in Hispanics. Over the last decade, linkage analyses and case-control association studies have provided new insight on the pathophysiology of the SLE. However, the vast majority of these studies have analyzed only adult-onset cases. In the Mexican population, the few studies analyzing genetic factors involved in the development of this disease have included only adult-onset cases and have focused on mainly on the role of histocompatibility complex (MHC) genes. Overall, very few studies have attempted to analyze the genetic basis of childhood-onset SLE.

In the present thesis, association studies in families as well as cases and controls were performed to identify SLE susceptibility genes in Mexican pediatric patients. A panel of single nucleotide polymorphisms (SNPs) located within 11 candidate genes were tested for association with childhood-onset SLE. Four SNPs located within the *TNF- α* , *PTPN22*, *PDCD1* and *IRF5* genes showed significant association with childhood-onset SLE in the Mexican population.

The results support a strong genetic association between *IRF5* gene and Mexican patients with SLE. The rs2070197 T/C SNP showed very strong association with disease (OR=3.19, IC:2.50-4.08). Moreover, the risk haplotype is very frequent in the Mexican population (allele frequency, 40% versus 16% in European population). The frequency of risk haplotype homozygotes among Mexican childhood SLE cases was very high (20%), in contrast with that in European adult SLE patients (3.3%). The genotype odds ratio for being homozygote for the C allele of rs2070197 (the SNP tagging the risk haplotype) was 10.46. To date, this is the highest risk conferred by any gene to develop SLE worldwide. Our results replicate previous associations of *IRF5* with SLE in other populations, and stress the importance of genetic heterogeneity and ethnic differences, which deserve to be studied in detail in each population.

These results contribute to the understanding of the molecular mechanisms involved in the pathophysiology of the SLE in our population, and may help improve prevention, diagnostic and treatment strategies for this and other autoimmune diseases.

INTRODUCCIÓN

En febrero del 2001, se publicó el primer borrador de la secuencia del genoma humano (Lander et al. 2001; Venter et al. 2001), cuya secuenciación fue completada en Abril del 2003. El conocimiento generado de este análisis ha concebido una comprensión valiosa de la naturaleza de la biología humana y ha ayudado a entender la historia de las poblaciones ancestrales y modernas, así como de los mecanismos fundamentales de varias formas de enfermedad. La comparación de las secuencias entre especies y la anotación funcional de los genes humanos, han tenido un impacto sustancial en nuestra habilidad para identificar los loci de susceptibilidad y las variantes genéticas que predisponen a las patologías humanas. Muchas de estas enfermedades tienen un componente genético en su etiología, algunas de las cuales son generadas por un defecto en un solo gen (monogénicas), mientras que otras son causadas por la interacción de múltiples genes con el medio ambiente (enfermedades complejas), (Collins et al.1998).

EL GENOMA HUMANO

Un objetivo clave desde los inicios del proyecto del genoma humano (HGP), en 1990, fue el de conocer su secuencia completa, identificar genes nuevos y conocer la variabilidad genética. La estimación actual del número de genes por genoma haploide en el humano es de 23,000, el cual es considerablemente menor de los 35,000 a 120,000 previamente esperados (Liang et al. 2000; Ewing et al. 2000). La expresión de estos genes es compleja por la generación de varios productos de un mismo gen, resultado de splicing alternativo, otros procesos post-traduccionales y la expresión diferencial de los genes en varios tejidos y durante las diferentes fases de desarrollo. No obstante, la magnitud de las secuencias que codifican para proteínas es sólo una pequeña fracción del genoma total (1.15 a 1.5%), la mayoría consiste de DNA repetitivo (más del 50%) y secuencias intergénicas no-codificantes (aproximadamente 30%) (Strachan y Read, 1996).

Tradicionalmente las secuencias en genes codificantes de proteínas han recibido mayor interés, sin embargo la atención cada vez está siendo más enfocada en los intrones y otras regiones no codificantes, debido a que es posible que en éstos

residan sitios funcionales importantes, tales como dominios reguladores. Algunas regiones que son importantes para la regulación y la expresión de diferentes genes están siendo identificadas por su conservación entre especies distantes evolutivamente. El conocimiento sobre la estructura física y el código genético completo de los seres humanos en conjunto con la información genómica de otros organismos puede aumentar sustancialmente la posibilidad de la identificación de los genes causantes de la enfermedad y otras regiones biológicamente importantes.

VARIACION GENÉTICA

Las secuencias completas de dos genomas humanos son aproximadamente 99.9% idénticos (excepto para los gemelos monocigotos), la pequeña variación existente consiste de millones de polimorfismos, lo que hace que cada genoma individual sea único. Un polimorfismo se define como una variación en la secuencia del DNA, en la cual la frecuencia del alelo raro es $>1\%$ (Reich et al. 2002).

Sin embargo, la diferencia entre dos individuos no sólo se debe a la variación genética y los efectos del ambiente; los niveles de expresión de genes cruciales en fases del desarrollo específicos, son también factores importantes. La diversidad existente no sólo hace posible distinguir un individuo de otro, sino también permite entender la evolución de la humanidad e identificar las causas de numerosas enfermedades.

A la fecha, hay más de 8,000 genes relacionados a enfermedades enlistados en la base de datos del OMIM (del inglés, Online Mendelian Inheritance in Man) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>), y esta cifra va en aumento cada día.

La mayoría de las variantes polimórficas no tienen una implicación directa con una enfermedad aunque existen muchos ejemplos de “variantes normales”, las cuales son abundantes en una población y que aunque no son ni necesarias ni suficientes para el desarrollo de una patología, pueden ser causa del incremento de susceptibilidad o el riesgo para padecer una patología.

MARCADORES GENÉTICOS

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)

El tipo más común de variación genética es el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). Estas sustituciones de una sola base comprenden el 90% de la cantidad total de variación en el genoma humano (Collins et al. 1998) (figura 1). Se ha estimado que existen alrededor de 10 millones de SNPs por genoma haploide (Kruglyak y Nickerson, 2001), de los cuales alrededor de 7 millones son conocidos y están disponibles en varias bases de datos (Sachidanandam et al. 2001). El hecho que los SNPs sean comunes y sean relativamente estables, los hace los marcadores ideales en el mapeo de genes, especialmente en las estrategias de ligamiento y asociación genética (Risch y Merikangas, 1996; Lander et al. 1996; Kruglyak et al. 1999). Otra ventaja es que con las nuevas metodologías que se han desarrollado, ahora es posible su genotipificación a gran escala de una manera exacta, eficiente y costo-efectiva. Algunos SNPs son mutaciones viejas, que surgieron mucho tiempo antes de la divergencia de las poblaciones actuales y por lo tanto, pueden ser compartidos entre las poblaciones de diferentes orígenes étnicos.

Microsatélites

Los microsatélites son otro tipo de marcadores comúnmente usados en el mapeo de genes, principalmente en el análisis de ligamiento tradicional (Strachan y Read, 1996). Este tipo de marcadores no son tan abundantes como los SNPs, pero son muy útiles en el análisis de ligamiento, donde se requiere menos resolución que en los estudios de asociación. Existen más de 10,000 marcadores microsatélites distribuidos a lo largo del genoma humano (Weber et al. 1989).

Una resolución de aproximadamente un marcador microsatélite por cada 10 cM, sería lo suficientemente denso para identificar un gen de susceptibilidad, en cualquier parte de la secuencia del DNA por una estrategia tradicional de ligamiento. Los microsatélites son marcadores multialélicos que consisten de di-tri o tetra repetidos de nucleótidos de varias longitudes y a menudo son altamente informativos, pero a diferencia de los SNPs, tienen una tasa de mutación relativamente alta (Brinkmann et al. 1998).

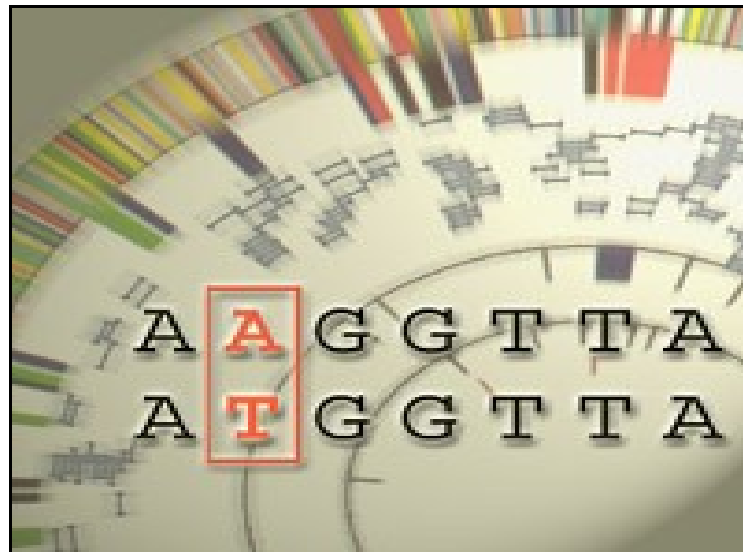


Figura 1. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Los SNPs son cambios de una sola base en una posición o región específica en la secuencia del DNA.

La identificación de marcadores genéticos informativos, así como el desarrollo de mapas genéticos de alta densidad y mapas físicos del genoma completo, han facilitado la implementación de nuevas estrategias para el mapeo de genes de susceptibilidad para las enfermedades humanas. Los mapas genéticos están disponibles en varios sitios; tales como:

Généthon (<http://www.cephb.fr/ceph-genethon-map.html>)

Cooperative Human Linkage Center (CHLC)(<http://gai.nci.nih.gov/CHLC/>)

Marshfield (<http://research.marshfieldclinic.org/genetics/>)

Genome Database (GDB), ([http://www.gdb.org /](http://www.gdb.org/)).

ENFERMEDADES GENÉTICAS

Enfermedades Monogénicas

Las enfermedades mendelianas o monogénicas, como su nombre lo indica, son causadas por mutaciones en un solo gen, que pueden ir desde mutaciones puntuales hasta grandes deleciones o inserciones. La herencia de estas alteraciones siguen las leyes mendelianas (descritas por Gregor Mendel en 1866) por lo que también son referidas como enfermedades mendelianas simples. En algunos casos otros factores genéticos (genes modificadores), los factores ambientales, la heterogeneidad alélica o hasta el manejo de la entidad, pueden complicar el cuadro clínico. En las enfermedades monogénicas, existe una estrecha correlación entre el genotipo y el fenotipo, lo que significa que la *penetrancia* (la probabilidad que un individuo portador exprese la enfermedad) es generalmente alta. Las enfermedades mendelianas pueden ser heredadas en un forma dominante (es suficiente con la herencia de un alelo afectado) o de una manera recesiva (es necesario que las dos formas alternativas de un alelo se encuentren afectados) (figura 2).

Enfermedades complejas

Las enfermedades complejas no siguen un patrón de herencia mendeliana, aunque en muchos casos existe más de un individuo afectado dentro de una misma familia (agregación familiar). Las enfermedades complejas tienen una etiología multifactorial, lo que significa que son causadas por la interacción de varios

componentes y son expresadas bajo la influencia de factores genéticos y no genéticos, como los ambientales (figura 2).

Muchas enfermedades complejas son comunes en la mayoría de las poblaciones y afectan millones de personas a nivel mundial, por ejemplo las enfermedades autoinmunes (EAs), diabetes y muchas formas de cáncer. En las enfermedades complejas, los alelos que predisponen a la enfermedad son variantes polimórficas también presentes en los individuos sanos, ya que estos alelos son causantes sólo de susceptibilidad. Se dice que éstas tienen una penetrancia incompleta o reducida, ya que un individuo puede ser portador del alelo de la enfermedad sin expresar la enfermedad. Los factores tales como el sexo, edad, ambiente y fondo genético pueden afectar la penetrancia.

Una característica que define las enfermedades complejas es que éstas son poligénicas, lo que significa que existen varios alelos de predisposición o alelos de susceptibilidad involucrados, además del ambiente. Para que un individuo exprese la enfermedad necesita un cierto número de estos alelos los cuales pueden funcionar en una manera aditiva, interactiva o epistática. En general los individuos sanos pueden ser portadores de varios “alelos de susceptibilidad”, los cuales son compatibles con la función normal a menos que otras variantes de susceptibilidad y un medio ambiente adverso estén presentes.

Los genes de susceptibilidad pueden variar dependiendo de la población estudiada. También la heterogeneidad dentro de una población puede ocurrir, complicando la identificación de estos genes. La expresión de la enfermedad causada por factores no-genéticos (fenocopias), tales como el ambiente, también necesitan ser considerados cuando se estudian las enfermedades complejas. Otra característica importante de estas enfermedades es la presencia de heterogeneidad genética. Esta incluye la heterogeneidad alélica, donde diferentes alelos del mismo gen causan el fenotipo, y la heterogeneidad de locus, donde diferentes genes en diferentes loci cromosomales disparan el mismo fenotipo.

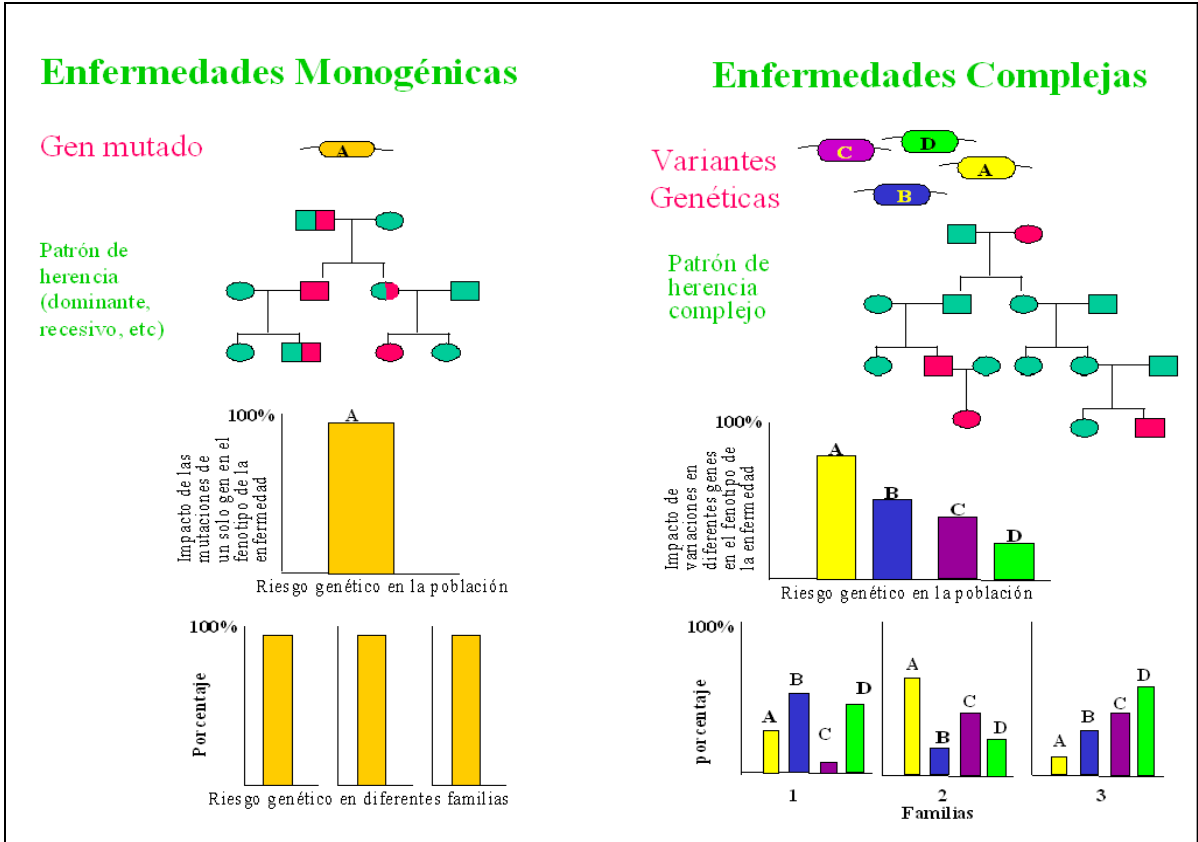


Figura 2. Enfermedades genéticas. En las enfermedades mendelianas o monogénicas, la alteración de un sólo gen causa la enfermedad y el riesgo genético de una mutación en el gen es el mismo entre las poblaciones. En las enfermedades complejas, múltiples genes tiene una pequeña participación al desarrollo de la enfermedad, el riesgo de cada gen es diferente entre la poblaciones y aún entre los individuos de una misma población.

Este tipo de enfermedades tienden a agruparse en las familias. El grado de esta agregación puede ser medida por el valor de λ_s , (el cual es la relación del riesgo de la recurrencia de la enfermedad entre los hermanos de los individuos afectados y la incidencia de la enfermedad en la población general) mediante el cual se estima el riesgo que un hermano de un individuo afectado puede padecer la enfermedad. Un valor de λ_s cercano a uno significa que la enfermedad no se agrupa en las familias. Por ejemplo, el valor λ_s para la fibrosis quística, es estimado arriba de 500, mientras la artritis reumatoide, una enfermedad compleja, tiene un valor λ_s entre 5 y 10 (Wandstrat y Wakeland, 2001).

MÉTODOS DE MAPEO GENÉTICO

Desde la década pasada varios métodos genéticos moleculares se han aplicado a un amplio intervalo de rasgos cuantitativos y complejos, con grados variables de éxito. La falla de algunas metodologías para localizar e identificar variantes genéticas de predisposición a la enfermedad y el rápido desarrollo de tecnologías moleculares, ha conducido a importantes cambios en las estrategias de investigación.

El análisis de ligamiento o enlace y los estudios de asociación son dos métodos genéticos analíticos utilizados para detectar tanto regiones cromosómicas específicas como variantes genéticas localizadas en genes que están involucradas en el desarrollo de la enfermedad (Baca y Orozco, 2004).

Ligamiento

El ligamiento se refiere a la segregación no independiente de los genes en dos o más loci localizados sobre el mismo cromosoma. El análisis de ligamiento típicamente utiliza datos fenotípicos de familias para inferir la presencia y la extensión de la segregación no independiente entre un rasgo y uno o más marcadores genéticos con el objeto de establecer la localización de una variante genética que esté influyendo en el fenotipo. Los estudios de ligamiento se realizan en individuos de una misma familia, ya sea en hermanos (sib pair análisis) o en

pedigríes extensos (figura 3). Este tipo de estudio permite determinar si un marcador genético y el gen que predispone a la enfermedad se encuentran físicamente ligados mediante el análisis de la cosegregación del marcador y el fenotipo de la enfermedad. El análisis de ligamiento tiene dos características atractivas: éste no requiere conocimiento de los mecanismos patofisiológicos y su intervalo se extiende por encima de grandes distancias genéticas (hasta 20cM).

El análisis de ligamiento puede ser dividido en dos principales estrategias: 1) análisis de ligamiento paramétrico o basado en modelo, el cual usa familias multi-caso y pedigríes extendidos. Este método requiere algunas suposiciones, tal como el modo de herencia de la enfermedad del alelo de la enfermedad (recesivo o dominante), la frecuencia del alelo de la enfermedad en la población y el valor de penetrancia. 2) análisis de ligamiento no-paramétrico o libre de modelo que usa familias nucleares y pares de hermanos afectados dónde teóricamente ninguna suposición necesita ser hecha.

La evidencia estadística de ligamiento es medida convencionalmente como el LOD score, que es el logaritmo de base 10 del cociente de dos probabilidades: la probabilidad de que dos loci se encuentran ligados entre la probabilidad de que no haya ligamiento. LOD scores arriba de 3 se dice que son significativos; sin embargo Lander y Kruglyak, 1995 propusieron que el umbral para un LOD score significativo debe ser 3.3, al menos cuando varios marcadores son analizados, tal como en un análisis del genoma completo. En las enfermedades complejas es difícil obtener grandes pedigríes multigeneracionales debido a la participación de múltiples genes y a la fuerte influencia de los factores ambientales en su desarrollo.

Desequilibrio de Ligamiento

El desequilibrio de ligamiento (LD: del inglés, *Linkage disequilibrium*) es un fenómeno por el cual aquellos alelos que están suficientemente cerca en el genoma (haplotipo) tienden a ser heredados juntos con una frecuencia mayor que la esperada por el azar. El desequilibrio de ligamiento es muy útil, pues permite localizar polimorfismos relacionados con la enfermedad.

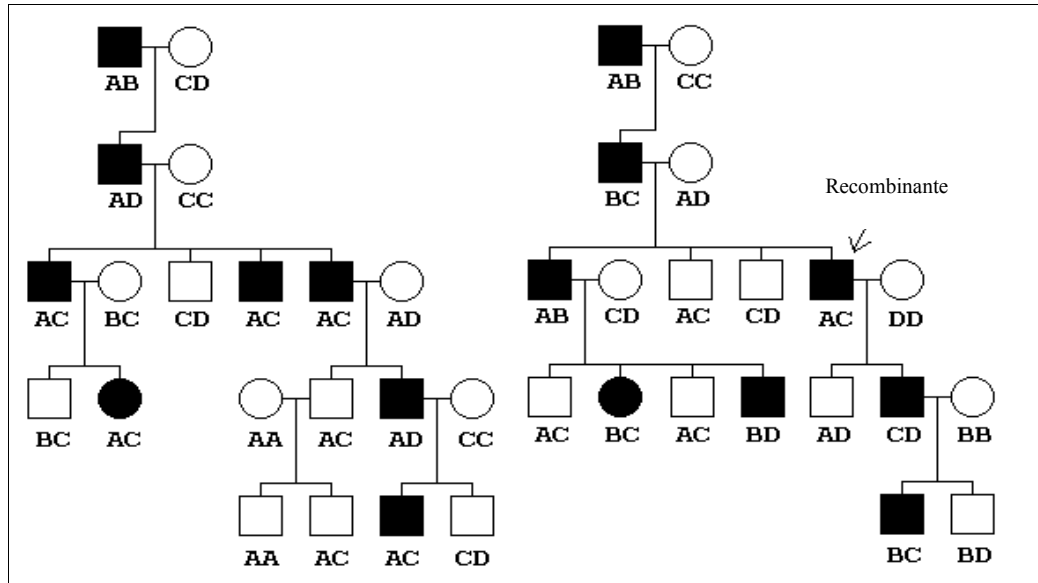


Figura 3. Análisis de ligamiento en familias no relacionadas. Se evalúa la cosegregación de un marcador con la enfermedad, en la primera familia la enfermedad cosegrega con el alelo A; mientras que en la segunda, la misma patología con el alelo B. Los círculos y cuadros negros indican individuos afectados, mientras que los blancos individuos sanos (Modificado de Baca y Orozco, 2004).

Si aparece una mutación que genera un polimorfismo responsable de la enfermedad, es posible que otros polimorfismos cercanos también estén asociados con ella. Existen dos medidas de LD (Devlin y Rich, 1995), frecuentemente observadas en la literatura, como el valor D' de Lewontin's y el coeficiente de correlación r^2 . Cuando los valores para D' y r^2 difieren significativamente de cero existe evidencia de LD, mientras que un valor de uno indica LD completo.

Estudios de asociación

Los estudios de asociación están basados en la hipótesis de que un gen específico contribuye a la enfermedad de interés. Para el mapeo de genes involucrados en las enfermedades complejas, tales como el LES, los estudios de asociación pueden ser más eficientes que los análisis de ligamiento (Rich y Merikangas, 1996; Long y Langley, 1999). En el análisis de asociación, polimorfismos dentro o en la vecindad de los genes de interés (genes candidato) son típicamente analizados. Este tipo de análisis puede también realizarse en el genoma completo. El objetivo de estos estudios es determinar si un alelo específico o genotipo se encuentra con un riesgo más alto de desarrollar la enfermedad. Este puede ser realizado directamente estudiando las variantes funcionales dentro del gen u otras variantes que pudieran cosegregar con un alelo desconocido de la enfermedad. Ambas estrategias presentan limitantes tecnológicas y serios cuestionamientos acerca de su costo y validez, por lo que la estrategia más eficaz en el mapeo de genes está enfocada al análisis de SNPs en genes candidatos que codifican para proteínas cuya función es conocida y que tienen un efecto potencial en el fenotipo de la enfermedad.

Análisis de asociación casos-controles.

Un estudio de asociación puede ser realizado con un estudio de casos y controles donde la frecuencia de un polimorfismo en pacientes no relacionados es comparada con la de los controles sanos no relacionados (figura 4). La medida estadística de asociación en un estudio de casos y controles puede ser una simple prueba de chi cuadrada (χ^2).

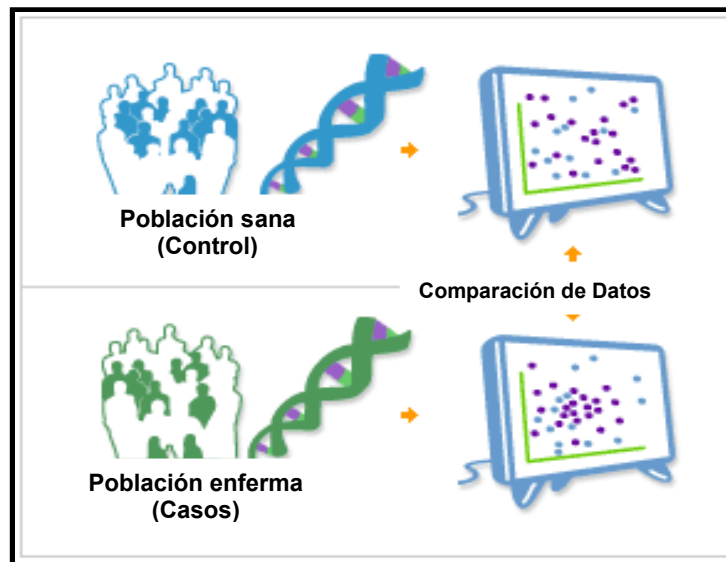


Figura 4. Estudios de asociación. Compara la frecuencia con la que aparece un marcador entre casos y controles no relacionados. Si el marcador se presenta con una frecuencia mayor en los casos, el marcador estará asociado con el desarrollo de la enfermedad.

Otra medida estadística de asociación comúnmente usada es el riesgo relativo (odds ratio). Este da el riesgo de tener la enfermedad dada por la exposición a un factor de riesgo, comparado a no tenerla estando expuesto al mismo factor de riesgo. Bajo la hipótesis nula, que la exposición no da un riesgo aumentado para la enfermedad y que el riesgo es igual a uno (Balding, 2006). Si la exposición da un riesgo aumentado para la enfermedad, el riesgo relativo (Odds Ratio) debe ser mayor a uno, dependiendo de la fuerza del factor de riesgo.

Los estudios de asociación incluyen la tipificación de SNPs en casos no relacionados y un grupo de controles pareados con base en su origen étnico. Un polimorfismo dado puede ser el locus de interés si el alelo ocurre con una frecuencia significativamente mayor entre los casos, comparados con los controles. Sin embargo, con este tipo de diseño existen tres posibles causas de asociación, cuando se observa una asociación significativa: 1) efecto directo del marcador alélico en estudio. En algunas ocasiones el marcador utilizado es un polimorfismo intragénico que altera la secuencia de aminoácidos o afecta la transcripción, por lo que los diferentes alelos pueden mostrar diferencias en la cantidad o calidad del producto génico y tener un efecto directo en la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. En estos casos, se espera que en cualquier población estudiada se encuentre la misma asociación. 2) desequilibrio de ligamiento (LD). Si la causa de asociación es debida a desequilibrio de ligamiento, esto significa que el gen o alelo de interés se encuentra en estrecha proximidad al marcador polimórfico. Debido a que el LD depende del efecto fundador ejercido sobre la población, una enfermedad puede mostrar asociación con alelos diferentes de un marcador en las diferentes poblaciones; por ejemplo, el alelo A puede encontrarse asociado con la enfermedad en una población, mientras que en otra población el alelo observado puede ser el B, e incluso en poblaciones muy mezcladas podría no existir asociación con ninguno de los alelos y 3) estratificación de la población, si en una población existen subgrupos que no tienden a mezclarse, esto puede condicionar a que tanto la enfermedad como algunos marcadores alélicos podrían ser más comunes entre los individuos de un subgrupo (figura 5).

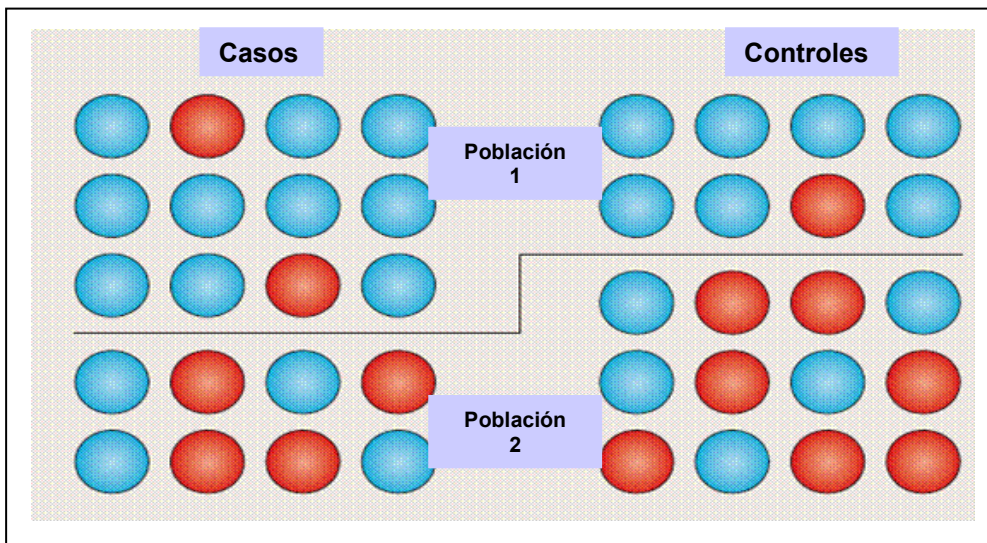


Figura 5. Estratificación de la población. Este problema surge cuando los casos representan un subgrupo genético (poblacion1 en la figura). El alelo representado de color azul esta sobre representado entre los casos pero sólo porque es más frecuente en la población 1.

En estos casos, los estudios de asociación pueden dar resultados falsos positivos. Para evitar falsas asociaciones secundarias a la estratificación de la población, los controles deberán ser pareados con los casos por factores relevantes como el origen étnico y origen geográfico (Silverman y Palmer, 2000).

Análisis de asociación basado en familias

Los estudios de asociación en familias son la mejor alternativa para la identificación de genes involucrados en las enfermedades complejas como el LES, ya que a diferencia de los estudios de asociación en casos y controles, los estudios familiares evitan falsas asociaciones debidas a la estratificación de la población (por selección inadecuada de la muestra control), (Laird y Lange, 2006). Uno de estos métodos y el más ampliamente utilizado es la prueba de desequilibrio de transmisión (TDT; "transmission disequilibrium test"). La TDT analiza la transmisión preferencial de alelos específicos, es decir, la asociación entre un marcador alélico y un locus de la enfermedad. Si una asociación existe, se observará una desviación significativa de la frecuencia de transmisión del marcador bialélico de los padres a la descendencia afectada, del valor esperado para cualquiera de los dos alelos (valor de 50%) (Spielman y Ewens, 1996).

En otras palabras, la prueba de TDT compara la frecuencia con la cual los padres heterocigotos transmiten un alelo específico de un marcador bialélico o su forma alterna al hijo afectado. Si el marcador alélico se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el locus de la enfermedad o éste tiene un efecto directo en la susceptibilidad de la misma, se observará una desviación significativa de la frecuencia de transmisión esperada para cualquiera de los dos alelos (50%) (Prueba de TDT positiva) (figura 6). Una asociación significativa sugiere un gen candidato en la etiología de la enfermedad (Spielman y Ewens, 1996).

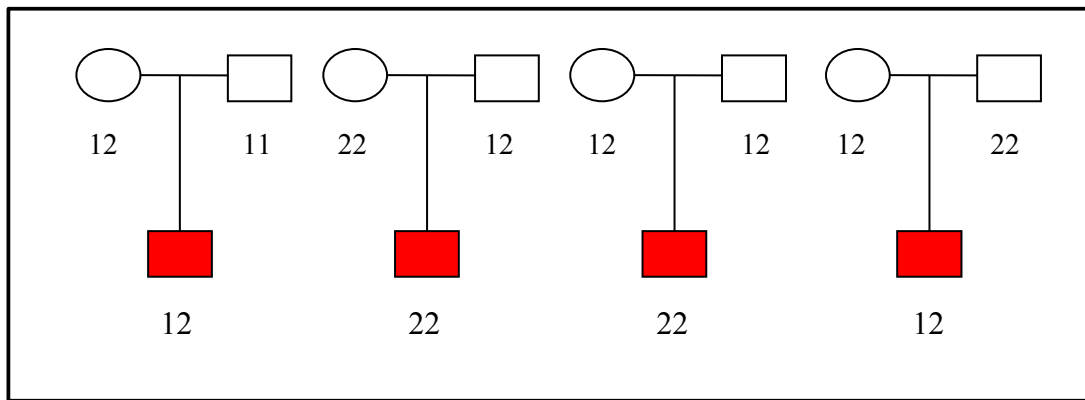


Figura 6. Prueba de desequilibrio de transmisión (TDT). Solo se toman en cuenta los padres heterocigotos, por ser los informativos. El alelo (2) es transmitido 4 veces, mientras que el alelo (1), es transmitido sólo una vez. Cuando un alelo es transmitido con mayor frecuencia que la esperada (50%) en pacientes no relacionados, como es el caso del alelo (2), se puede inferir que éste se encuentra asociado con la enfermedad.

ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Se estima que las EAs afectan el 4-5% de la población, predominan en el sexo femenino y aproximadamente 1 de cada 30 individuos padece algún tipo de enfermedad autoinmune, por lo que estas entidades representan un problema de salud en la medicina actual (Wandstrat y Wakeland, 2001). Las enfermedades autoinmunes son condiciones crónicas que resultan de una falla del sistema inmune para discriminar antígenos propios de los no propios. En condiciones normales el sistema inmune protege al organismo hospedero de todos los "intrusos" extraños, es capaz de discriminar entre los auto-antígenos (componentes del cuerpo como su propios ácidos nucleicos y proteínas) y antígenos extraños (microorganismos y virus). Normalmente los linfocitos reactivos hacia los auto-antígenos son eliminados, este mecanismo es conocido como auto-tolerancia y una falla en la auto tolerancia es la causa fundamental de las enfermedades autoinmunes (Rioux and Abbas, 2005).

La auto tolerancia puede ser dividida en: tolerancia central y tolerancia periférica. En la tolerancia central, los linfocitos inmaduros que reconocen auto antígenos en los órganos linfoides generadores (la médula ósea para las células B y el timo para las células T) mueren por apoptosis; en la tolerancia periférica, los linfocitos auto reactivos maduros encuentran a los auto antígenos en órganos linfoides periféricos (bazo y ganglios linfáticos) y son eliminados (figura 7).

Tolerancia central de los linfocitos T

En el timo tienen lugar dos procesos: la selección positiva de aquellos linfocitos cuyo receptor es capaz de reconocer las moléculas propias del MHC y la selección negativa que consiste en la eliminación de las células T auto reactivas. La muerte de los timocitos en todas estas circunstancias se consigue por apoptosis. A su paso por el timo los precursores de los linfocitos T (timocitos), son inducidos a proliferar y a diferenciarse en células T, para ello es indispensable la expresión del receptor de células T (TCR) y la selección positiva (Von Boehmer H, 1994).

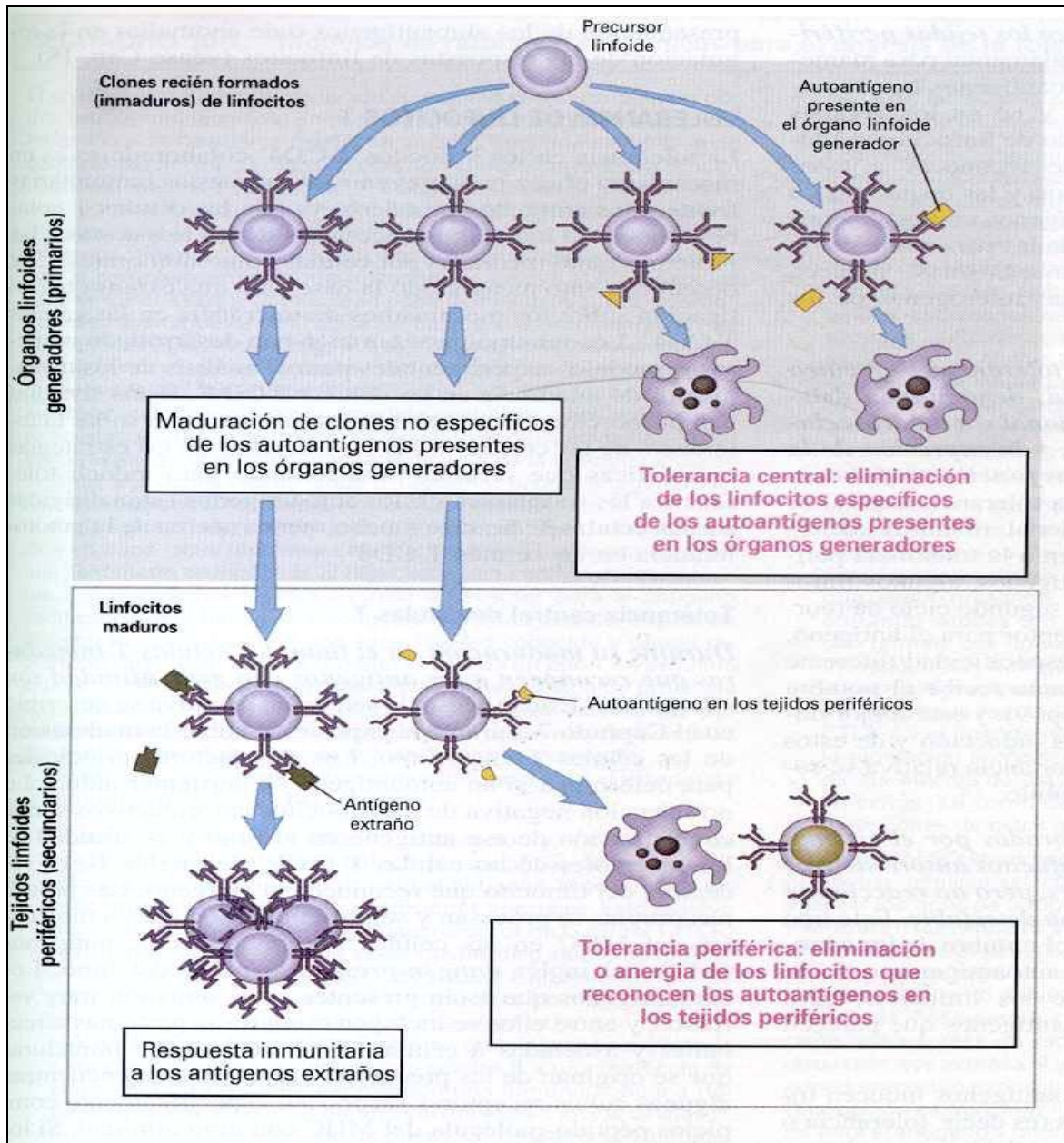


Figura 7. Mecanismos generales de la auto tolerancia de los linfocitos. (Tomado de www.ucm.es/info/saniani/).

En la selección positiva, del repertorio de linfocitos se seleccionan sólo aquellos linfocitos que expresan un TCR capaz de interactuar adecuadamente con las células presentadoras de antígenos (CPA) del timo (a través de HLA y péptidos tímicos). De esta manera todos los timocitos seleccionados positivamente tendrán la posibilidad de interactuar con las CPAs del individuo (restricción por HLA), de ser estimulados por estas y de montar una respuesta inmunitaria frente a los antígenos extraños.

Este nuevo repertorio seleccionado también tendrá células capaces de responder con baja afinidad o con alta afinidad a los autoantígenos expresados en la superficie de las CPAs del individuo. Las células auto reactivas de baja afinidad, no son problema porque dada la eventualidad de encontrarse con los auto antígeno respectivos, la probabilidad de activarse y montar una respuesta es mínima. La situación para las células auto reactivas de alta afinidad, es opuesta porque dada la probabilidad de encontrarse con los autoantígenos respectivos, la posibilidad de activarse y montar una respuesta es viable. Para disminuir esta posibilidad, el timo realiza una selección negativa mediante la cual los timocitos que interactúan fuertemente con los péptidos y las CPAs tímicas son inducidos a una muerte celular apoptótica (Nossal GJV, 1994).

Tolerancia periférica de los linfocitos T

Los mecanismos principales de la tolerancia periférica son la anergia (insensibilidad funcional), deleción (muerte celular apoptotica y la supresión por las células T reguladoras (Goodnow et al, 2005).

La anergia clonal ocurre frecuentemente en los tejidos periféricos y consiste en la incapacidad de respuesta por parte de un linfocito una vez que este ha sido estimulado por su antígeno específico (Schwartz RV, 1996). Este linfocito es activado por el antígeno de una manera inadecuada o en ausencia de señales co-estimuladoras y entra en un estado refractario del cual sólo sale después de un periodo de tiempo prudente y de una estimulación y co-estimulación adecuada.

La deleción clonal es un mecanismo responsable tanto para la tolerancia central (selección negativa en el timo) como periférica de los linfocitos T.

El mecanismo responsable de ésta es la apoptosis inducida por la estimulación antigénica de los timocitos o de los linfocitos T auto reactivos en la periferia (Leonardo et al, 1999).

La supresión clonal es un proceso activo mediante el cual un factor externo (citocinas, linfocitos u otras células) frena la respuesta de una célula auto reactiva una vez que esta es estimulada por su respectivo auto-antígeno (Weigle and Rpmball, 1997). Las células T reguladoras son células CD4+, CD25+ con alta afinidad para ciertos auto-antígenos que escapan a la selección negativa en el timo, gracias a su interacción con células epitelio reticulares medulares, van a los órganos linfoides secundarios y frenan las repuestas inmunitarias de linfocitos estimulados por sus respectivos auto-antígenos (Mason D, 2001).

Tolerancia de linfocitos B

Como la tolerancia central para los linfocitos B (LB) no es tan intensa, los linfocitos B auto reactivos son más abundantes que los linfocitos T auto reactivos. No obstante, dado el papel regulador de los linfocitos T-CD4 sobre la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B, muchos de los linfocitos B auto reactivos no responden a sus respectivos autoantígenos por la ausencia de una actividad colaboradora de los linfocitos T. Es decir, como no hay tantos linfocitos T auto reactivos, muchos de los linfocitos B auto reactivos se mantienen tolerantes. La tolerancia periférica se produce por diferentes mecanismos: 1) la anergia clonal (inactivación funcional) que es la falta de coestimulación, que se induce por un exceso del antígeno soluble y 2) la incapacidad del linfocito B para migrar a los folículos linfoides (Abbas et al, 1997).

Las enfermedades autoinmunes (EAs) surgen cuando los linfocitos auto reactivos escapan al mecanismo de la tolerancia y son activados (Rioux and Abbas, 2005). Aunque los mecanismos por los cuales esto ocurre no son conocidos, las EAs aparecen por la combinación de factores genéticos y factores ambientales que en combinación traen como consecuencia defectos en los mecanismos inmunoreguladores (Ermann y Fathman, 2001) (Figura 8).

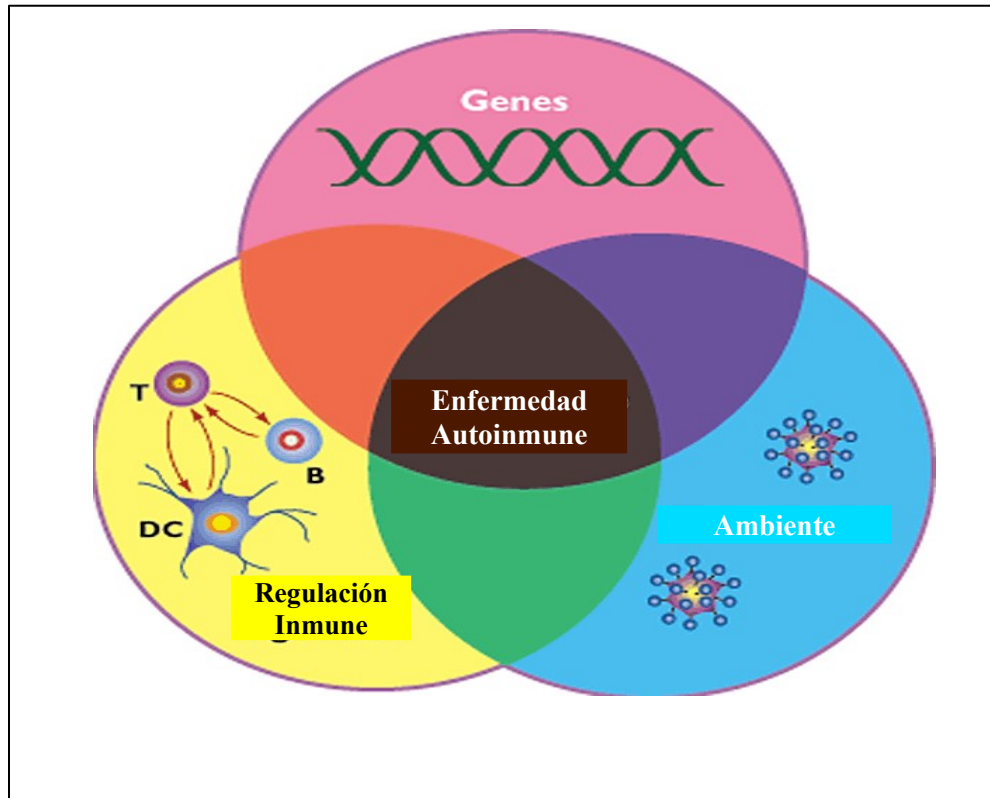


Figura 8. Enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes surgen de una combinación de factores genéticos y ambientales que en combinación traen como consecuencia defectos en los mecanismos inmunoreguladores, (Tomado de: Ermann y Fathman, *Nat Immunol* 2001).

Procesos patogénicos que conducen a las enfermedades autoinmunes.

La progresión hacia la EA depende de la pérdida de sensibilidad a las señales negativas por parte de las células autoinmunes. Estas señales inhibitorias son transmitidas a través de las moléculas CTLA-4, los receptores de alta afinidad para la IL-2, requeridos para el equilibrio entre proliferación y muerte de las células T activadas, o los receptores inhibitorios para las moléculas MHC, que se expresan también sobre las células T y pueden representar un mecanismo de la tolerancia periférica frente a los autoantígenos (Andre et al, 1996; Karandikar et al, 1998). El inicio de las EAs que dependen de la producción de auto anticuerpos y depósito de inmunocomplejos, como el LES, está relacionado con incrementos en el título, aumentos de la afinidad y cambios en el isotipo de los autoanticuerpos, lo cual los vuelve patogénicos (Hahn BH, 1998).

Las células autoinmunes comienzan a reclutarse en el órgano de choque porque a causa de las estimulaciones inespecíficas del sistema inmune incrementan su potencial de asentamiento (*homing*), lo que les confiere mayor capacidad de migrar al órgano blanco (Andre et al, 1996). Así, una gran variedad de células particulares o múltiples tejidos pueden estar afectados como resultado de una reacción autoinmune.

LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO UNA ENFERMEDAD COMPLEJA.

El LES fue descrito primero como una condición dermatológica en 1833 y fue por largo tiempo considerada como una “enfermedad del tejido conectivo”. Actualmente LES es referida como una enfermedad heterogénea con gran variación en los síntomas y la expresión clínica, reflejando su compleja etiología (OMIM 152700). El LES es una enfermedad autoinmune multisistémica compleja que resulta de la interacción de factores ambientales, hormonales y genéticos, (Lipsky P, 2001). En los niños, la forma de presentación, la evolución clínica y los hallazgos inmunológicos se difieren muy poco de lo observado en los adultos con LES (Font et al. 1998).

LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO PEDIÁTRICO

Epidemiología

El LESp representa alrededor del 15-20% de todos los pacientes afectados con LES (Tucker et al., 1995; Font et al. 1998; Carreño et al. 1999; Boon y McCurdy, 2002; Klein-Gitelman et al. 2002). Los pacientes pediátricos tienden a morir durante la fase aguda de la enfermedad mientras que los pacientes adultos mueren debido a complicaciones, tales como la falla renal, infecciones e infarto al miocardio (Benseler et al. 2005).

El LESp es más común en el sexo femenino que en el masculino, con una relación femenino:masculino anterior a la pubertad de 3:1 y después de la pubertad la relación llega a ser 9:1. (Lo et al. 1999; Brunner et al. 2002; Benseler et al. 2005). La incidencia de la enfermedad varía en los diferentes grupos étnicos. En mujeres caucásicas la incidencia de LES con inicio antes de los 19 años de edad es entre 6 y 18.9 casos/100.000, mientras que en mujeres afroamericanas es de 20-30/100.000 y en mujeres nativas de Puerto Rico es de 16-36.7/100.000 (Jiménez et al. 2003). El diagnóstico del LES no es común antes de los 10 años de edad y la edad promedio de presentación es 12.1 años (Lo et al. 1999; Brunner et al. 2002; Benseler et al. 2005).

Las secuelas y la mortalidad del LESp se asocian con varios factores de riesgo: edad temprana al diagnóstico, sexo masculino y raza no caucásica (afroamericana, asiática e hispana) (Swaak et al. 1989; Lehman et al. 1989; Carreño et al. 1999). En la población afroamericana la afección renal y neuropsiquiátrica tiene tendencia a ser más grave (Vyas et al. 2002). Aunque el pronóstico para el inicio del LESp está relacionado con la gravedad de la enfermedad en la presentación (Abeles et al. 1980). Los más grandes riesgos para la morbilidad y mortalidad sigue siendo el retraso en el diagnóstico y tratamiento (Lehman et al. 1990; Wallace et al. 1981).

A pesar de la similitud en las opciones diagnósticas y terapéuticas en niños y adultos, existen aspectos especiales que se deben considerar en niños y adolescentes con LES; el LES pediátrico (LESp) interfiere de forma importante en la adaptación escolar, así como en aspectos psicosociales, relacionados, entre otros,

con la apariencia física y el retraso del crecimiento en la población pediátrica (Boon y McCurdy et al. 2002; Klein-Gitelman et al. 2002).

Manifestaciones clínicas generales del LES.

Las características clínicas y la afección de los diferentes órganos varían dependiendo de la edad de presentación, el sexo y el origen étnico. En general, los niños con LES desarrollan formas más graves de la enfermedad con un curso clínico más agresivo en comparación a los adultos con LES. La tasa de afección de los diferentes órganos implicados en la enfermedad es también superior en niños con LES (Brunner et al 1999; Klein-Gitelman et al. 2002). Al inicio, el 40-90% de los niños se manifestarán con síntomas constitucionales (fiebre, cansancio o pérdida de peso), el 20-82% con afección renal, el 20-74% con síntomas músculo esqueléticos, el 22-74% con eritema malar, el 15-45% con linfadenopatías y el 15-74% con visceromegalia (Bader-Meunier et al 2003; -2005).

Manifestaciones cutáneas

Se han descrito diversas manifestaciones cutáneas en niños durante la evolución de la enfermedad, siendo las mas comunes: úlceras orales (26-48%), erupción vasculítica (10-52%), fotosensibilidad (16-50%) y lesiones discoides (5-19%) (Wananukul et al. 1998).

Manifestaciones músculo esqueléticas

La artritis ocurre en más del 75% de los pacientes pediátricos con LES. Sus manifestaciones clínicas pueden ser variables, habitualmente se presenta como una poliartritis simétrica no erosiva muy dolorosa, que afecta a articulaciones grandes y pequeñas y rara vez se asocia con cambios radiológicos. Ciertamente, la artritis puede ser la única manifestación del LES y, aunque algunos pacientes son inicialmente diagnosticados de artritis juvenil según los criterios del American College of Rheumatology (ACR), posteriormente cumplen los criterios diagnósticos clínicos y serológicos de LES (Benseler et al. 2005; Klein-Gitelman et al. 2002).

Alteraciones hematológicas

Hasta el 39% de los niños con LES desarrollan alteraciones hematológicas durante el transcurso de la enfermedad, uno de los criterios diagnósticos de LES del ACR (Tan et al. 1982; Schmugge et al. 2003). La trombocitopenia autoinmune es la manifestación inicial en el 15% de los casos pediátricos, aunque puede preceder en varios años a la aparición de LES (Cervera et al. 1999). En el 27-52% de los casos pediátricos se observa leucopenia, principalmente debido a la disminución del número de linfocitos totales; la granulocitopenia también es común (Tucker et al. 1995).

Manifestaciones cardíacas

La afección cardíaca en el LESp es similar a la de adultos con LES. Las formas principales son cuatro: pericarditis (la forma más común), miocarditis, enfermedad valvular y enfermedad coronaria secundaria a arteritis coronaria o aterosclerosis (Guevara et al. 2001).

Esta afección en los pacientes con LESp se reconoce hoy en día como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en esta población. Los niños con LES presentan tasas mucho mayores de enfermedad coronaria que la población control. Este aumento en la incidencia de enfermedad coronaria se explica en parte por el incremento en los factores de riesgo cardíacos convencionales (Posadas-Romero et al. 2004).

Manifestaciones neuropsiquiátricas

Las manifestaciones neuropsiquiátricas del LES (MNP) se encuentran en el 20-45% de niños y adolescentes y constituye la tercera causa de mortalidad en esta población (Arkachaisri et al. 1999). A diferencia de otras manifestaciones de la enfermedad, existe afección del sistema nervioso central (SNC) entre el 75 y el 80% de los pacientes durante el primer año tras el diagnóstico de LESp. Las MNPs son diversas y varían desde hasta una disfunción global del SNC con parálisis y convulsiones, síntomas leves o focales como cefalea o pérdida de la memoria (Klein-Gitelman et al 2002).

Afección pulmonar

En el LESp el rango de afectación pulmonar es muy variable (5-77%) según las diferentes series publicadas hasta el momento (Trapani et al. 1998, Ciftci et al. 2004). Las formas más frecuentes de afección pulmonar incluyen pleuritis (forma más común), neumonitis, neumonía, neumotórax, enfermedad intersticial difusa, hipertensión pulmonar y hemorragia pulmonar; complicación infrecuente pero potencialmente letal.

Afección renal

La afección renal no sólo representa la primera manifestación de la enfermedad en el 60-80% de pacientes con LESp (Bogdanovic et al. 2004), sino que también determina el pronóstico de los pacientes con LES. Aproximadamente el 80% de los pacientes que desarrollan alteraciones renales presentarán las alteraciones durante el primer año de enfermedad (Bakkaloglu et al. 2001; Bogdanovic et al. 2004). Debido a que las manifestaciones clínicas no se correlacionan con los hallazgos histológicos, la biopsia renal es necesaria con el objetivo de establecer un diagnóstico preciso y decidir el tratamiento específico. En 1982, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó la nefritis lúpica en seis categorías, basándose en los hallazgos histológicos (Tan et al. 1982). La neuropatía más común en el LESp es el grado IV y es la que más comúnmente se asocia con el desarrollo de enfermedad renal terminal o mortal.

Los episodios de exacerbación de las alteraciones de la función renal son comunes durante la evolución de la nefritis lúpica y con frecuencia se detectan por aumento de la proteinuria. El pronóstico de la nefritis lúpica ha mejorado en gran medida en la última década. La tasa actual de supervivencia a los 5 años para los niños afectados varía entre el 78 y el 92% (Yang et al. 1994), y la tasa de supervivencia renal desde el momento del diagnóstico oscila entre el 44 y el 93% (Zappitelli et al. 2004).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico del LESp, está basado bajo los mismos criterios que en los adultos (Tan et al. 1982; Hochberg et al. 1997). La heterogeneidad de las manifestaciones clínicas del lupus hace que sea un reto médico para su diagnóstico, debido a que no existe un síntoma o manifestación patognomónica para el diagnóstico de la enfermedad, el ACR (American College of Rheumatology) ha establecido criterios clínicos para la evaluación inicial de los pacientes con sospecha de lupus. Los criterios creados en 1982 y actualizadas en 1997 (tabla 1), combinan 11 criterios clínicos y de laboratorio que permiten realizar el diagnóstico de Lupus cuando se cumplen al menos cuatro de los 11 criterios establecidos.

PATOGÉNESIS

La heterogeneidad de las manifestaciones clínicas en los pacientes con LES probablemente refleja la complejidad de la patogénesis de la enfermedad. Esta complejidad, sin embargo, ha comenzado a elucidarse con el descubrimiento que otras células distintas a los linfocitos están involucradas en el rompimiento de la tolerancia que dirige la autoinmunidad en LES. Aunque la patogenia del LES continúa incierta, la susceptibilidad a padecer esta enfermedad se atribuye a una combinación de factores ambientales, hormonales y genéticos.

Factores ambientales

Entre los factores ambientales asociados al desarrollo de lupus, el más conocido es la luz ultravioleta, la cual origina una erupción cutánea fotosensible que puede desencadenar una exacerbación generalizada de la enfermedad (Mageed y Prud'homme, 2003). Por otra parte cada vez existen más evidencias de que algunas infecciones, tales como la ocasionada por el virus de Epstein-Barr (VEB), podrían ser las desencadenantes iniciales de las respuestas autoinmunitarias específicas del LES. En niños y adultos con LES, se ha descrito una incidencia elevada de infección por el VEB, títulos elevados de anticuerpos anti-VEB y una carga viral elevada (James et al. 1997; Moon et al. 2004).

Tabla 1. Criterios de clasificación del Lupus Eritematoso Sistémico.

-
1. Eritema malar.

 2. Erupción discoide.

 3. Fotosensibilidad.

 4. Úlceras orales

 5. Artritis

 6. Serositis:
 - a) Pleuritis, dolor o derrame pleural.
 - b) Pericarditis

 7. Alteraciones Renales:
 - a) Proteinuria más de 0.5 g/ 24 h
 - b) Cilindros celulares: hemoglobina

 8. Afectación Neurológica:
 - a) Convulsiones
 - b) Psicosis

 9. Alteraciones hematológicas:
 - a) Anemia hemolítica
 - b) Leucopenia
 - c) Linfopenia
 - d) Trombocitopenia.

 10. Alteraciones inmunológicas:
 - a) Anticuerpos anti-ADN elevado
 - b) Anticuerpos anti-Smith
 - c) Anticuerpos anti-fosfolípidos

 11. Anticuerpos antinucleares en valores elevados.

Alteraciones inmunológicas

Se cree que una variedad de componentes del sistema inmune pueden contribuir a la aparición del LES. La función anormal de las células-T y la activación de células-B son evidentes en los pacientes con LES, resultando en el aumento del número de células productoras de anticuerpos y producción de anticuerpos, así como formación de complejos inmunes (figura 9) (Lipsky, 2001; Mok y Wong, 2003).

Linfocitos T

La linfopenia a expensas de linfocitos T es una característica del LES: varios estudios demuestran la reducción de los linfocitos T CD8+, mientras que otros estudios describen una reducción en linfocitos T CD4+. También se han descrito defectos funcionales, como una disminución de la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ y una menor capacidad de controlar la producción de autoanticuerpos por los linfocitos B, (Kyttaris y Tsokos, 2004; Mageed y Prud'homme, 2003).

Linfocitos B y autoanticuerpos

El factor común de las anomalías inmunes en el LES es la hiperactividad de los linfocitos B, con la consecuente producción de autoanticuerpos. Se piensa que estos anticuerpos son la consecuencia tanto de una activación policlonal de células B como de una síntesis incrementada como respuesta a antígenos. Las razones que teóricamente pueden explicar la hiperactividad de las células B son: a) un trastorno intrínseco de los linfocitos B; b) aumento en la función de los linfocitos T cooperadores y c) deficiente función de los linfocitos T supresores.

De los modelos murinos se desprende que la multiplicidad de autoanticuerpos refleja más un trastorno en la inducción y/o el mantenimiento de la autotolerancia que un defecto intrínseco de los linfocitos B o una hiperfunción primaria de los linfocitos T cooperadores. En cualquier caso, en el LES encontramos una síntesis aumentada de inmunoglobulinas y anticuerpos, incluso contra antígenos propios.

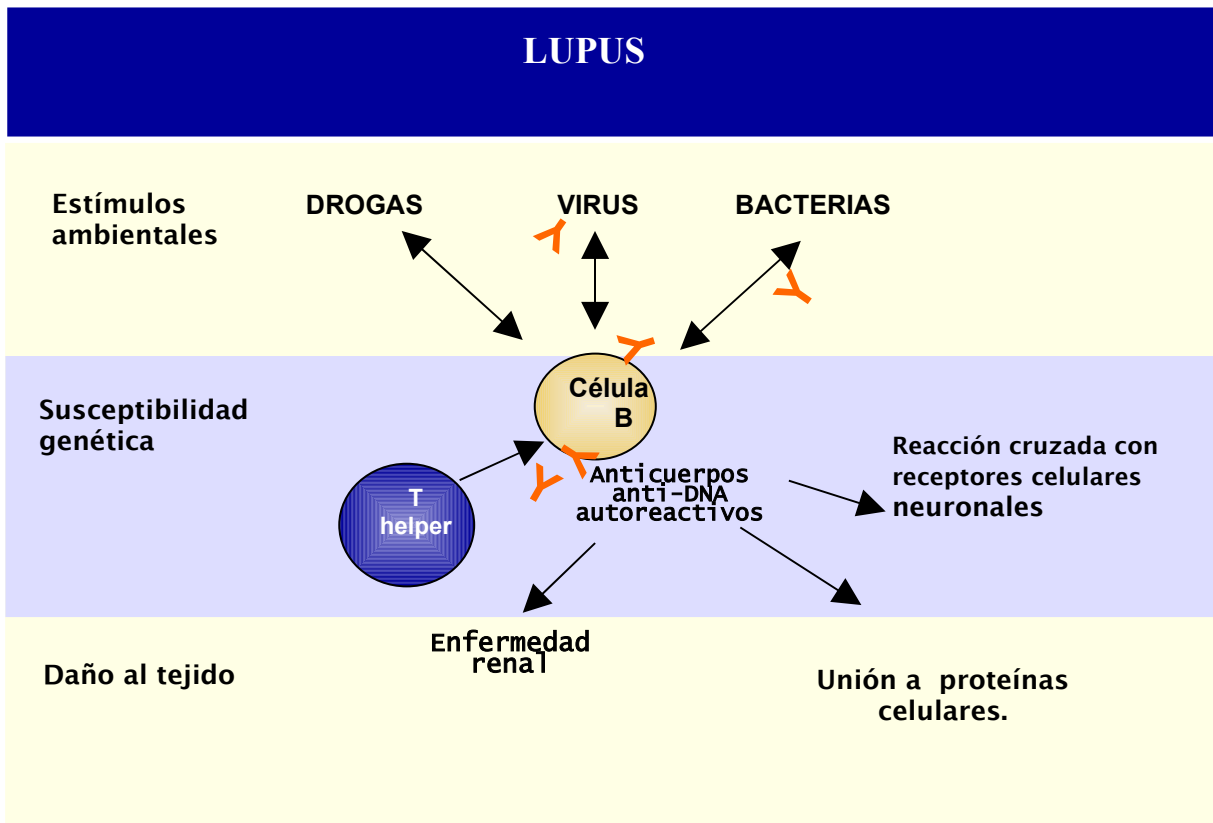


Figura 9. Patogénesis del LES. Se reconocen dos mecanismos claves, la función anormal de las células-T y la activación de células-B, conduciendo a la producción de auto anticuerpos, (Tomado y modificado de Marshall E. 2002).

El desarrollo de algunos de los autoanticuerpos, como los anticuerpos anti-DNA de doble cadena, se correlaciona estrechamente con el inicio de la enfermedad (Kyttaris y Tsokos, 2004), mientras que otros anticuerpos, como los antifosfolípidos (AAF) y anti-Ro, pueden ser detectados meses o años antes de la presentación de síntomas clínicos de LES (Arbuckle et al. 2003).

Estudios genéticos en individuos sanos han demostrado que los linfocitos B en la médula ósea y los recientemente emigrados a sangre periférica expresan anticuerpos auto reactivos. Sin embargo, la mayoría de los linfocitos B auto reactivos son eliminados del repertorio de linfocitos B *naive* maduros en dos estadios de su desarrollo (Wardemann et al. 2003). Estos puntos de control son defectuosos en los pacientes con LES. El 25-50% de los linfocitos B *naive* de pacientes con LES producen anticuerpos auto reactivos aún antes de su participación en la respuesta inmunológica contra antígenos externos, comparado con sólo un 5-20% en la población control (Yurasov et al. 2005).

Células dendríticas

Se ha observado que los pacientes producen un exceso de interferón alfa (IFN- α), el cual induce la diferenciación de monocitos CD14+ de sangre periférica en células dendríticas maduras capaces de capturar células apoptóticas y presentar sus antígenos a linfocitos T y B auto reactivos, lo que da lugar a una alteración en la tolerancia hacia estos antígenos (Blanco et al. 2001; Bennett et al. 2003). A pesar de que solamente una fracción de los pacientes con enfermedad activa presentan valores elevados de IFN- α circulante, recientes análisis sobre la expresión global de genes (*microarreglos*) han demostrado la presencia de genes inducidos por el IFN- α en las células sanguíneas mononucleares de los pacientes con LESp (Bennett et al. 2003).

Apoptosis

Una característica común de los autoantígenos del LES es que están expuestos en la superficie de las células apoptóticas (Casciola-Rosen et al. 1994),

donde pueden ser detectados por el sistema inmune. Existen evidencias recientes de que los cuerpos apoptóticos son eliminados en condiciones normales por las células dendríticas inmaduras y presentados para inducir tolerancia en linfocitos T (Steinman et al. 2003). La deficiente eliminación de células apoptóticas podría proporcionar una carga excesiva de antígenos nucleares a las células dendríticas maduras, extremadamente inmunogénicas y como consecuencia estos antígenos serían presentados a los linfocitos T, facilitando la pérdida de tolerancia y el desarrollo de LES. Otros factores vinculados a la patogénesis del LES y que podrían ejercer un efecto sobre la apoptosis están representados por los estrógenos, la radiación ultravioleta y las infecciones.

Factores genéticos

Los datos epidemiológicos, la fuerte agregación familiar del LES (10-16%) y la tasa de concordancia de la enfermedad en gemelos sugieren la existencia de factores genéticos que predisponen al desarrollo de LES. Los hermanos de pacientes con LES tienen un riesgo relativo aumentado de desarrollar la enfermedad comparado con la población general ($\lambda_{\text{familia}}=25$) (Hochberg MC, 1987) y los gemelos monocigóticos tienen un aumento en la concordancia (24-57%) comparado con gemelos dicigóticos y otros hermanos (2-5%) (Deapen et al. 1992). Aún más, la heredabilidad (fracción de la enfermedad que puede ser atribuida a los genes), estimada para esta entidad es del 66% (Tsao BP, 2002). A través de estudios genéticos y de asociación, más de 80 loci se han asociado con la patogenia del LES y se han sugerido varios genes candidato involucrados en el desarrollo de la enfermedad, tales como los receptores Fc-gama y el antígeno Leucocitario Humano (HLA) (Sestak et al. 2005).

ESTUDIOS DE LIGAMIENTO EN LES

Hasta la fecha, el análisis del genoma en varias enfermedades ha revelado varios loci de susceptibilidad, pero hasta ahora no muchos genes candidato han sido propuestos. Por otro lado, también ha sido difícil confirmar los estudios que revelan los loci de susceptibilidad y ha habido resultados poco alentadores derivados de estudios en otras enfermedades autoinmunes, tales como la Esclerosis Múltiple y la Diabetes Mellitus.

Sin embargo, existen algunos hechos prometedores concernientes a la búsqueda de genes de susceptibilidad para LES. Primero, en los análisis del genoma iniciales varios loci muestran ligamiento significativo, indicando que existen al menos algunos genes con un impacto en la susceptibilidad a la enfermedad que serian posible detectarlos, usando una estrategia de análisis de ligamiento. Segundo, varios loci de susceptibilidad en humanos son homólogos a regiones encontradas en modelos de ratón para LES, aunque los genes que confieren el riesgo en humanos, pueden no ser los mismos en el ratón. Tercero, en LES la región del MHC ha mostrado un efecto similar a otros loci de susceptibilidad, a diferencia de otras enfermedades autoinmunes, donde éste se encuentra fuertemente asociado de tal manera que opaca las señales de otros loci.

En los últimos años se han realizado, varios análisis del genoma completo en LES (Moser et al., 1998; Tsao et al. 1997; Shai et al. 1999; Gaffney et al. 2000; Lindqvist et al. 2000) y se han identificado alrededor de 60 loci potenciales de susceptibilidad. Las estrategias y diseños de estudios pueden variar así como el origen étnico de las familias involucrados en los estudios (Wong y Tsao, 2006). De todos los loci identificados, sólo ocho muestran un LOD score >3.3 y han sido confirmados independientemente (Harley et al. 2006, Sestack et al 2007) (Tabla 2).

Tabla 2. Estudios de ligamiento en LES .

| Localización | LOD score | Población^a | Gen candidato^b |
|---------------------|------------------|------------------------------|----------------------------------|
| 1q23 | 4.0 | AA y E | <i>FCGR2A/3A</i> |
| 1q31-32 | 3.8 | E y HI | ? |
| 1q41-42 | 3.3 | E, AA y OR | <i>PARP, TLR5</i> |
| 2q37 | 4.2 | E y HI | <i>PDCD1</i> |
| 4p16 | 3.8 | E | ? |
| 6p21-p12 | 4.2 | E | <i>HLA-DR</i> |
| 11p13 | 3.4 | AA | ? |
| 12q24 | 3.3 | HI | ? |
| 16q12-13 | 3.4 | EA | <i>NOD2/CARD15/OAZ</i> |

^a Las poblaciones estudiadas son derivadas de Europeos (E), Afro-americanos (AA), Asiáticos del Este (OR) e Hispanos (HI).

^b El signo “?” indica que no existe un fuerte gen candidato para el efecto genético en el intervalo de ligamiento.

GENES CANDIDATO EN LES

Durante la última década se han propuesto varios genes candidato para LES, debido a su participación en los procesos inmunológicos y/o por su posición en la regiones de susceptibilidad ligadas para LES. Los resultados de diferentes estudios de asociación sugieren una extensa heterogeneidad genética y una posible interacción epistática entre los múltiples genes involucrados en la susceptibilidad de la enfermedad.

Aunque se ha reportado que algunos genes juegan un papel en la susceptibilidad al LES en múltiples estudios y en más de una población, estos genes no siempre han sido replicados en otras poblaciones. De hecho, aun dentro del mismo grupo étnico los resultados han sido discordantes. La disparidad en estos resultados puede ser en parte atribuida a factores confusores tales como la estratificación de la población, ausencia de controles apropiados, tamaños de muestra pequeños y la presencia de genes que brindan sólo contribuciones genéticas menores.

Actualmente, se han reportado 115 loci genéticos asociados con LES, sin embargo, existen reportes contradictorios para 56 de éstos. Desde luego, muchos de estos reportes contradictorios fueron realizados en pacientes de grupos étnicos diferentes, lo que significa que ambos informes pueden ser correctos y solamente pueden indicar la especificidad étnica para un gen. Existen también 71 genes reportados para los cuales sólo un estudio se ha publicado hasta la fecha. Dentro de éstos, 39 análisis son positivos y 32 son negativos, es decir, existen tanto asociaciones fuertes en cohortes grandes (que son generalmente más fiables) como débiles en poblaciones pequeñas aisladas. Por lo anterior, se requiere confirmar cuáles de estas asociaciones son consistentes y para ello debe considerarse el tamaño de la muestra, el origen étnico y número de SNPs estudiados. Se cree actualmente que de 20-40 genes tienen variantes que juegan un papel en el riesgo de LES. Por consiguiente, aunque la mayoría de los factores de riesgo genético para LES pueden estar en esta lista de los 115 loci mencionados, todavía no se sabe cuáles son realmente importantes.

No obstante, existen varias asociaciones fuertes que incluyen componentes de la cascada del complemento, los receptores *FCGRs*, genes en la región del HLA y varios genes que se han implicado en la regulación inmune, como se enlista en la tabla 3. Sin embargo, estos genes no son suficientes ni necesarios para explicar la susceptibilidad al LES, por lo que se requiere de estudios adicionales para sustentar su implicación en el desarrollo de esta patología (Sestak et al. 2007).

Tabla 3. Genes candidato en LES.

| Gen | Localización cromosómica | OR | Población |
|----------------------|---------------------------------|-----------|--------------------------------------|
| <i>PTPN22</i> | 1p13 | ~1.6 | Europeos |
| <i>FCGR2A, R131</i> | 1q23 | ~1.3 | Afro-americanos, Europeos |
| <i>FCGR3A, F176</i> | 1q23 | ~1.6 | Europeos, Coreanos |
| <i>FCRL3</i> | 1q23 | 1.3 | Asiáticos, Españoles |
| <i>IL10</i> | 1q32 | 1.4 | Europeos, Asiáticos. |
| <i>CTLA4 +49G</i> | 2q33.2 | 1.3 | Europeos, Asiáticos |
| <i>PDCD1</i> | 2q37 | 2.6 | Europeos, Asiáticos |
| <i>DR3</i> | 6p21 | ~3 | Europeos, Afro-americanos, Hispanos |
| <i>DR2</i> | 6p21 | 1.5-4 | Europeos, Asiáticos, Afro-americanos |
| <i>TNF-alfa -308</i> | 6p21 | 4 | Europeos, Asiáticos, Afro-americanos |
| <i>IRF5</i> | 7q32 | 1.6 | Nórdicos, Europeos, Hispanos |
| <i>MBL</i> | 10q22 | 1.4 | Europeos, Asiáticos, Afro-americanos |
| <i>TYK2</i> | 19p13 | 1.6 | Nórdicos, Europeos. |

OR=Odds ratio: riesgo relativo.

JUSTIFICACIÓN

El LES es el prototipo de las enfermedades autoinmunes, cuyo costo socio-económico hace indispensable conocer los factores que participan en su etiología para entender su patogénesis y mejorar las estrategias preventivas, de diagnóstico y de tratamiento. En esta enfermedad genética compleja se encuentran involucrados múltiples genes y sus variantes y se manifiesta con un amplio intervalo de fenotipos.

Aunado a esto, el gran número de genes que ha mostrado un posible papel en la etiopatogenia del LES del adulto, apoya la hipótesis de que en este padecimiento existe una gran heterogeneidad genética y que esta varía entre los diferentes grupos étnicos, por lo que los genes candidatos deben ser estudiados con detalle en cada una de las poblaciones. Por otra parte, es posible que el componente genético sea mayor en aquellos individuos donde la enfermedad se manifiesta a una edad más temprana, por lo que la población pediátrica puede representar la muestra ideal para el estudio de los factores genéticos implicados en LES. A la fecha existen sólo dos estudios en niños para identificar genes de susceptibilidad para LES y los resultados son contradictorios.

En esta tesis, se identificaron polimorfismos asociados con la susceptibilidad al desarrollo del LES en población pediátrica mexicana, en genes que han mostrado asociación en otras poblaciones afectadas con LES y/o en regiones que han mostrado ligamiento con LES humano. Los resultados generados nos permitirán contribuir al conocimiento de los factores genéticos involucrados en la etiopatogenia de esta enfermedad, tendrán aplicación potencial en la prevención, diagnóstico y tratamiento del LES y sentarán las bases para el estudio de otras entidades multifactoriales comunes en nuestro medio.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en genes candidatos se encuentran asociados a la susceptibilidad para desarrollar LES en pacientes pediátricos mexicanos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar la frecuencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en genes candidatos, en una muestra de individuos sanos y en pacientes con LES.
2. Determinar si polimorfismos localizados en genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria se encuentran asociados a la susceptibilidad para desarrollar LES en pacientes pediátricos.
3. Determinar si existen diferencias entre los polimorfismos asociados a LES en otras poblaciones con los encontrados en el presente estudio.
4. Establecer si existe correlación entre los polimorfismos estudiados y las manifestaciones clínicas.

HIPÓTESIS

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en genes candidatos involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria, se encuentran asociados a la gravedad y susceptibilidad para desarrollar LES en pacientes pediátricos mexicanos.

CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Estudio multicéntrico de casos y controles, transversal, prospectivo y comparativo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

Criterios de inclusión.

Se incluyeron en el estudio pacientes mexicanos con diagnóstico de LES de inicio antes de los 16 años de edad, que cumplieron con al menos 4 de los 11 criterios de la clasificación establecida por la ACR [Tan y cols., 1982, Hochberg MC, 1997]. Las muestras fueron obtenidas de los pacientes y de los familiares que aceptaron firmar la carta de consentimiento informado (anexo 1).

Se incluyeron también controles sanos sin antecedentes de enfermedades autoinmunes (determinado mediante la aplicación de un cuestionario), pareados por origen geográfico. Todos los individuos fueron mestizos-mexicanos. Se consideraron como mestizos-mexicanos, aquellos individuos quienes sus dos últimas generaciones nacieron en México y que no refirieron antecedentes extranjeros. Dado que el genoma no cambia con la edad, se seleccionaron como controles individuos mayores de 18 años para asegurar que no hayan desarrollado LES durante la infancia.

Criterios de exclusión

Pacientes con cualquier otra enfermedad crónica concomitante.

Se excluyeron en forma temporal a los pacientes transfundidos en los últimos tres meses.

Cálculo del tamaño de la muestra.

Para el cálculo de la muestra se tomó en consideración:

- Las frecuencias alélicas previamente reportadas de los SNPs en los genes seleccionados.
- El valor de la prevalencia de la enfermedad en la población (K_p), debido a que no existen datos de prevalencia de LES en la población mexicana, se tomó el valor reportado en la población brasileña que es del 0.01%, que es una de las más bajas reportadas a nivel mundial (Senna et al. 2004).

- El poder deseado es del 80% con un nivel de significancia de 0.05, con una hipótesis alternativa de 2-colas.
- Se utilizó un intervalo de valores de riesgo relativo, que abarca los descritos para los SNP a analizar, para detectar o descartar una asociación con los mismos odds ratios detectada en estudios previos (odds ratio de 1.5 a 3.0).
- Se utilizó un límite de confianza del 95% (1-alfa= 95%), en el contexto de estimar un rango de valores (calculado en la muestra) en el cual se encuentra el verdadero valor del parámetro, con una probabilidad determinada.
- El cálculo de la muestra se realizó con el programa QUANTO v1.0 <http://hydra.usc.edu/gxe>; el cálculo da un valor de 192 pacientes y 192 controles, para el estudio.

Muestras

A todos los pacientes, a sus padres y a los controles se les extrajo de 5-10 ml de sangre periférica usando EDTA como anticoagulante.

ANALISIS MOLECULAR

Extracción de DNA

La extracción del DNA genómico se realizó a partir de leucocitos de sangre periférica utilizando la técnica convencional de fenol-cloroformo y precipitación con etanol (Blin y cols, 1976). Alternativamente la extracción del DNA se realizó utilizando el Kit PUREGENE (Gentra Systems, USA) o el Kit QIAamp DNA Blood Midi/Maxi (QIAGEN, USA). La integridad del DNA fue verificada en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría, en un Equipo Nano Drop ND-1000 (Nano Drop, USA).

Genotipificación de SNPs en genes candidatos

Se seleccionaron al menos 20 SNPs que mostraron asociación en otras poblaciones afectadas con LES. Estos SNPs han sido descritos en genes candidato contenidos principalmente en las regiones que han mostrado ligamiento con LES en el humano (tabla 4). Los SNPs fueron caracterizados por el método fluorescente de 5' exonucleasa (Taqman) [Holland et al. 1991].

Método fluorescente de 5' exonucleasa (TaqMan)

Para cada ensayo de discriminación alélica se diseñaron 2 sondas específicas marcadas en el extremo 5' con fluorocromos diferentes, VIC para el alelo 1 y FAM para el alelo 2, además ambas sondas contenían en el extremo 3' un "quencher" (TAMRA) el cual mientras la sonda permanece intacta, inhibe la emisión de fluorescencia. Durante la reacción de PCR los primers hibridan con una secuencia específica del templado de DNA. Si éste contiene la secuencia polimórfica, la sonda de TaqMan también híbrida con su secuencia homóloga. Durante la PCR, la AmpliTaq Gold, que tiene actividad tanto de DNA polimerasa como de exonucleasa 5'-3', es capaz de digerir la sonda marcada durante la amplificación y liberar el colorante fluorescente de la acción del "quencher", de tal manera que dadas las condiciones de astringencia utilizada durante la reacción, sólo la sonda específica para el polimorfismo presente será capaz de hibridar. Por lo tanto, fue posible diferenciar un alelo del otro con base en el tipo de fluorescencia emitida.

Diseño de oligonucleótidos y sondas específicas.

Los oligonucleótidos y las sondas fueron diseñadas con el software Primer Express v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Análisis de secuenciación

Para validar el análisis de discriminación alélica, se secuenciaron al azar pacientes y controles con un genotipo determinado, en un secuenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems, Foster city, CA).

Tabla 4. SNPs analizados en este estudio.

| Gen | Localización | SNP |
|--------------------------------|---------------------|--|
| <i>PTPN22</i> | 1p13.3-p13.1 | 1858C/T |
| <i>FCGR2A</i> | 1q23 | 131R/H |
| <i>FCGR3A</i> | 1q23 | 176 F/V |
| <i>IL-10</i> | 1q31-q32 | -1082G/A -819C/T -592C/A |
| <i>PDCD1</i> | 2q37.3 | PD1.1G/A PD1.3G/A PD1.5C/T PD1.6G/A |
| <i>TNF-α</i> | 6p21.3 | -238A/G -308A/G |
| <i>IRF5</i> | 7q32 | -3835 C/A |
| <i>IL-6</i> | 7p21 | -174G/C |
| <i>RANTES</i> | 17q11.2 | -28 C/G -403 G/A |
| <i>MCP1</i> | 17q11.2 | -2518 G/A |
| <i>MIF</i> | 22q11.2 | -173 G/C |

UBICACIÓN DEL ESTUDIO.

Los pacientes fueron reclutados, en el Departamento de Reumatología e Inmunología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional S-XXI, Servicio de Inmunología del Instituto Nacional de Pediatría, Departamento de Reumatología

Pediátrica del Centro Médico “La Raza” y el Departamento de Medicina Interna del Hospital Infantil de México. El estudio molecular se realizó en el Instituto Nacional de Medicina Genómica de la Secretaría de Salud.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) fue analizado usando el programa FINETTI <http://ihg.gsg-de/cgi-bin/hw/hwa1/pl>. Las frecuencias genotípicas y alélicas de todas las variantes genéticas fueron reportadas en porcentajes. El análisis estadístico para comparar las distribuciones genotípicas y alélicas se realizó utilizando la prueba de X^2 . La razón de momios (OR) y los intervalos de confianza del 95% (CI) fueron calculados de acuerdo al método de Woolf's. El software que se utilizó fue el programa Statcalc (*Epi Info 2005; Centers for disease Control and prevention, Atlanta, Georgia, USA*) y para la validación de los resultados se utilizó el programa SISA (Simple Interactive Statistical Analysis).

Los valores de probabilidad (P) menor de 0.05 fueron considerados significativos. Los valores de P sin corregir son presentados para cada uno de los SNPs. Los SNPs fueron analizados en forma independiente y como haplotipos que fueron construidos con el programa Haploview 3.32.

El análisis de asociación en familias se analizó mediante la prueba de TDT implementado en el programa Haploview 3.32 y en aquellas familias que estaban incompletas se utilizó el programa FBAT (Family Based Association Testing Software v1.7.2)

Para el análisis de la medida de desequilibrio de ligamiento (LD) se utilizaron los dos métodos más comunes para determinar la extensión del LD: el coeficiente de Lewontin's (D) y el coeficiente de correlación (r^2), el análisis fue realizado con el algoritmo de Gabriel et al. 2002, implementado en el software Haploview 3.32.

RESULTADOS

Población de estudio.

En esta tesis se analizaron 250 pacientes con un diagnóstico clínico de LES, reclutados de cuatro hospitales pediátricos de tercer nivel del Distrito Federal. El

inicio de la enfermedad en todos los pacientes fue antes de los 16 años de edad y todos cumplieron al menos 4 de los 11 criterios establecidos por el Colegio Americano de Reumatología (Tan et al. 1982; Hochberg et al. 1997). Cada paciente fue evaluado por un médico reumatólogo, nefrólogo o inmunólogo quién llenó la hoja de captación de datos (anexo 2).

De estos, 214 pacientes fueron del sexo femenino (85.6%) y 36 fueron pacientes masculinos (14.4%), con una edad promedio del inicio de la enfermedad de 11.62 ± 2.46 años en el grupo total (figura 10). Además, se incluyeron 355 individuos adultos del banco de sangre del Instituto Nacional de Pediatría, como controles sanos mestizos-mexicanos, consistiendo de 305 mujeres sanas (86%) y 50 individuos masculinos (14%), (figura 11).

Respecto a la presentación de las manifestaciones clínicas, la edad promedio al diagnóstico de la enfermedad fue 13.2 ± 2.3 (tabla 5). La relación de géneros fue más alta en los pacientes mexicanos, con una relación 7:1 femenino:masculino, ésta relación fue más alta que lo reportado por un estudio multicéntrico francés (4.5:1) (Bader-Meunier et al. 2005). La enfermedad renal se presentó en 155 pacientes (62%), esta frecuencia también fue más alta que lo observado en el estudio francés (50%). Por otro lado, 84 pacientes de los 155 (54.1%) a los que se les realizó biopsia renal tienen la histología clase II-IV de la clasificación de la WHO, 17 (11%) fueron clasificados como clase II y sólo 4 individuos (2.6%) se clasificaron como clase V-VI. La afección al sistema nervioso central fue observado en 45 pacientes (18%) y no fue muy diferente de los observado por Bader-Meunier et al. 2005, (17%).

El análisis de asociación de los casos y controles reveló cuatro genes involucrados en el desarrollo de esta patología (*TNF- α* , *PTPN22*, *PDCD1* e *IRF5*). La mayoría de los resultados de esta tesis ya han sido publicados en revistas internacionales, los artículos se anexan la final; por lo que sólo se describen los resultados no publicados.

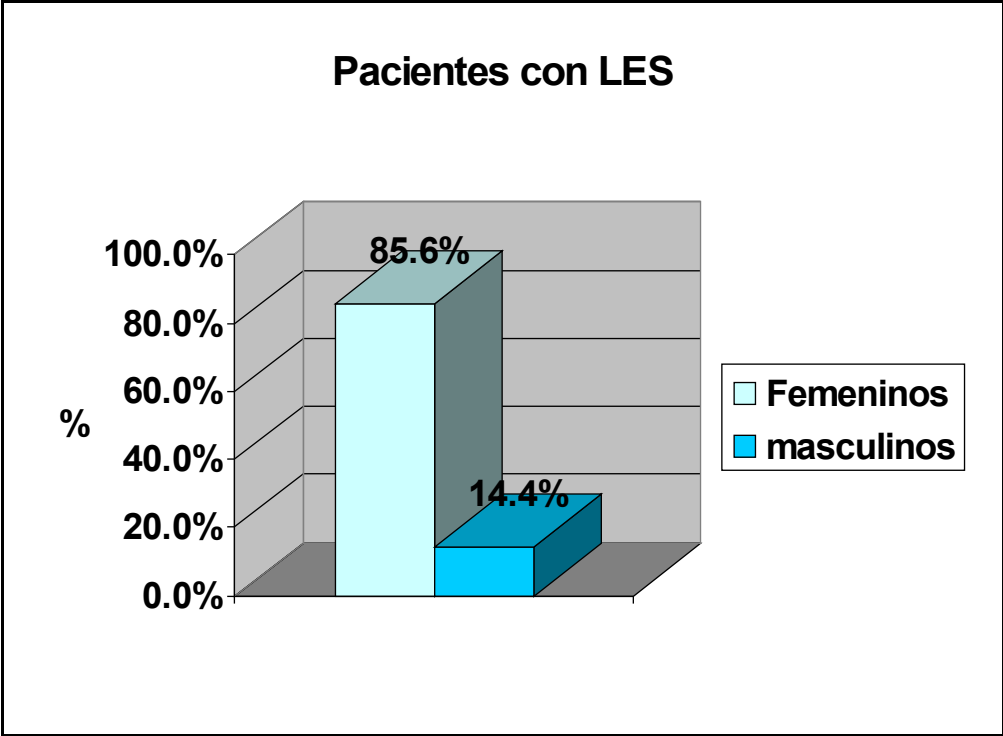


Figura 10. Distribución por género de los pacientes.

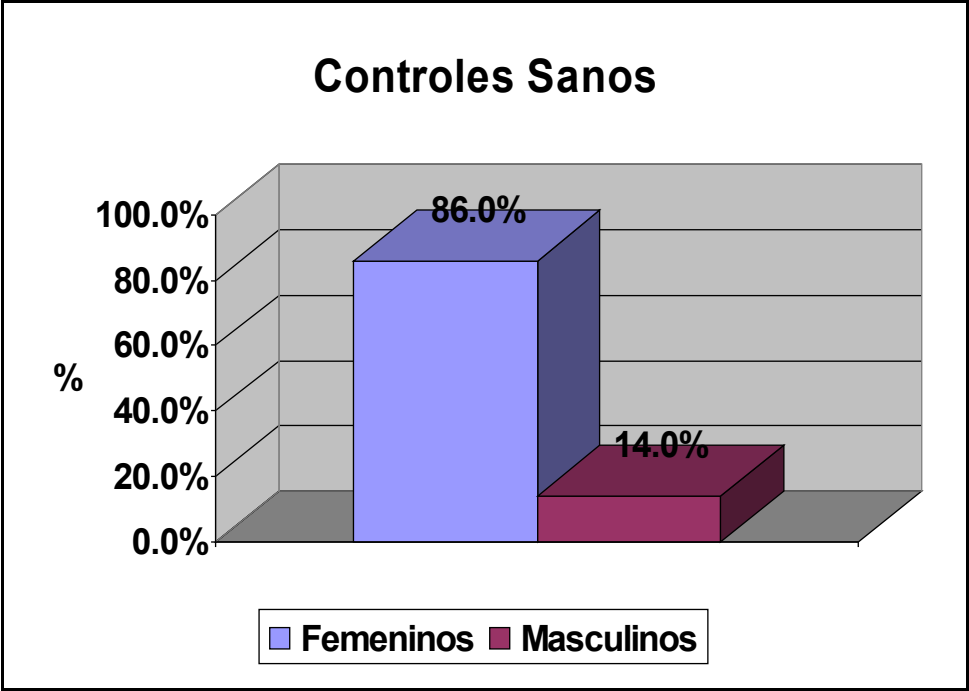


Figura 11. Distribución por género de los controles.

Tabla 5. Análisis comparativo de las manifestaciones clínicas en pacientes mexicanos y de pacientes franceses.

| | Presente estudio EMM^a | EMF^b |
|---------------------------------|---|------------------------|
| No. Pacientes | 250 | 155 |
| Edad de inicio | 11.6 ± 2.46 | 11.5 ± 2.5 |
| Edad al Diagnóstico | 13.2 ± 2.37 | ---- |
| Relación sexo | 7:1 | 4.5:1 |
| Nefritis | 62% | 50% |
| Biopsia Renal III-IV* | 54.1% | 60% |
| Sistema Nervioso Central | 18% | 17% |

^a Estudio Multicéntrico Mexicano

^b Estudio Multicéntrico Francés.

* Estadios de gravedad.

Polimorfismos del factor de necrosis tumoral-alfa (*TNF- α*).

La tabla 6 muestra la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos -308 y -238 localizados en la región del promotor del gen *TNF- α* , en pacientes pediátricos mexicanos y controles sanos.

En ambos grupos, los genotipos más comunes fueron el TNF -308G/G y el TNF -238G/G. La distribución de los genotipos reveló asociación del TNF- α con LESp, mostrando una frecuencia más alta del genotipo TNF-308 G/A en el grupo de pacientes en comparación con los controles sanos (12.8% versus 5.0%, $P=0.00021$; OR=2.96 CI=1.65-5.31) y una mayor frecuencia del alelo TNF-308A en el grupo de pacientes (6.7% versus 2.4%, $P=0.00013$; OR=2.96 CI=1.65-5.31). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo TNF-238, cuando comparamos el grupo de pacientes con los controles sanos. Cuando estratificamos la muestra por sexo observamos un ligero incremento en la frecuencia del alelo TNF-308A en el grupo de pacientes femeninos comparado con el grupo control ($P= 0.0001$; OR=3.30; CI=1.74-6.37), (datos no mostrados).

Estos resultados difieren de un estudio previo realizado en pacientes adultos mexicanos, donde Zuñiga et al. (2005) muestran evidencias de que el alelo TNF-238A se encuentra asociado con LES en los pacientes adultos. Un punto a resaltar, es que las frecuencias observadas en los pacientes adultos para el alelo TNF-308A no difieren significativamente de lo observado en este estudio, tanto en casos (pediátricos 6.7% versus adultos 7.8%), como en controles (2.4 versus 2.7%).

Tabla 6. Distribución de los genotipos y alelos de los SNPs localizados en el promotor del gen *TNF- α* .

| SNP TNF-308 | LES (n=327/654) | CONTROLES (n=337/674) | | P | OR (95% CI) |
|------------------------|----------------------------|----------------------------------|--------------|----------|--------------------|
| GG | 284 (86.8) | 321 (95.0) | GG vs GA | 0.00021 | 2.96 (1.65-5.31) |
| GA | 42 (12.8) | 16 (5.0) | GG vs AA | NS | NS |
| AA | 1 (0.4) | 0 (0) | GG vs GA +AA | 0.00014 | 3.03 (1.67-5.51) |
| G | 610 (93.3) | 658 (97.6) | | | |
| A | 44 (6.7) | 16 (2.4) | | 0.00013 | 2.96 (1.65-5.31) |
| TNF-238 | (n=328/656) | (345/690) | | | |
| GG | 297 (90.5) | 313 (90.7) | GG vs GA | 0.94 | ND |
| GA | 30 (9.1) | 31 (8.9) | GG vs AA | 0.97 | ND |
| AA | 1 (0.4) | 1 (0.4) | GG vs GA +AA | 0.93 | ND |
| G | 624 (95) | 657 (95.2) | | | |
| A | 32 (5.0) | 33 (4.8) | | 0.93 | 1.02 (0.62-1.68) |

ND- no determinado

NS- no significativo

Asociación del gen de la proteína tirosina fosfatasa 22 (*PTPN22*).

Artículo 1: Baca V, Velázquez-Cruz R, et al. Association analysis of the *PTPN22* gene in childhood-onset systemic lupus erythematosus in Mexican population. *Genes and Immunity* 2006; 7: 693– 695.

Un hallazgo interesante que se describe en el artículo 1, es que la frecuencia del alelo *PTPN22* 1858T en nuestro grupo de pacientes fue significativamente más baja (3.4%) que lo reportado en pacientes españoles (Orozco et al. 2005), suecos (Reddy et al. 2005), colombianos (Gómez et al. 2005) y europeo-americanos con LES (Kiogoku et al. 2004), (rango: 9.8-16.5%). Sin embargo, la asociación del alelo T con la susceptibilidad al LES de inicio temprano en pacientes mexicanos fue más fuerte (OR 3.09, 95% CI 1.32-7.21) que lo reportado en estudios anteriores que incluyeron principalmente pacientes adultos con LES (ORs en un intervalo de 1.42 a 2.56) (figura 12) (Ye et al. 2007).

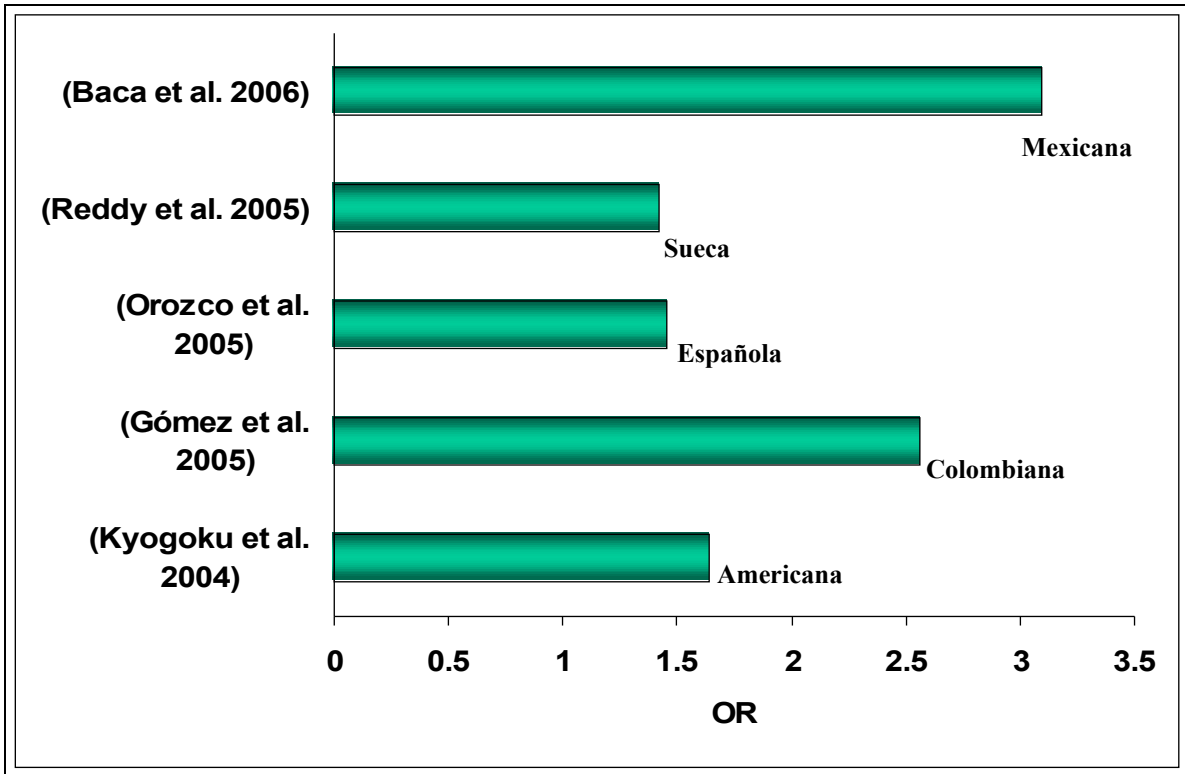


Figura 12: Comparación de los ORs para el SNP 1858C/T del gen *PTPN22*, en poblaciones con LES. Como se puede observar, el OR más alto reportado hasta la fecha con LES, es de la población pediátrica mexicana.

Análisis de los polimorfismos del gen 1 de muerte celular programada (PDCD1).

Artículo 2: Velázquez-Cruz R, Orozco L, et al. Association of *PDCD1* polymorphisms with childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet.* 2007; 15:336-41.

En el artículo 2 se describe un estudio de asociación basado en casos y controles realizado en una cohorte de 250 niños con LES; donde se analizaron los SNPs previamente descritos por Prokunina et al. 2002. Sólo el SNP PD1.3A, mostró asociación significativa con la enfermedad. La frecuencia del alelo PD1.3A fue de 5.2% en los pacientes con LES mientras que en controles fue del 2% ($P=0.0019$, OR, 2.73, 95% CI 1.41–5.28). La frecuencia observada en nuestra población es la más baja reportada hasta la fecha para este SNP, (Prokunina et al. 2002; Ferreiros-Vidal et al. 2004 Nielsen et al. 2004; Johansson et al. 2005; Ferreiros-Vidal et al. 2005), (figura 13).

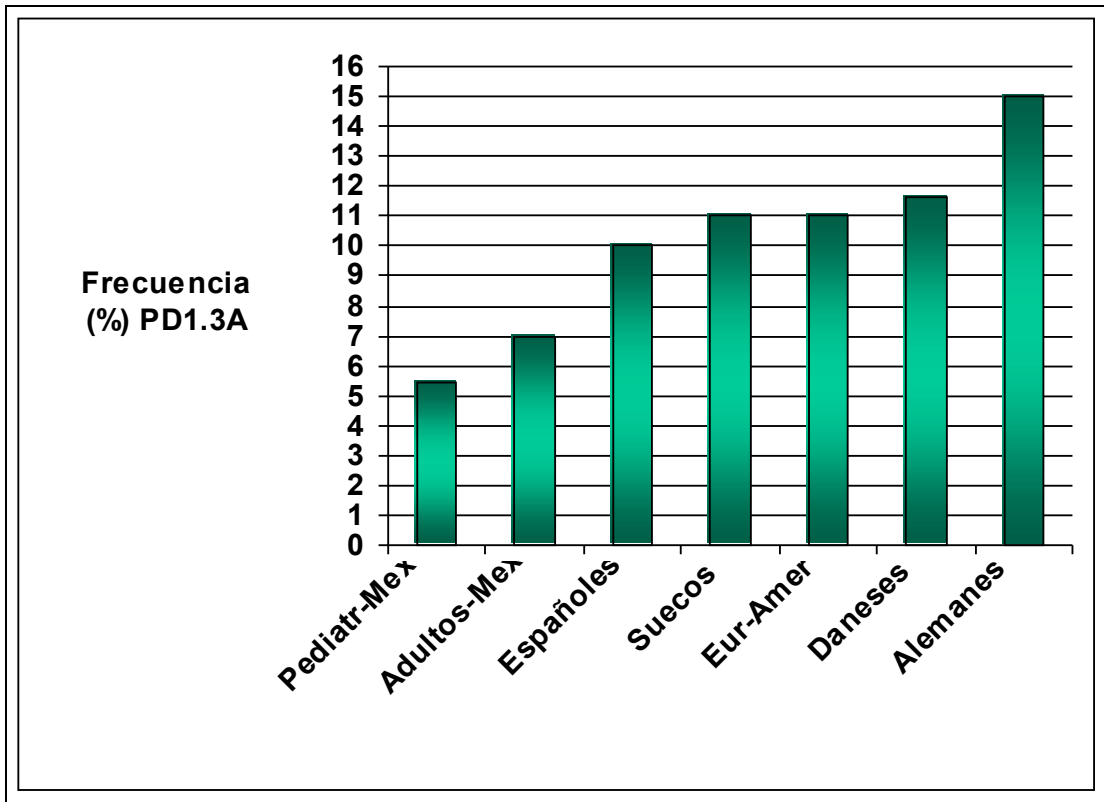


Figura 13. Distribución de las frecuencias del SNP PD1.3A del gen *PDCD1* en pacientes con LES. Este es el único estudio reportado en niños, como se puede observar la frecuencia de la población pediátrica es de las más bajas reportadas.

Análisis del gen del factor regulador del interferon 5 (*IRF5*).

Artículo 3: Reddy PL, Velázquez-Cruz R, Baca V, et al. Genetic Association of *IRF5* with SLE in Mexicans: High Frequency of the Risk Haplotype and its Homozygosity than Europeans. *Human Genetics* 2007; 121:721-27.

En el artículo 3, se describen los resultados obtenidos del análisis de asociación del gen *IRF5* con pacientes mexicanos con LES tanto adultos como pediátricos y se describen los datos por separado de ambos grupos. Se ha descrito que los pacientes mexicanos afectados con LES tienen una enfermedad más grave, con una alta frecuencia de recaídas y una edad de inicio más temprana que las mujeres europeas (Calvo-Alen et al. 2003; Pons-Estel. 2004). Dado lo anterior, en esta tesis se analizó un grupo de casos y controles de la población mestiza-mexicana combinado con un estudio de asociación basado en familias (tríos de pacientes pediátricos y adultos), para los SNPs funcionales descritos en el gen *IRF5* (Graham et al. 2006, Kozyrev et al. 2007).

En un primer análisis se compararon las frecuencias entre los controles europeos y mexicanos así como con un grupo de mazatecos. Las frecuencias de los alelos de riesgo para los SNPs rs2004640 y rs10954213 fueron significativamente más bajas en mexicanos comparados con los controles europeos ($P=0.0008$ y $P=0.00003$, respectivamente), mientras que para el SNP rs2070197, fueron significativamente más altas ($P=1.76 \times 10^{-11}$) (datos no mostrados). Las frecuencias de los alelos de riesgo del rs2004640 fueron similares entre grupos mientras que la frecuencia del rs10954213 fue más baja en el grupo de mazatecos. Interesantemente la del alelo de riesgo del rs2070197 fue significativamente más alta en los mazatecos, que la observada en los controles europeos y mexicanos (tabla 7).

Tabla 7. Frecuencias alélicas de los SNPs del gen *IRF5* en población Europea, Mestizos-Mexicanos e Indios Mexicanos Mazatecos.

| SNP | Alelo de Riesgo | Frecuencia Europeos | Frecuencia Mexicanos | Frecuencia Mazatecos |
|---------------------------|------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| rs2004640 | T | 0.51 | 0.428 | 0.44 |
| rs2070197 | C | 0.09 | 0.201 | 0.31 |
| rs10954213 | A | 0.60 | 0.511 | 0.38 |
| Genotipo de Riesgo | | | | |
| rs2004640 | TT | 0.26 | 0.198 | 0.183 |
| rs2070197 | CC | 0.007 | 0.04 | 0.065 |
| | TC | 0.179 | 0.323 | 0.483 |
| rs10954213 | AA | 0.38 | 0.248 | 0.182 |
| Haplotipo | | | | |
| | TCA | 0.102 | 0.200 | |
| | GTG | 0.33 | 0.459 | |
| | GTA | 0.147 | 0.113 | |
| | TTA | 0.363 | 0.198 | |

El análisis de los casos pediátricos con LES (tabla 8) mostraron que el alelo T del rs2004640 estuvo fuertemente asociado con la enfermedad (61% en casos versus 42% en controles, $P=7.55 \times 10^{-10}$), sin embargo la asociación más fuerte fue observada con el SNP rs2070197 ($P=5.51 \times 10^{-20}$). Este SNP no es funcional, pero refleja principalmente el haplotipo de riesgo de la enfermedad y es por lo tanto, un excelente marcador. El haplotipo de riesgo tiene una frecuencia de alrededor de 15% en europeos (Kozyrev et al, 2007).

Por otra parte, en contraste a lo previamente reportado, el SNP rs10954213 estuvo fuertemente asociado con LES en el grupo de pacientes adultos ($P=3.84 \times 10^{-8}$), aunque un poco más débil que el rs2004640 y el rs2070197 (tabla 8). En general, los resultados fueron similares entre los pacientes pediátricos y adultos. La presencia del alelo de riesgo del rs2070197 tiene un OR de 3.19 (95% CI 2.50-4.08) mientras que en los europeos, éste es apenas del 1.67 (Kozyrev et al, 2007).

El haplotipo de riesgo reportado en los europeos, también fue observado en los casos adultos y pediátricos mexicanos, sin embargo el haplotipo de riesgo TCA tiene frecuencias alélicas significativamente más altas en los mexicanos que en los europeos (42% versus 15%). Además, el haplotipo opuesto GTG mostró asociación con una fuerte protección en pacientes adultos y pediátricos ($P=3.56 \times 10^{-7}$ y $P=9.3 \times 10^{-6}$, respectivamente).

Adicionalmente, para confirmar la asociación genética y las frecuencias de los haplotipos, se analizó un grupo de familias utilizando la prueba de TDT. Se incluyó un grupo independiente de pacientes adultos con LES y sus familias disponibles (58 tríos completos y 93 con sólo un pariente), así como 151 familias con pacientes pediátricos. Los resultados del análisis confirmaron la asociación genética y la presencia del mismo haplotipo de riesgo en las familias de los casos pediátricos y adultos con LES, aunque debido al bajo poder estadístico de la prueba (dado por el tamaño pequeño de la muestra), la asociación genética fue un poco más débil (tabla 9). Lo anterior, confirma que la asociación genética y las frecuencias más altas de los alelos de riesgo observadas en el estudio de casos y controles, no son debidas a la estratificación de la población.

Tabla 8. Frecuencias alélicas y de haplotipos del gen *IRF5* de pacientes con LES y controles sanos mexicanos.

| SNP | Alelo de riesgo | Frecuencia Adultos LES | Frecuencia Controles | Chi Square | Valor P |
|------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------------|
| rs2004640 | T | 0.632 | 0.428 | 37.1316 | 1.0x10 ⁻⁹ |
| rs2070197 | C | 0.427 | 0.201 | 54.733 | 1.38x10 ⁻¹³ |
| rs10954213 | A | 0.693 | 0.511 | 30.224 | 3.84x10 ⁻⁸ |
| Haplotipo | | | | | |
| TCA | | 0.423 | 0.200 | 54.097 | 1.908x10 ⁻¹³ |
| GTG | | 0.293 | 0.459 | 25.915 | 3.567x10 ⁻⁷ |
| GTA | | 0.071 | 0.113 | 4.474 | 0.03 |
| TTA | | 0.194 | 0.198 | 0.015 | 0.9011 |
| TTG | | 0.015 | 0.027 | 1.647 | 0.1994 |
| SNP | Alelo de riesgo | Frecuencia Pediátricos LES | Frecuencia Controles | Chi Square | Valor P |
| rs2004640 | T | 0.612 | 0.428 | 37.873 | 7.55x10 ⁻¹⁰ |
| rs2070197 | C | 0.459 | 0.201 | 83.784 | 5.51x10 ⁻²⁰ |
| rs10954213 | A | 0.652 | 0.511 | 22.748 | 1.84x10 ⁻⁶ |
| Haplotipo | | | | | |
| TCA | | 0.448 | 0.200 | 79.292 | 5.35x10 ⁻¹⁹ |
| GTG | | 0.33 | 0.459 | 19.637 | 9.36x10 ⁻⁶ |
| GTA | | 0.055 | 0.113 | 12.594 | 0.0004 |
| TTA | | 0.143 | 0.198 | 5.896 | 0.0152 |
| TTG | | 0.015 | 0.027 | 2.044 | 0.1528 |

Tabla 9. Transmisión de los alelos y de haplotipos de los SNPs del gen *IRF5* en familias mexicanas.

| SNP | Pediátricos LES | | Chi Square | Valor <i>P</i> Haploview | Valor <i>P</i> FBAT |
|------------|-----------------|------|------------|--------------------------|---------------------|
| | T | U | | | |
| rs2004640 | 88 | 57 | 6.628 | 0.01 | 0.01 |
| rs2070197 | 99 | 54 | 13.235 | 0.0003 | 0.0002 |
| rs10954213 | 80 | 60 | 2.857 | 0.091 | 0.10 |
| Haplotipo | | | | | |
| TCA | 99 | 47.1 | 18.458 | 1.7x10 ⁻⁵ | 0.000084 |
| GTG | 58.8 | 77.5 | 2.551 | 0.11 | 0.11 |
| GTA | 15.9 | 19.2 | 0.31 | 0.57 | 0.58 |
| TTA | 30 | 54.7 | 7.21 | 0.0073 | 0.02 |
| TTG | 7.0 | 6.2 | 0.04 | 0.83 | 0.84 |
| SNP | Adultos LES | | | | |
| | T | U | | | |
| rs2004640 | 35 | 16 | 7.078 | 0.0078 | 0.012 |
| rs2070197 | 38 | 16 | 8.963 | 0.002 | 0.003 |
| rs10954213 | 33 | 16 | 5.898 | 0.015 | 0.023 |
| Haplotipo | | | | | |
| TCA | 38 | 17.7 | 7.401 | 0.0065 | 0.0131 |
| GTG | 15 | 36.7 | 9.142 | 0.0025 | 0.0098 |
| GTA | 5 | 6.4 | 0.17 | 0.6780 | nd |
| TTA | 15.2 | 17.2 | 0.127 | 0.7212 | 0.261 |
| TTG | nf | | | | |

T- Transmitido

U-No transmitido

Los resultados del análisis de TDT fueron más significativos en los pacientes pediátricos que en los casos adultos, sin embargo, esto puede ser el resultado del gran número de casos pediátricos con ambos padres. De este modo, los resultados del análisis basado en familias, confirma la asociación genética y la presencia del mismo haplotipo de riesgo en los casos pediátricos y adultos con LES, como lo observado en los europeos.

Finalmente, el análisis de los genotipos mostró una frecuencia más alta de homocigotos para el alelo C del SNP rs2070197 en ambos grupos de pacientes mexicanos (tabla 10). Sin embargo, la frecuencia fue más alta en el grupo de pacientes pediátricos (21%) que en el grupo de pacientes adultos (18%), aunque no se observó una diferencia significativa entre ambos grupos (tabla 10).

Cuando comparamos las frecuencias del genotipo homocigoto CC del SNP rs2070197 observamos que se encuentra en una frecuencia aún mucho más alta en el grupo de pacientes pediátricos (21%), comparado con los pacientes adultos mexicanos (18%) y europeos (3.3%), así como en controles europeos (0.7%), mexicanos (4%) y aún todavía en el grupo de mazatecos sanos (6.5%) (figura 14) (Graham et al. 2007; Kozyrev et al. 2007; Reddy et al. 2007).

Usando un análisis de regresión logística, se estimó el OR conferido por el genotipo homocigoto CC del SNP rs2070197, es de 10.46 (95% CI 7.71-13.21). Un análisis adicional usando tablas de matrices (implementado en el programa R) demostró que invariablemente todos los individuos homocigotos para el alelo C del rs2070197 son también homocigotos para el alelo A del rs10954213 y para alelo T del rs2004640, de este modo todos los homocigotos para el alelo C, fueron homocigotos para el haplotipo de riesgo.

Tabla 10. Genotipos de los SNPs del gen *IRF5* de pacientes mexicanos con LES versus controles.

| SNP | Genotipo | Frecuencia Pediátricos LES (n=282) | Frecuencia Control (n=278) | 2df Chi Square | Valor P |
|------------|-----------------|---|---|---------------------------|-------------------------|
| rs2004640 | TT | 0.297 | 0.198 | 34.32 | 3.52 x 10 ⁻⁸ |
| | GT | 0.429 | 0.46 | | |
| | GG | 0.174 | 0.342 | | |
| rs2070197 | TT | 0.295 | 0.637 | 77.89 | 5.55 x10 ⁻¹⁶ |
| | CT | 0.491 | 0.323 | | |
| | CC | 0.214 | 0.04 | | |
| rs1095423 | GG | 0.138 | 0.227 | 24.32 | 5.2 x10 ⁻⁶ |
| | AG | 0.42 | 0.525 | | |
| | AA | 0.442 | 0.248 | | |
| SNP | Genotipo | Adultos LES (n=185) | Control (n=278) | 2df Chi Square | Valor P |
| rs2004640 | TT | 0.411 | .198 | 34.03 | 4x10 ⁻⁸ |
| | GT | 0.443 | 0.46 | | |
| | GG | 0.146 | 0.342 | | |
| rs2070197 | TT | 0.324 | 0.637 | 52.20 | 4.6x10 ⁻¹² |
| | CT | 0.497 | 0.323 | | |
| | CC | 0.179 | 0.04 | | |
| rs1095423 | GG | 0.087 | 0.227 | 30.80 | 2.1x10 ⁻⁷ |
| | AG | 0.44 | 0.525 | | |
| | AA | 0.473 | 0.248 | | |

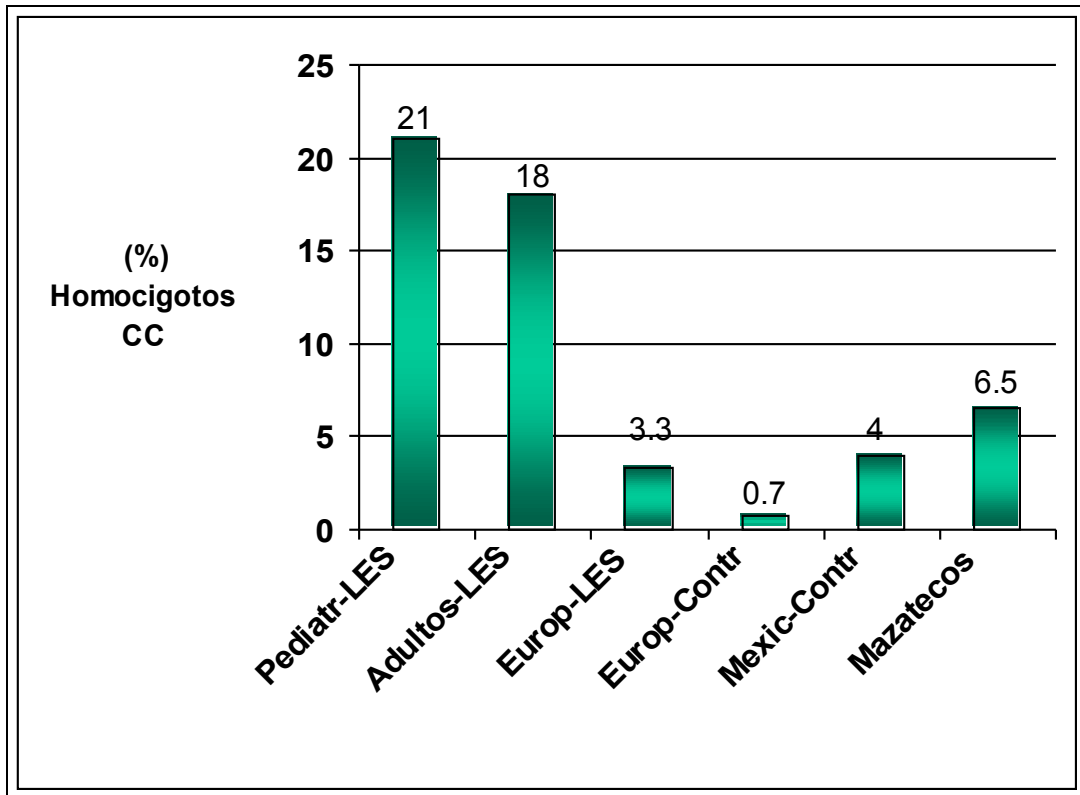


Figura 14. Frecuencia del genotipo CC del SNP rs2070197 del gen *IRF5*. Se observa una frecuencia más alta del genotipo homocigoto CC del SNP rs2070197 en los pacientes mexicanos, en comparación con pacientes y controles de diferentes poblaciones.

Polimorfismos localizados en otros genes candidato.

La tabla 11 muestra las frecuencias del alelo de riesgo de los polimorfismos de los genes *FCGR2A*, *IL-10* *IL-6*, *RANTES*, *MCP1* y *MIF*. La genotipificación de estos SNPs fue realizada en 170 pacientes pediátricos y 220 controles. Para todos los polimorfismos, la distribución de los genotipos no se desvía de lo esperado de poblaciones en equilibrio de Hardy-Weinberg.

FCGR2A (Receptor 2A de baja afinidad del fragmento Fc de la IgG).

El SNP R/H del gen *FCGR2A* fue analizado en los pacientes pediátricos mexicanos y en los controles. Se observó una distribución similar en las frecuencias genotípicas entre los pacientes y los controles, ($P=0.33$). Analizando la distribución de la variante riesgo, la R131; no se observó una diferencia significativa, entre ambos grupos (58% versus 56%, respectivamente, $P=0.51$).

IL-10 (Interleucina-10)

Se analizaron los polimorfismos -1082G/A, -819C/T y -592C/A localizados en la región del promotor del gen de IL-10. Las frecuencias genotípicas y alélicas de estos polimorfismos no mostraron asociación con susceptibilidad a padecer LES en la población pediátrica mexicana (tabla 11). Tampoco se observaron diferencias significativas en las frecuencias de los haplotipos cuando comparamos los casos y los controles. Por otro lado, el genotipo -592CC, el cual se ha encontrado asociado en varias poblaciones con una producción más baja de IL-10, se encontró en una frecuencia más baja, (datos no mostrados). Así mismo, nuestros resultados corroboraron el LD previamente reportado entre los polimorfismos -819C/T y -592C/A ($D'=1$; $r^2=1$).

IL-6 (Interleucina-6)

Las frecuencias genotípicas del polimorfismo -174G/C del gen de IL-6, no mostraron diferencias significativas cuando comparamos los pacientes con los controles, ($P=0.52$, tabla 11). Sin embargo, la distribución del alelo -174G se encontró en una frecuencia más elevada en nuestra población (88%), que lo reportada en otras

poblaciones (60%) (Linker-Israeli et al. 1999, Shotte et al.2001), sin embargo la diferencia no fue significativa (P=0.88).

***RANTES* (Regulada por activación, expresada y secretada por células T normales**

Los resultados derivados de la genotipificación de los SNPs -28C/G y -403/A, no mostraron diferencias significativas cuando las distribuciones genotípicas y alélicas se compararon entre los pacientes y los controles (tabla 11). Asimismo, no se observó asociación cuando combinamos los dos SNPs como un haplotipo, (datos no mostrados).

***MCP1* (Proteína 1 quimioatrayente de monocitos).**

La tabla 11 muestra la frecuencia del alelo de riesgo del SNP -2518 del gen *MCP1*. No se encontraron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas y alélicas entre los pacientes pediátricos y los controles.

***MIF* (Factor inhibidor de la migración de macrófagos)**

Se analizó el SNP -173 G/C localizado en la región del promotor del gen *MIF*. Las frecuencias genotípicas y alélicas de estos polimorfismos no mostraron asociación con la susceptibilidad a padecer LES en la población pediátrica mexicana (datos no mostrados y tabla 11). Por otro lado, siendo la nefritis la manifestación clínica más frecuente en nuestra población de pacientes pediátricos (62%), se analizó una posible asociación con los diferentes genotipos y alelos de estos polimorfismos. Cuando estratificamos los pacientes de acuerdo a la presencia de la afección renal, no se observaron diferencias significativas en la distribución de los polimorfismos antes mencionados entre los pacientes con y sin nefritis lúpica con ninguno de los polimorfismos antes mencionados, (datos no mostrados). De una manera similar, no se observaron diferencias significativas entre todas estas variantes genéticas y las siguientes variables: sexo, edad de inicio y desórdenes neurológicos.

Tabla 11. Frecuencia alélicas de los SNPs que no mostraron asociación.

| Gen | SNPs | Alelo Menor | Frecuencia Casos/controles | P | OR (95% CI) |
|---------------|-----------|-------------|----------------------------|------|-------------|
| <i>FCGR2a</i> | 131 R/H | H | 0.42/0.44 | 0.51 | ND |
| | -1082 A/G | G | 0.19/0.20 | 0.78 | |
| <i>IL-10</i> | -819 C/T | C | 0.43/0.48 | 0.16 | ND |
| | -592 C/A | A | 0.43/0.48 | 0.16 | |
| <i>IL-6</i> | -174 G/C | C | 0.12/0.09 | 0.88 | ND |
| | -28 C/G | G | --- | --- | --- |
| <i>RANTES</i> | -403 G/A | A | 0.31/0.27 | 0.18 | ND |
| | | | | | |
| <i>MCP1</i> | -2518 A/G | G | 0.45/0.39 | 0.22 | ND |
| <i>MIF</i> | -173 G/C | C | 0.31/30 | 0.98 | ND |

DISCUSIÓN

Las EAs son un grupo diverso de enfermedades complejas caracterizadas por la pérdida de la auto-tolerancia causando daño al tejido mediado por el sistema inmune, son originadas por la interacción de factores genéticos, factores ambientales y afectan alrededor del 5% de la población. Las EAs comparten un número de características que sugieren rutas o mecanismos comunes. Su patofisiología compartida y su concurrencia en familias han conducido a la hipótesis que las enfermedades autoinmunes comparten algún fondo genético común (Anaya et al. 2006).

El LES es el prototipo de las enfermedades autoinmunes, en la cual la respuesta inmune está dirigida contra una amplia variedad de antígenos-propios. Esta entidad se manifiesta con una diversa colección de síntomas clínicos y puede involucrar cualquier órgano o tejido. La enfermedad tiene una fuerte tendencia familiar; pero, parecida a muchas otras enfermedades humanas, tiene un patrón complejo de herencia que es consistente con su etiología multifactorial (Harley et al. 2007).

La genética del LES se ha estudiado desde los inicios de los años setenta cuando el primer estudio de asociación de los alelos del HLA con lupus fue reportada (Grumet et al. 1971). De hecho, datos de recurrencia familiar apoyan la participación genética del LES (Alarcón-Segovia D, 2005). Las tres décadas después del descubrimiento de la asociación de HLA, fueron testigos de una extraordinaria revolución tecnológica genética. De hecho, la presente capacidad técnica promete, en la próxima década, identificar muchos de los efectos de asociación genética de los fenotipos de la enfermedad de interés con ORs en el rango de 1.25 o mayores.

Las bases genéticas en el LES de inicio en la edad pediátrica, son actualmente inciertas. En la última década se han obtenido nuevas visiones de su etiopatogenia, utilizando análisis de ligamiento y estudios de asociación de familias multicasos con LES, así como estudios de casos y controles, sin embargo, la mayoría de estos estudios han involucrado principalmente pacientes con LES de inicio en la etapa adulta.

Por otro lado, hasta donde sabemos en LES pediátrico se han realizado sólo dos estudios genéticos con un tamaño de muestra pequeño (Liao et al. 2004; Lee et al. 2004). Uno se realizó en 46 niños chinos mostrando asociación entre LES y un SNP en el gen *RANTES* (Liao CH, et al. 2004). El otro encuentra una asociación de polimorfismos en el gen del receptor de estrógenos-alfa (*ER-α*) en 41 coreanos con LES de inicio en la edad pediátrica (Lee YJ, et al. 2004).

En la población mexicana, los pocos estudios dirigidos a la caracterización de los factores genéticos involucrados en la susceptibilidad al LES se han realizado en pacientes adultos, enfocándose principalmente al análisis de genes localizados en la región del MHC (Granados et al. 1996; Vargas-Alarcón et al. 2000; Zuñiga et al. 2001). Uno de estos estudios observó una asociación del gen *TNF-α* con el desarrollo del LES en los pacientes adultos (Zuñiga et al. 2005). El gen *TNF-α* es localizado dentro de la región del MHC clase III en el cromosoma 6p21.3.

El producto del gen *TNF-α* es una citosina inducible con un amplio intervalo de acciones inmuno-estimuladoras y pro-inflamatorias (Vasalli P, 1992). La importancia de *TNF-α* en la patogénesis del LES es desconocida pero incluso diferencias menores en la producción de *TNF-α* puede influir en la enfermedad autoinmune. El aumento de *TNF-α* en LES y el desarrollo de anticuerpos antinucleares y anticuerpos anti-DNA y una enfermedad semejante a LES en algunos pacientes tratados con antagonistas del TNF ha conducido a la sospecha que el eje *TNF-α* puede ser importante en la susceptibilidad (Shakoor et al. 2002).

El polimorfismo TNF-308A/G ha mostrado evidencias de asociación con varias enfermedades autoinmunes incluyendo LES (Danis et al. 1992; Huizinga et al. 1997). Sin embargo, los estudios de asociación del polimorfismo -308 A/G con LES, han reportado resultados controversiales (Zuñiga et al. 2001; Lee et al. 2006). La explicación mas obvia es que los estudios individuales pueden no tener suficiente poder estadístico para detectar las pequeñas diferencias entre casos y controles.

En esta tesis, se observó un aumento en la frecuencia del alelo TNF-308A en el grupo de pacientes pediátricos. Estos datos difieren de lo observado de un estudio previamente realizado en población adulta mexicana por Zuñiga et al. 2001, donde

observaron que el alelo TNF-238A es el que se encuentra asociado a la susceptibilidad para desarrollar LES. Sin embargo, en contraste a los resultados obtenidos en los pacientes adultos mexicanos, este trabajo confirma la asociación del alelo TNF-308A con la susceptibilidad a desarrollar LES, como lo observado en otras poblaciones (Wilson et al. 1994).

Aunado a lo anterior, un estudio reciente (Lee et al. 2006) realizando un meta-análisis de los estudios de asociación publicados para el gen *TNF- α* después de estratificar por origen étnico, detecta una asociación significativa con el alelo TNF-308A en las muestras derivadas de europeos, pero no en muestras derivadas de africanos y asiáticos de acuerdo a las comparaciones basadas en alelos de los 21 estudios incluidos en el meta-análisis. Nuestros resultados respaldan la idea que el *TNF- α* puede estar involucrado en LES induciendo inflamación y apoptosis, las cuales pueden contribuir a la respuesta autoinmune.

Existen varias posibles razones para tratar de explicar la discrepancia en los resultados observados entre las dos poblaciones con un mismo origen étnico. Primero es posible, que el LD que existe entre el gen *TNF- α* y los alelos DRB, explique la asociación observada con el alelo TNF-238A en los pacientes adultos. Segundo, el pequeño tamaño de muestra del estudio de Zuñiga et al. (51 pacientes), puede conducir a falsos-positivos. Aunado a lo anterior, los reportes publicados a la fecha no respaldan la evidencia de un papel fisiológico del polimorfismo TNF-238 en la producción de *TNF- α* o en la transcripción del gen (Verweij et al. 1999).

Otros de los genes analizados fue el gen *PTPN22*, debido a su relevancia funcional como un regulador negativo de la activación de las células T y su mapeo posicional a una región del cromosoma mostrando ligamiento a la AR y a LES. El gen *PTPN22* se localiza en el cromosoma 1p13.3-p13.1 y codifica una fosfatasa específica de linfocitos (LYP). LYP es una proteína tirosina fosfatasa intracelular y físicamente se une a través de un dominio rico en prolina al dominio SH3 de la cinasa Csk, la cual es un supresor importante de cinasas que participan en la activación de las células-T (Cohen et al. 1999). La capacidad de Csk y Lyp para inhibir la señalización del receptor de células-T requiere su asociación física,

(Cloutier et al. 1999). El polimorfismo *PTPN22* 1858 C/T conduce a la sustitución de una arginina (R) por un triptofano (W), en la posición 620. El alelo del triptofano (620W), conduce a la pérdida de la unión de *PTPN22* a la cinasa intracelular Csk (Bottini et al. 2004). De este modo, elimina la interacción entre Lyp y Csk, evitando la formación del complejo y por lo tanto, la supresión de la activación de las células-T, condición que puede resultar en una respuesta autoinmune (Gregersen 2005; Vang et al. 2005). En esta tesis, se observó una asociación entre el polimorfismo funcional 1858C/T del gen *PTPN22* y la susceptibilidad al LES en pacientes pediátricos mexicanos. El alelo 1858T fue más frecuente en los pacientes con LES que en los controles sanos, sugiriendo que el alelo 1858T puede predisponer a los individuos al desarrollo del LES. El tamaño de muestra es bastante grande para detectar una asociación en un OR entre 1.5 y 2. Debido a que este tiene un poder del 78% en un nivel de significancia del 5% (Baca et al. 2006). Por otro lado, no se observó asociación de la variación *PTPN22* con la manifestación renal, sexo y edad de inicio. Evidencias actuales sugieren que anomalías en la fosforilación de tirosinas en las células T de pacientes con LES contribuyen a la disfunción de las células T efectoras y finalmente a la inmunopatogénesis del LES (Tsokos et al. 2003).

De acuerdo con lo anterior, en esta tesis se observó que el alelo 1858T se asocia con LES, lo que sugiere que la desregulación de la activación de las células T juega un papel importante en LES pediátrico. Debido a que es poco probable que un solo defecto en el gen *PTPN22* es únicamente el responsable para la diversa disfunción de las células T observada en LES, podría ser de interés evaluar sistemáticamente las posibles implicaciones de otros miembros de la familia de genes de las proteínas tirosinas fosfatasas (PTP) (Andersen et al. 2004). Durante el curso de esta tesis, se publicó un estudio similar mostrando una asociación estadísticamente significativa entre el SNP 1858C/T y LES (Kyogoku et al. 2004), los autores encuentran que el alelo de riesgo estuvo presente en el 22.8% de los individuos con LES, comparado con el 16.7% de los controles. Los resultados obtenidos en esta tesis, con respecto a la asociación entre las variantes *PTPN22* y la susceptibilidad al LES encontrada en los estudios previos, sugiere que existe un efecto de dosis génica con los alelos T homocigotos siendo asociados con un riesgo

más alto que los alelos C/T heterocigotos. En esta tesis, sin embargo, no fue posible observar ninguna señal de un efecto de dosis génica, debido a que no se encontraron pacientes homocigotos en nuestra población pediátrica.

Aunado a lo anterior, los resultados confirman la asociación observada por Kyogoku et al. 2004, y la de otros autores, particularmente con una población de Latinoamérica (colombiana) recientemente reportada (Gómez et al, 2005). Sin embargo la frecuencia observada en nuestro estudio (3.4%), fue significativamente más baja que lo reportada hasta la fecha en otras poblaciones afectadas con LES (rango 9.8%-16.5%). Es posible que el alelo PTPN22 1858T se encuentre relacionado con la gravedad de la enfermedad. Un hallazgo interesante, fue que la asociación del alelo T con la susceptibilidad al LES de inicio temprano fue más fuerte en nuestra población (OR=3.09) que lo reportado en estudios previos, incluyendo principalmente pacientes adultos (OR=1.42-2.56) (Lee et al 2007). Además, Wu et al. 2005, observaron una edad más temprana al diagnóstico en una de sus cohortes cuando estratifican por el genotipo CC versus al menos un alelo T. Aunque el LES pediátrico es fenotípicamente similar al LES de la etapa adulta, en el LES de inicio temprano los síntomas iniciales tienden a ser más graves y tiene un curso clínico más agresivo.

Por otra parte, el gen 1 de muerte celular programada (*PDCD1*), es hasta el momento el único gen asociado a LES que ha sido identificado a través de una estrategia de mapeo basada en ligamiento y su posterior selección como gen candidato. Usando familias con múltiples casos afectados de origen nórdico, Lindqvist et al. (2000), identificaron un locus, denominado SLEB2 en el cromosoma 2q37.3, sitio donde se encuentra el gen *PDCD1*, el cual fue fuertemente ligado a LES (LOD score de 4.25). El producto del gen *PDCD1* es un inmunoreceptor de la familia de receptores co-estimuladores *CD28/CTLA4/ICOS* que contiene un dominio basado en tirosina que se localiza en la región intracitoplásmica, el cual es un inmunoreceptor inhibitor (ITIM). *PDCD-1* se expresa principalmente en células B y células T activadas (Nishimura et al. 2001). La unión de PD-1 con cualquiera de sus dos ligandos conduce a la inhibición de la activación de las células T inducida por

anti-CD3. Por lo tanto, se supone que PD-1 está involucrado en la tolerancia periférica, evitando la activación incontrolable de las células auto reactivas.

Además la deficiencia de PD-1 causa una glomerulonefritis semejante al lupus y artritis en ratón con un fondo genético C57BL/6 y cardiomiopatía en un fondo genético BALB/c (Nishimura et al.1999, 2001), por lo anterior éste es un importante gen candidato de riesgo, que fue explorado como uno de los genes localizados en la región 2q37, determinada mediante un análisis de ligamiento (Lindqvist et al. 2000).

Recientemente, Prokunina et al. 2002, identificaron al gen *PDCD1* dentro de la región 2q37 y describieron siete SNPs en este gen, en varias poblaciones afectadas con LES: PD1.1 (-531 A/), PD1.2 (6438), PD1.3 (7146), PD1.4 (7499), PD1.9 (7625), PD1.5 (7785) y PD1.6 (8738). Los SNPs PD1.1, PD1.2 y PD1.9, así como los SNPs PD1.4 y PD1.5 se encuentran en desequilibrio de ligamiento entre sí, por lo que en esta tesis sólo analizamos los SNPs PD1.1, PD1.3, PD1.5 y PD1.6, debido a que estos cosegregan independientemente. Se diseñó un estudio de casos y controles para analizar la asociación entre SNPs en el gen de *PDCD1* y el LES, en una cohorte de 250 pacientes mexicanos (Velázquez-Cruz et al. 2007).

Existe una gran variación en la frecuencia de los polimorfismos en *PDCD1*. El alelo PD1.1A es común en la población china (49%) así como en Indios mexicanos (63%), mientras que es raro en europeos (1%) y africanos (4%) (Thorburn et al. 2007). La frecuencia del alelo PD1.1A fue bastante similar tanto en el grupo de pacientes pediátricos como en el grupo control (69% vs 66%) y ligeramente mayor a lo observado en los indios mexicanos, por lo que no se observaron diferencias significativas. Prokunina et al, 2002 reportó una asociación del alelo de PD1.3A con LES en adultos de tres poblaciones diferentes, incluidos adultos mexicanos. Este SNP elimina el sitio de unión a DNA, para el factor 1 de transcripción relacionado-runt (*RUNX1*) localizado en un enhancer intrónico, haciendo pensar en un mecanismo a través del cual puede contribuir al desarrollo de LES en humanos.

Nuestros resultados muestran que el alelo PD1.3A aumenta el riesgo genético de LES de inicio temprano en los mexicanos. Sin embargo, nosotros encontramos una asociación más débil de este SNP con LES de inicio temprano en los pacientes femeninos ($P=0.0052$, OR 2.53 [95% CI 1.29-4.95]) comparado con lo reportado por

Prokunina et al, en los pacientes adultos femeninos mexicanos con LES ($P = 0.0023$; OR 3.23, 95% CI 1.46-7.16). Los resultados derivados de esta tesis describen una frecuencia del alelo PD1.3A del 5.2% en pacientes pediátricos versus 7% en pacientes adultos reportado por Prokunina et al. 2002. Las diferencias observadas en ambos estudios pueden ser explicadas por la naturaleza y el tamaño de las muestras analizadas (y de este modo el poder estadístico), dado que el análisis de Prokunina y cols. (2002) incluye un grupo muy grande y heterogéneo de familias con múltiples casos afectados seleccionados por género femenino. Aún así, los resultados derivados del presente estudio confirman la hipótesis de que el SNP PD1.3A es un marcador de riesgo genético para LES, en la población pediátrica.

Por otro lado, a pesar de la asociación del alelo PD1.3A con la enfermedad renal, descrita en LES del adulto en la población sueca (Johansson et al. 2005) y a pesar de una frecuencia alta de nefritis (62%) en nuestro grupo de pacientes, en este estudio no se logró confirmar la asociación de alelo PD1.3A con el fenotipo. Esto confirma lo previamente reportado (Prokunina et al. 2004) donde no se observó ninguna asociación con el desorden renal en los pacientes femeninos con LES europeo-americano de los Estados Unidos. Existen varias razones por las cuales en este estudio no se pudo confirmar la asociación de PD1.3A con nefritis lúpica en los pacientes pediátricos mexicanos. Una posibilidad es que PD1.3A no está involucrado en el desarrollo de nefritis en los pacientes mexicanos. Otra causa es la presencia de heterogeneidad genética. También, *PDCD1* podría contribuir a la nefritis aunado a otros factores genéticos, tales como *FcGR1IA* o *FcGR1IIA*, en algunos individuos. Sin embargo el número de pacientes con nefritis, necesario para analizarlo estadísticamente, sería mucho más grande que lo disponible en este estudio. La población mestiza mexicana es una población mezclada con una estructura genética compleja, donde los genes nativo americanos comprenden el 51%, los genes europeos el 45.4% y los genes africanos el 37%, (Choudhry et al. 2006). Esto podría explicar las diferencias observadas en la distribución de las frecuencias de los haplotipos del gen *PDCD1* entre la población pediátrica mexicana y las poblaciones suecas y española.

Por otra parte, existen fuertes evidencias que sugieren que la ruta del interferón tipo 1 (IFN-1) puede ser de principal importancia en la patogénesis del lupus (Ronblom et al. 2001). Las principales células productoras de IFN tipo 1 son una población de células dendríticas plasmacitoides, inicialmente conocidas como células NIP (células naturales productoras-interferón) (Ronblom et al. 2002).

La Investigación en la ruta del IFN-1 en lupus en los últimos años ha tenido un resurgimiento derivado de experimentos de microarreglos de expresión, los cuales mostraron que las células de sangre periférica de pacientes con lupus, presentan un aumento en la expresión de genes inducibles por el interferón, un fenómeno conocido como la “firma interferón” (Baechler et al. 2003; Bennet et al. 2003). Esta firma es específica para LES y su identificación inició una serie de investigaciones encaminadas a la inhibición de la ruta del interferón como una alternativa para el tratamiento del LES. Estas investigaciones se han enfocado a la identificación de variantes de susceptibilidad, las cuales pueden tener un efecto en la desregulación de esta ruta. Con la hipótesis que genes dentro de la ruta del interferón tipo I pueden ser de importancia principal en la susceptibilidad a desarrollar LES, Sigurdsson et al. 2005, estudiaron varios SNPs en un grupo seleccionado de 13 genes e identificaron una asociación genética de polimorfismos localizados en el gen *IRF5* y LES en individuos de origen nórdico.

Esta asociación, se ha encontrado en varias poblaciones de caucásicos-europeos (Graham et al. 2006), argentinos (Kozyrev et al. 2007), coreanos (Shin et al 2007) y en un número pequeño de familias indo-paquistaní (Graham et al. 2006). Sin embargo, aún no se conoce si todos los grupos étnicos, y aun más si los pacientes adultos y pediátricos están afectados de una manera similar.

Los resultados derivados de esta tesis, muestran diferencias importantes con lo descrito hasta la fecha, probablemente debido a la utilización de una población mezclada como la mestiza mexicana donde los amerindios aportan un fondo genético muy importante, al número grande de muestra y al uso de un diseño de estudio de casos y controles combinado con análisis de tríos. También, muestran que hay una fuerte asociación genética entre los genotipos, alelos y haplotipos de riesgo del gen *IRF5* y los pacientes pediátricos y adultos mexicanos, con LES.

En general, los resultados fueron muy similares entre los pacientes pediátricos y adultos. La presencia del alelo de riesgo del rs2070197 tiene un OR de 3.3 para los pacientes pediátricos y de 2.9 para los pacientes adultos, comparado a los europeos (1.67) (Kozyrev et al. 2007). El análisis de los casos pediátricos con LES mostraron que el alelo T del rs2004640 estuvo fuertemente asociado con la enfermedad (61% en casos versus 42% en controles), pero la asociación más fuerte fue observada con el SNP rs2070197. Este SNP no es funcional, pero refleja principalmente el haplotipo de riesgo de la enfermedad y es por lo tanto un excelente marcador. También, en contraste a lo previamente reportado, el SNP rs10954213 estuvo fuertemente asociado con LES en el grupo de pacientes adultos aunque un poco más débil que el rs2004640 y el rs2070197, el OR mostró una diferencia en ambos grupos de pacientes (1.7 pacientes pediátricos versus 2.1 pacientes adultos).

Uno de los hallazgos más interesantes, es que el haplotipo de riesgo tiene una frecuencia más alta en los individuos de origen mexicano (20%) y aún es más alta en los individuos sanos mazatecos (31%), haciendo pensar en una contribución importante en la susceptibilidad para LES del gen *IRF5* aportado por los amerindios mexicanos.

El haplotipo de riesgo del gen *IRF5* para el cual el SNP rs2070197 es un excelente marcador, incluye el alelo de riesgo T de rs2004640 que conduce a splicing del exón 1B 5' UTR alternativo, la presencia de una inserción en el exón 6 definiendo la traducción de las isoformas V5 y V6 y la expresión alta del alelo A del rs10954213 localizado en la región 3'UTR en un sitio de poliadenilación (Graham et al. 2006; Kozyrev et al. 2007).

Por otro lado, aún más interesante, es el hecho que los pacientes mexicanos con LES tienen una muy alta frecuencia de individuos homocigotos para el haplotipo de riesgo (20%), contrario a los pacientes europeos entre los cuales sólo el 3.3% de pacientes con LES son homocigotos. Por lo tanto, en los pacientes mexicanos podría existir una mayor frecuencia de casos con LES con una doble dosis de los niveles de *IRF5*, expresión de sólo las isoformas V5 y V6 y posiblemente más transcritos producidos del exón 1-B.

El OR conferido por el genotipo por ser homocigoto para el alelo C del rs2070197 (el SNP que sirve de marcador del haplotipo de riesgo), es de 10.46. Hasta la fecha, sólo el alelo HLA DRB1*0301 (DR3) se había reportado como de importancia en los mexicanos, pero a una mucho menor magnitud que en los europeos (Granados et al. 1996; Graham et al. 2002). Basado en lo anterior, hasta ahora *IRF5* parece ser el factor más importante que contribuye al riesgo de LES en nuestra población.

Los resultados anteriormente descritos, sugieren que los individuos homocigotos para el haplotipo de riesgo, tendrían una enfermedad más grave, posiblemente con una edad más temprana del inicio de las manifestaciones clínicas o una frecuencia más alta de la exacerbación de la enfermedad. Sin embargo, datos sobre la actividad de la enfermedad y el daño acumulado no fueron incluidos en este estudio, y estas características de LES podrían estar correlacionadas con la variación de *IRF5*, debido a que han mostrado correlación con la sobreexpresión de genes de respuesta IFN tipo-1 (Baechler et al. 2003; Bennett et al. 2003).

Aunque, es probable que *IRF5* tenga una participación importante en la autoinmunidad del LES, la mayoría de los estudios de este factor de transcripción se han relacionado con la respuesta a las infecciones virales y su papel en la regulación del ciclo celular y sobrevivencia de las células cancerosas (Barnes et al. 2001; Mori et al. 2002; Yanai et al. 2007). *IRF5* es un mediador crítico de las señales estimuladas por los TLRs (receptores tipo-toll), (Takaoka et al. 2005). Su fosforilación y translocación nuclear conduce a la sobreexpresión de muchos genes proinflamatorios incluyendo citocinas, quimiocinas y el IFN-1 (Barnes et al. 2002; -2004).

El vínculo específico de *IRF5* a la susceptibilidad del LES puede residir en los complejos antígeno-anticuerpo que contienen DNA y RNA (Pascual et al. 2006). Estos complejos son tomados por pDCs (DC-células dendríticas) e interactuar con TLR7/8 y 9, conduciendo a la activación de DCs y células B auto reactivas.

Los resultados derivados de esta tesis, han confirmado la asociación del gen *IRF5* con la susceptibilidad de LES (Reddy et al. 2007). La asociación es muy clara con valores tan importantes que no tienen precedente en la genética del LES.

Existen varias líneas de evidencia que las quimiocinas y las citocinas juegan un papel importante en el desarrollo inflamatorio y progresión de las enfermedades autoinmunes, como LES (Kim et al. 2002; Gibson et al. 2001). Además, se ha demostrado que los pacientes con LES muestran una desregulación de las moléculas inflamatorias (Lit et al. 2006). Algunas de estas citocinas que son asociadas con LES indudablemente contribuyen a la patogénesis de la enfermedad, mientras otras pueden reflejar los mecanismos compensatorios que están fallando para inhibir el desarrollo de la autoinmunidad (Fairhurst et al. 2006).

En esta tesis, se analizaron nueve polimorfismos funcionales localizados en genes de citocinas, quimiocinas pro-inflamatorias y el receptor *FCGR2a*; seis fuertes genes candidato para asociación con LES. No se encontró evidencia de asociación con los polimorfismos localizados en los genes *IL-10* (A1082G, C819T y A592C), *IL-6* (-174 G/C), *RANTES* (-403 G/A -28C/G), *MCP-1* (-2518 G/A), *MIF* (-173 G/C) y *FCGR2a* (R/H131). Todos estos genes habían sido previamente asociados con la susceptibilidad y el desarrollo del LES en otras poblaciones (Sanchez et al. 2006).

El espectro alélico o la arquitectura de una enfermedad se refiere al número de variantes de la enfermedad que existen, sus frecuencias alélicas y el riesgo que ellas confieren. También, se ha discutido que las frecuencias de las variantes que predisponen a la enfermedad y el peso de sus efectos fenotípicos indican el potencial poder estadístico de los estudios de asociación y por lo tanto la probabilidad de éxito (Pritchard y Cox, 2002).

El rango de los efectos fenotípicos (OR) de los genes previamente mencionados va de 1.35-1.62. por lo que una probable explicación para la ausencia de replicación en estos genes previamente mencionados, sea debido a que el tamaño de muestra es pequeño y consecuentemente el poder estadístico sea bajo.

Pritchard y Cox, 2006; basándose en modelos matemáticos propone que al menos 6,000 casos y 6,000 controles proporcionan, bajo condiciones ideales, aproximadamente entre el 43% y el 94% de poder para detectar variantes de susceptibilidad de la enfermedad con un OR de 1.3 y MAFs (Frecuencia del Alelo Menor) de entre 0.05 y 0.1. Por lo que es conveniente discutir, que la principal limitación del estudio es que no se pudo identificar variantes de susceptibilidad

involucradas en el LES pediátrico, que tienen un efecto pequeño a moderado en el fenotipo de la enfermedad (ORs menores de 2.0).

La ausencia de replicación de las asociaciones reportadas previamente es un evento común en la búsqueda para las determinantes genéticas de las enfermedades complejas debido a la heterogeneidad de la población o una clase distinta de predisposición (Ioannidis et al. 2001). La ausencia de replicación en nuestra población puede alternativamente ser explicada por una diferente composición racial de los estudios anteriores y del presente estudio o que la presencia de factores ambientales a los cuales son expuestas las poblaciones africanas, americanas, asiáticas, son distintos en poblaciones mezcladas, tales como la mexicana. Además se conocen algunas diferencias genéticas entre los diferentes grupos étnicos, tales como, los caucásicos y los afroamericanos. Lo anterior podría explicar porque el análisis falla también para replicar los hallazgos observados por Liao et al. 2004; donde analizando 46 niños chinos encuentran una asociación entre LES y un SNP en el gen *RANTES* y por Lee et al 2004, donde encuentran una asociación de polimorfismos en el gen del receptor de estrógenos-alfa en 41 coreanos con LES de inicio en la edad pediátrica.

La discrepancia en los resultados observados en los genes: *TNF- α* , *PTPN22*, *PDCD1* e *IRF5* en el grupo de pacientes pediátricos y comparados con los resultados publicados en pacientes adultos, podría sugerir que en el LES pediátrico estarían operando un diverso grupo de genes que se comparten con el adulto, pero que en el LES pediátrico funcionarían en menor o mayor grado de magnitud, dependiendo del grado de la exposición a diversos factores ambientales, aun desconocidos; tal suposición se ve respaldada por los hallazgos inmunológicos y las manifestaciones clínicas observados en los pacientes pediátricos. El LES que comienza en la infancia tiende a ser más grave en el inicio y tiene un curso clínico más agresivo, estos mueren generalmente durante la fase aguda de la enfermedad mientras los pacientes adultos mueren debido a complicaciones tales como infecciones (Klein-Gitelman et al. 2002).

Los estudios de replicación son importantes debido a que ellos respaldan la evidencia de la asociación estudiada. Una ausencia de replicación entre los

diferentes subgrupos raciales/étnicos o a través de diferentes escenarios ambientales, puede representar observaciones validas reflejando diferentes fondos genéticos e interacciones genes-ambiente (Huizinga et al. 2004). Los resultados obtenidos en el presente estudio, confirman previas asociaciones en cohortes independientes de LES y por lo tanto preservan el papel de SNPs localizados en los genes *TNF- α* , *PDCD1*, *PTPN22* e *IRF5* como marcadores de riesgo genético para LES y sugiere que la alteración en la regulación de la activación de las células T juega un importante papel en la respuesta mediada por células T, en los pacientes pediátricos mexicanos. Aunque los efectos relativos más altos de estos polimorfismos en nuestra población del LES de la etapa pediátrica comparada con LES en la etapa adulta, puede explicarse por las diferencias en el fondo genético entre las diferentes poblaciones étnicas, también puede ser que algunos polimorfismos pueden tener efectos diferentes en el LES de inicio temprano y LES de la etapa adulta.

En este trabajo se han identificado, cuatro genes involucrados en la susceptibilidad al desarrollo de LES, en la población pediátrica y muchos otros están en camino de ser identificados. Los resultados presentados en esta tesis apoyan la hipótesis de que en este padecimiento existe una gran heterogeneidad genética y que ésta varía entre los diferentes grupos étnicos, por lo que los genes candidatos deben ser estudiados con detalle en cada una de las poblaciones. Los genes descritos, parecen ser determinantes genéticos muy fuertes en nuestra población. Sin embargo, aún queda por realizar estudios adicionales de estos genes con las manifestaciones clínicas de LES, en nuestra población.

Los estudios genéticos son importantes porque finalmente ellos pueden revelar los mecanismos que llevan a la aparición de la enfermedad y pueden proporcionar nuevos blancos terapéuticos para nuevas terapias. Los resultados derivados de esta tesis sientan las bases para el entendimiento de los mecanismos moleculares del LES en nuestra población y podrían contribuir como nuevas herramientas que nos permitan mejorar las estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento del LES y de otras enfermedades autoinmunes comunes, en nuestra población.

CONCLUSIONES

1. Esta tesis constituye de los primeros trabajos encaminados en determinar los factores de riesgo genético que conducen a la susceptibilidad a desarrollar LES de inicio temprano en la población pediátrica.
2. El análisis de los polimorfismos localizados en los genes *IL-10* (A1082G, C819T y A592C), *IL-6* (-174 G/C), *RANTES* (-403 G/A -28C/G), *MCP-1* (-2518 G/A), *MIF* (-173 G/C) y *FCGR2a* (R/H131), sugieren que estos genes no se encuentran asociados a la susceptibilidad del LES en pacientes pediátricos mexicanos. Sin embargo no podemos descartar que estos polimorfismos, se encuentran asociados con alguna de las manifestaciones clínicas del LES.
3. Los genes *TNF- α* , *PDCD1*, *PTPN22* e *IRF5* se encuentran fuertemente involucrados en la susceptibilidad al desarrollo de LES en la población pediátrica mexicana. Los hallazgos observados en este estudio, confirman previas asociaciones de estos polimorfismos con LES descritas en otras poblaciones analizando principalmente pacientes adultos.
4. En la población mexicana el haplotipo de riesgo TCA tiene la frecuencia más alta reportada a la fecha. El haplotipo incluye el alelo T de rs2004640 que conduce a un splicing del exón 1B 5' UTR alternativo, la presencia de una inserción en el exón 6 definiendo la traducción de las isoformas V5, V6 y la expresión más alta del alelo A del rs10954213 que conduce a un transcrito más corto.
5. La alta frecuencia del alelo C del rs2070197 del gen *IRF5*, en los mazatecos, sugiere que el fondo genético indígena en los mexicanos claramente contribuye a la alta frecuencia del haplotipo de riesgo en la población mestiza mexicana y tiene una alta contribución en la susceptibilidad a padecer LES.

6. Los datos derivados de este estudio, muestran que *IRF5* es el gen que ha mostrado mayor riesgo para la susceptibilidad a desarrollar LES a nivel mundial.
7. Los datos sugieren que algunos factores de riesgo genético se comparten en los pacientes adultos y pediátricos, pero también sugieren en el LES pediátrico estos genes podrían funcionar en menor o mayor grado de magnitud, dependiendo del grado de la exposición a diversos factores ambientales, aun desconocidos.
8. Este estudio apoya la hipótesis de que en este padecimiento existe una gran heterogeneidad genética y que esta varía entre los diferentes grupos étnicos, por lo que los genes candidatos deben ser estudiados con detalle en cada una de las poblaciones.

PERSPECTIVAS

Con base en los datos derivados de esta investigación, nos permite sugerir una serie de perspectivas:

- Los genes asociados con la susceptibilidad al desarrollo del LES en la población pediátrica parecen ser factores de riesgo genéticos muy importantes en nuestra población, por lo que debe realizarse un análisis detallado de estos genes con las manifestaciones clínicas de LES, para poder determinar su uso como marcadores pronóstico y/o gravedad de la enfermedad, en nuestra población.
- Reconociendo los posibles efectos confusores genéticos debido a la estratificación de la población en los estudios de asociación de casos y controles, los estudios basados en familias son necesarios; por lo que es importante incrementar el tamaño de muestra de las familias en nuestro estudio para así poder alcanzar el poder estadístico adecuado en este tipo de estudios.
- La alta frecuencia del haplotipo GCA del gen *PDCD1* en la población normal mexicana comparada con la española y sueca (32 versus 1 y 2%, respectivamente) sugiere que en nuestra población este haplotipo podría haber sido heredado de nuestros ancestros amerindios. Por lo que son necesarios estudios adicionales en los Amerindios mexicanos para confirmar esta hipótesis.
- El descubrimiento de una fuerte asociación del LES en pacientes mexicanos con SNPs localizados en el gen *IRF5*, debe ser validado con la evaluación del papel funcional de las isoformas expresadas por el interferón alfa o con los receptores tipo-toll.

- Asimismo, dado la alta frecuencia de alelos de riesgo del gen *IRF5* en población mexicana y que *IRF5* también se ha relacionado con la respuesta a las infecciones virales, sería interesante analizar el papel de la presencia del haplotipo de riesgo y las variantes polimórficas funcionales de este gen en las enfermedades virales más comunes en nuestra población.
- El desarrollo de nuevas técnicas para la genotipificación de los SNPs sobre una base del genoma-completo, ha abierto nuevas posibilidades para el estudio de las enfermedades complejas. Por lo anterior, es más atractivo la genotipificación mediante la tecnología de microarreglos. Por lo que se plantea analizar 300 pacientes y 300 controles con el chip de Affymetrix 500K, lo que conduciría a la identificación de genes nuevos involucrados en la patogénesis de la enfermedad en nuestra población.

REFERENCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, and Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. Ed. Saunders 1997; Págs: 406-422.
- Abeles M, Urman JD, Weisntein A, Lowenstein M, Rothfield NF. Systemic lupus erythematosus in the younger patient: survival studies. *J Rheumatol* 1980; 7:515– 22.
- Alarcon-Segovia D, Alarcon-Riquelme ME, Cardiel MH, Caeiro F, Massardo L, Villa AR, Pons-Estel BA. Grupo Latinoamericano de Estudio del Lupus Eritematoso (GLADEL). Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arthritis Rheum* 2005; 52:1138-47.
- Anaya JM, Gomez L, Castiblanco J. Is there a common genetic basis for autoimmune diseases?. *Clin Dev Immunol* 2006;13:185-95.
- Andersen JN, Jansen PG, Echwald SM, Mortensen OH, Fukada T, Del Vecchio R, et al. A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *FASEB J* 2004; 18:8-30.
- Andre I, González A, Wang B, Katz J, Benoist C, Mathis D. Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:2260-3.
- Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003; 349:1526-33.
- Arkachaisri T, Lehman TJ. Systemic lupus erythematosus and related disorders of childhood. *Curr Opin Rheumatol* 1999;11: 384-92.
- Baca V, Orozco L. La genética de las enfermedades complejas en: La frontera: Genética Molecular de la enfermedad. Ed. Instituto Politécnico Nacional. Pp. 77-91. 2004
- Baca V, Velázquez-Cruz R, Salas-Martínez G, Espinosa-Rosales F, Saldaña-Alvarez Y, Orozco L. Association analysis of the PTPN22 gene in childhood-onset systemic lupus erythematosus in Mexican population. *Genes Immun* 2006; 7: 693– 95.

- Bader-Meunier B, Armengaud JB, Haddad E, Salomon R, Deschenes G, Kone-Paut I, et al. Initial presentation of childhood-onset systemic lupus erythematosus: a French multicenter study. *J Pediatr* 2005; 146:648-53.
- Bader-Meunier B, Quartier P, Deschenes G, Cochat P, Haddad E, Kone-Paut I, et al. [Childhood-onset systemic lupus erythematosus]. *Arch Pediatr* 2003; 10:147-57.
- Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:2610–15.
- Bakkaloglu A. Lupus nephropathy in children. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16 Suppl 6:126-8.
- Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet* 2006; 7:781-91.
- Barnes BJ, Moore PA, Pitha PM. Virus-speciWc activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes. *J Biol Chem* 2001; 276:23382–23390.
- Barnes BJ, Kellum MJ, Field AE, Pitha PM. Multiple regulatory domains of IRF-5 control activation, cellular localization, and induction of chemokines that mediate recruitment of T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 5721–5740.
- Barnes BJ, Richards J, Mancl M, Hanash S, Beretta L, Pitha PM *et al.* Global and distinct targets of IRF-5 and IRF-7 during innate response to viral infection. *J Biol Chem* 2004; 279: 45194–45207.
- Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, Pascual V. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 2003; 197:711–23.
- Benseler SM, Silverman ED. Systemic lupus erythematosus. *Pediatr Clin North Am.* 2005; 52:443-67.
- Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* 2001; 294:1540-3.

- Blin N, Sttaford D. A general method for isolation of high molecular weigh DNA from eukaryotes. *Nucleic Acid Res* 1976; 3:2303-2308.
- Bogdanovic R, Nikolic V, Pasic S, Dimitrijevic J, Lipkovska-Markovic J, Eric-Marinkovic J, et al. Lupus nephritis in childhood: A review of 53 patients followed at a single center. *Pediatr Nephrol* 2004; 19:36-44.
- Boon SJ, McCurdy D. Childhood Systemic Lupus erythematosus. *Pediatric Annals* 2002; 31:407-17.
- Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type diabetes. *Nat Genet* 2004; 36:337-8.
- Brinkmann B, Klintschar M, Neuhuber F, Huhne J, Rolf B. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet* 1998; 62:1408-15.
- Brunner HI, Feldman BM, Bombardier C, Silverman ED. Sensitivity of the systemic lupus erythematosus disease activity index, British Isles Lupus Assessment Group Index, and Systemic Lupus Activity Measure in the evaluation of clinical change in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1354-60.
- Brunner HI, Silverman ED, To T, Bombardier C, Feldman BM. Risk factors for damage in childhood-onset systemic lupus erythematosus: Cumulative disease activity and medication use predict disease damage. *Arthritis Rheum* 2002; 46:436-44.
- Calvo-Alen J, Reveille JD, Rodriguez-Valverde V, McGwin G Jr, Baethge BA, Friedman AW, Alarcon GS. Clinical, immunogenetic and outcome features of Hispanic systemic lupus erythematosus patients of different ethnic ancestry. *Lupus*. 2003; 12:377-85.
- Carreno L, López-Longo FJ, Monteagudo I, Rodríguez-Mahou M, Bascones M, González CM, et al. Immunological and clinical differences between juvenile and adult onset of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1999; 8:287-92.

- Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 1994; 179:1317-30.
- Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 5-year period. A multicenter prospective study of 1,000 patients. European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine* 1999; 78:167-75.
- Choudhry S, Coyle NE, Tang H, Salari K, Lind D, Clark SL, et al. Population stratification confounds genetic association studies among Latinos. *Hum Genet* 2006; 118: 652– 64.
- Ciftci E, Yalcinkaya F, Ince E, Ekim M, Ileri M, Orgerin Z, et al. Pulmonary involvement in childhood-onset systemic lupus erythematosus: A report of five cases. *Rheumatology* 2004; 43:587-91.
- Cloutier JF, Veillette A. Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase. *J Exp Med* 1999; 189:111-21.
- Cohen S, Dadi H, Shaoul E, Sharfe N, Roifman CM. Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. *Blood* 1999; 93:2013–24.
- Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 1998; 8:1229-31.
- Danis VA, Millington M, Hyland V, Lawford R, Huang Q, Grennan D. Increased frequency of the uncommon allele of a tumour necrosis factor alpha gene polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Dis Markers* 1995; 12:127-33.
- Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1992; 35:311-8.
- Devlin B, Risch N. A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics* 1995; 29:311-22.
- Ermann J, Fathman G. Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation. *Nature Immunol* 2001; 2:759-61.

- Ewing B, Green P. Analysis of expressed sequence tags indicates 35,000 human genes. *Nat Genet* 2000; 25:232-4.
- Fairhurst AM, Wandstrat AE, Wakeland EK. Systemic lupus erythematosus: multiple immunological phenotypes in a complex genetic disease. *Adv Immunol* 2006; 92:1-69.
- Ferreiros-Vidal I, D'Alfonso S, Papasteriades C, Skopouli FN, Marchini M, Scorza R, et al. Bias in association studies of systemic lupus erythematosus susceptibility due to geographical variation in the frequency of a programmed cell death 1 polymorphism across Europe. *Genes Immun* 2007; 8:138-46.
- Ferreiros-Vidal I, Gomez-Reino JJ, Barros F, Carracedo A, Carreira P, Gonzalez-Escribano F, et al. Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus: evidence of population-specific effects. *Arthritis Rheum* 2004; 50:2590-97.
- Font J, Cervera R, Espinosa G, Pallarés L, Ramos-Casals M, Jiménez S, et al. Systemic lupus erythematosus (SLE) in childhood: Analysis of clinical and immunological findings in 34 patients and comparison with SLE characteristics in adults. *Ann Rheum Dis*. 1998; 57:456-9.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002; 296:2225-9.
- Gafney PM, Ortmann WA, Selby SA, Shark KB, et al. Genome screening in human systemic lupus erythematosus: results from a second Minnesota cohort and combined analysis of 187 sib-pair families. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 547-556.
- Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RG, Huizinga TW, Kimberly RP: Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001, 166:3915-3922.
- Gomez LM, Anaya JM, Gonzalez CI, Pineda-Tamayo R, Otero W, Arango A, Martin J. PTPN22 C1858T polymorphism in Colombian patients with autoimmune diseases. *Genes Immun* 2005; 6:628-31.

- Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 2005; 435:590-597.
- Graham DS, Manku H, Wagner S, Reid J, Timms K, Gutin A, et al. Association of IRF5 in UK SLE families identifies a variant involved in polyadenylation. *Hum Mol Genet* 2007; 16:579-91.
- Graham RR, Kozyrev SV, Baechler EC, Reddy MV, Plenge RM, Bauer JW, et al. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2006; 38:550–55.
- Graham RR, Kyogoku C, Sigurdsson S, Vlasova IA, Davies LR, Baechler EC, et al. Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:6758-63.
- Graham RR, Ortmann WA, Langefeld CD, Jawaheer D, Selby SA, Rodine PR, et al. Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 2002; 71:543-53.
- Granados J, Vargas-Alarcon G, Andrade F, Melin-Aldana H, Alcocer-Varela J, Alarcon-Segovia D. The role of HLA-DR alleles and complotypes through the ethnic barrier in systemic lupus erythematosus in Mexicans. *Lupus* 1996; 5:184-9.
- Gregersen PK. Gaining insight into PTPN22 and autoimmunity. *Nat Genet* 2005; 37:1300–02.
- Grumet FC, Coukell A, Bodmer JG, Bodmer WF, McDevitt HO. Histocompatibility (HL-A) antigens associated with systemic lupus erythematosus. A possible genetic predisposition to disease. *N Engl J Med* 1971; 285:193-6.
- Guevara JP, Clark BJ, Athreya BH. Point prevalence of cardiac abnormalities in children with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2001; 28:854-9.
- Hahn BH. Antibodies to DNA. *New Engl J Med* 1998; 338:1359-68
- Harley JB, Kelly JA, Kaufman KM. Unraveling the genetics of systemic lupus erythematosus. *Springer Semin Immunopathol* 2006; 28:119-30.

- Hochberg MC. The application of genetic epidemiology to systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1987; 14:867–69.
- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1725.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:7276-7280.
- Huizinga TW, Pisetsky DS, Kimberly RP. Associations, Populations and the Truth. *Arthritis Rheum* 2004; 50:2066-71.
- Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, et al. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol* 1997; 72:149-53.
- Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG: Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet* 2001; 29:306-309.
- James JA, Kaufman KM, Farris AD, Taylor-Albert E, Lehman TJ, Harley JB. An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1997; 100:3019-26.
- Jiménez S, Cervera R, Font J, Ingelmo M. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Clin Rev Allergy Immunol* 2003; 25:3-12.
- Johansson M, Arlestig L, Moller B, Rantapaa-Dahlqvist S. Association of a PDCD1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52:1665-9.
- Johansson M, Arlesting L, Moller B, Rantapaa-Dahlqvist S. Association of a PDCD1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52:1665– 69.
- Karandikar NJ, Vanderlugt CL, Bluestone JA, Miller SD. Targeting the B7/CD28: CTLA-4 costimulatory system in CNS autoimmune disease. *J Neuroimmunol* 1998, 89:10-8.

- Kim HL, Lee DS, Yang SH, Lim CS, Chung JH, Kim S, Lee JS, Kim YS: The polymorphism of monocyte chemoattractant protein-1 is associated with the renal disease of SLE. *Am J Kidney Dis* 2002; 40:1146-1152.
- Klein-Gitelman M, Reiff A, Silverman ED. Systemic lupus erythematosus in childhood. *Rheum Dis Clin North Am* 2002; 28:561-77.
- Kozyrev SV, Lewen S, Reddy PM, Pons-Estel B; Argentine Collaborative Group; Witte T; German Collaborative Group; et al. Structural insertion/deletion variation in IRF5 is associated with a risk haplotype and defines the precise IRF5 isoforms expressed in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2007; 56:1234-41.
- Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet* 2001; 27:234-6.
- Kruglyak L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet* 1999; 22:139-44.
- Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VE et al. Genetic association of the R620W C/T polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 504-7.
- Kyrtaris VC, Tsokos GC. T lymphocytes in systemic lupus erythematosus: An update. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16:548-52.
- Laird NM, Lange C. Family-based designs in the age of large-scale gene-association studies. *Nat Rev Genet* 2006; 7:385-94.
- Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 1995; 11:241-7.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409:860-921.
- Lander ES. The new genomics: global views of biology. *Science* 1996; 274:536-9.
- Lee YH, Harley JB, Nath S. Meta-analysis of TNF- α promoter -308 A/G polymorphism and SLE susceptibility. *Eur J Human Genet* 2006; 14:362-71.
- Lee YH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG, Nath SK, Harley JB. The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune diseases-a meta-analysis. *Rheumatology* 2007; 46:49-56.

- Lee YJ, Shin KS, Kang SW, Lee CK, Yoo B, Cha HS, et al. Association of the oestrogen receptor alpha gene polymorphisms with disease onset in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2004; 10:1244–49.
- Lehman TJ, McCurdy DK, Bernstein BH, King KK, Hanson V. Systemic lupus erythematosus in the first decade of life. *Pediatrics* 1989; 83:235-9.
- Lehman TJA, McCurdy D, Spencer C. Prognostic value of antibodies to Ro/SSA, SSB/La and RNP in children with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1990; 33:S154.
- Lenardo M, Chan FKM, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, and Zheng L. Mature T lymphocyte apoptosis- immune regulation in a dynamic and predictable antigenic environment. *Ann Rev Immunol* 1999; 17:221-253.
- Liang F, Holt I, Pertea G, Karamycheva S, Salzberg SL, Quackenbush J. Gene index analysis of the human genome estimates approximately 120,000 genes. *Nat Genet* 2000; 25:239-40.
- Liao CH, Yao TC, Chung HT, See LC, Huo ML, Huang JL. Polymorphisms in the Promoter region of RANTES and the regulatory region of monocyte chemoattractant protein-1 among Chinese children with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2004; 10: 2062– 67.
- Lindqvist AK, Steinsson K, Johanneson B, et al. A susceptibility locus for human systemic lupus erythematosus (Hsle1) on chromosome 2q. *J Autoimmun* 2000; 14:169-178.
- Lindqvist AK, Steinsson K, Johanneson B, Kristjansdottir H, Arnasson A, Grondal G, et al. A susceptibility locus for human systemic lupus erythematosus (Hsle1) on chromosome 2q. *J Autoimmun* 2000; 14:169-78.
- Linker-Israeli M, Wallace DJ, Prehn J, Michael D, Honda M, Taylor KD, et al. Association of IL-6 gene alleles with systemic lupus erythematosus (SLE) and with elevated IL-6 expression. *Genes Immun* 1999; 1:45-52.
- Lipsky PE. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat Immunol* 2001;2:764-6.

- Lit LC, Wong CK, Tam LS, Li EK, Lam CW: Raised plasma concentration and *ex vivo* production of inflammatory chemokines in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2006, 65:209-215.
- Lo JT, Tsai MJ, Wang LH, Huang MT, Yang YH, Lin YT, et al. Sex differences in pediatric systemic lupus erythematosus: A retrospective analysis of 135 cases. *J Microbiol Immunol Infect* 1999; 32:173-8.
- Long AD, Langley CH. The power of association studies to detect the contribution of candidate genetic loci to variation in complex traits. *Genome Res* 1999; 9:720-31.
- Mageed RA, Prud'homme GJ. Immunopathology and the gene therapy of lupus. *Gene Ther* 2003; 10:861-74.
- Mason D. Some quantitative aspects of T cell repertoire selection: the requirement for regulatory T cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 80-88
- McMurray RW, Suwannaroj S, Ndebele K, Jenkins JK. Differential effects of sex steroids on T and B cells: Modulation of cell cycle phase distribution, apoptosis and bcl-2 protein levels. *Pathobiology* 2001; 69:44-58.
- Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003; 56:481-90.
- Moon UY, Park SJ, Oh ST, Kim WU, Park SH, Lee SH, et al. Patients with systemic lupus erythematosus have abnormally elevated Epstein-Barr virus load in blood. *Arthritis Res Ther* 2004; 6:R295-302.
- Mori T, Anazawa Y, Iizumi M, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H *et al.* Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. *Oncogene* 2002; 21: 2914–2918.
- Moser KL, Neas BR, Salmon JE, Yu H, Gray-McGuire C, et al. Genome scan of human systemic lupus erythematosus: evidence for linkage on chromosome 1q in African-American pedigrees. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:14869-14874.
- Nielsen C, Lastrup H, Voss A, Junker P, Husby S, Lillevang ST. A putative regulatory polymorphism in PD-1 is associated with nephropathy in a

- population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2004; 13: 510–16.
- Nishimura H, Honjo T. PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol* 2001; 22:265– 68.
- Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999; 11:141–51.
- Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, Nakatani K, Hara M, Matsumori A, et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 2001; 291:319-22.
- Nossal GJV. Negative selection. *Cell* 1994; 76: 229-239.
- Orozco G, Sanchez E, Gonzalez-Gay MA, Lopez-Nevot MA, Torres B, Caliz R, et al. Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52:219–224.
- Pascual V, Farkas L, Banchereau J. Systemic lupus erythematosus: all roads lead to type I interferons. *Curr Opin Immunol* 2006; 18:676–682.
- Pons-Estel BA, Catoggio LJ, Cardiel MH, Soriano ER, Gentiletti S, Villa AR, et al. The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus: ethnic and disease heterogeneity among “Hispanics”. *Medicine* 2004; 83:1–17.
- Posadas-Romero C, Torres-Tamayo M, Zamora-Gonzalez J, Aguilar-Herrera BE, Posadas-Sanchez R, Cardoso-Saldana G, et al. High insulin levels and increased low-density lipoprotein oxidizability in pediatric patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004; 50:160-5.
- Pritchard JK, Cox NJ. The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant...or not? *Hum Mol Genet* 2002; 11:2417-23.
- Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nature Genet* 2002; 32:666-69.

- Prokunina L, Gunnarsson I, Sturfelt G, Truedsson L, Seligman VA, Olson JL, et al. The systemic lupus erythematosus-associated PDCD1 polymorphism PD1.3A in lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50:327–28.
- Reddy MV, Johansson M, Sturfelt G, Jonsen A, Gunnarsson I, Svenungsson E, et al. The R620W C/T polymorphism of the gene PTPN22 is associated with SLE independently of the association of PDCD1. *Genes Immun* 2005; 6:658–662.
- Reddy PL, Velázquez-Cruz R, Baca V, Lima G, Granados J, Orozco L, Alarcón-Riquelme ME. Genetic Association of IRF5 with SLE in Mexicans: High Frequency of the Risk Haplotype and its Homozygosity as a Result of Admixture. *Hum Genet* 2007; 121:721-27.
- Reich DE, Schaffner SF, Daly MJ, McVean G, Mullikin JC, Higgins JM, et al. Human genome sequence variation and the influence of gene history, mutation and recombination. *Nat Genet* 2002; 32:135-42.
- Rioux JD, Abbas AK. Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. *Nature* 2005; 435:584-589.
- Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996; 273:1516-7.
- Ronnlom L, Alm GV. An etiopathogenic role for the type I IFN system in SLE. *Trends Immunol* 2001; 22:427–31.
- Ronnlom L, Alm GV. The natural interferon-alpha producing cells in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 2002; 63:1181–93.
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409:928-33.
- Sanchez E, Sabio JM, Callejas JL, de Ramon E, Garcia-Portales R, Garcia-Hernandez FJ, et al. Association study of genetic variants of pro-inflammatory chemokine and cytokine genes in systemic lupus erythematosus. *BMC Med Genet* 2006; 7:48-55.
- Schmugge M, Revel-Vilk S, Hiraki L, Rand ML, Blanchette VS, Silverman ED. Thrombocytopenia and thromboembolism in pediatric systemic lupus erythematosus. *J Pediatr* 2003; 143: 666-9.

- Schotte H, Schluter B, Rust S, et al. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Caucasian German patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2001; 40:393-400.
- Schwartz RV. Models of T cell anergy: Is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* 1996; 184: 1-8.
- Senna ER, De Barros AL, Silva EO, Costa IF, Pereira LV, Ciconelli RM, Ferraz MB. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol* 2004; 31:594-7.
- Sestak AL, Nath SK, Sawalha AH, Harley JB. Current status of lupus genetics. *Arthritis Res Ther* 2007; 9:210-19.
- Shai R, Quismorio FP, Junior JR, Li L, Kwon OJ, et al. Genome-wide screen for systemic lupus erythematosus susceptibility genes in multiplex families. *Hum Mol Genet* 1999; 8:639-644.
- Shakoor N, Michalska M, Harris CA, Block JA. Drug-induced systemic lupus erythematosus associated with etanercept therapy. *Lancet* 2002; 359:579-580.
- Shin HD, Sung YK, Choi CB, Lee SO, Lee HW, Bae SC. Replication of the genetic effects of IFN regulatory factor 5 (IRF5) on systemic lupus erythematosus in a Korean population. *Arthritis Res Ther* 2007; 9:R32.
- Sigurdsson S, Nordmark G, Goring HH, Lindroos K, Wiman AC, Sturfelt G, et al. Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 2005; 76:528-37.
- Silverman EK, Palmer LJ. Case-control association studies for the genetics of complex respiratory diseases. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 22:645-48.
- Spielman RS, Ewens WJ. The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 983-989.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:685-711.
- Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics: BIOS Scientific Publishers Limited, 1996.

- Swaak AJ, Nossent JC, Bronsveld W, Van Rooyen A, Nieuwenhuys EJ, Theuns L, et al. Systemic lupus erythematosus. II. Observations on the occurrence of exacerbations in the disease course: Dutch experience with 110 patients studied prospectively. *Ann Rheum Dis* 1989; 48:455-60.
- Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T *et al.* Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by toll-like receptors. *Nature* 2005; 434: 243–249.
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF *et al.* The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271–77.
- Teare MD, Barret JH. Genetic linkage studies. *Lancet* 2005; 366:1036-1044.
- Thorburn CM, Prokunina-Olsson L, Sterba KA, Lum RF, Seldin MF, Alarcon-Riquelme ME, Criswell LA. Association of PDCD1 genetic variation with risk and clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in a multiethnic cohort. *Genes Immun* 2007; 8:279-87.
- Trapani S, Camiciottoli G, Ermini M, Castellani W, Falcini F. Pulmonary involvement in juvenile systemic lupus erythematosus: A study on lung function in patients asymptomatic for respiratory disease. *Lupus* 1998; 7:545-50.
- Tsao BP, Cantor RM, Kalunian KC, Chen CJ, *et al.* Evidence for linkage of a candidate chromosome 1 region to human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1997; 99:725-731.
- Tsao BP. An Update on Genetic Studies of Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 2002; 4:359-67.
- Tsokos GC, Mitchell JP, Juang YT. T cell abnormalities in human and mouse lupus: intrinsic and extrinsic. *Curr Opin Rheumatol.* 2003; 15:542-7.
- Tucker LR, Menon S, Schaller JG, Isenberg DA. Adult and childhood onset systemic lupus erythematosus: a comparison of onset, clinical features, serology and outcome. *Br J Rheumatol* 1995; 34:866–72.
- Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orru V, Zavattari P, *et al.* Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet* 2005 ; 37:1317–19.

- Vargas-Alarcon G, Granados J, Martinez-Laso J, Gomez-Casado E, Zuniga J, Salgado N, et al. Lack of association between the polymorphism at the heat-shock protein (HSP70-2) gene and systemic lupus erythematosus (SLE) in the Mexican mestizo population. *Genes Immun* 2000; 1:367-70.
- Vasalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factor. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:411-52.
- Velazquez-Cruz R, Orozco L, Espinosa-Rosales F, Carreno-Manjarrez R, Solis-Vallejo E, Lopez-Lara ND, et al. Association of PDCD1 polymorphisms with childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet.* 2007; 15:336-41.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291:1304-51.
- Von Boehmer H. Positive selection. *Cell* 1994; 76: 219-228.
- Vyas S, Hidalgo G, Baqi N, Von Gizycki H, Singh A. Outcome in African-American children of neuropsychiatric lupus and lupus nephritis. *Pediatr Nephrol* 2002; 17:45-9.
- Wallace DJ, Podell T, Weiner J, et al. Systemic lupus erythematosus survival patterns. Experience with 609 patients. *JAMA* 1981; 245:934-8.
- Wananukul S, Watana D, Pongprasit P. Cutaneous manifestations of childhood systemic lupus erythematosus. *Pediatr Dermatol* 1998; 15:342-6.
- Wandstrat A, Wakeland EK. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nature Immunol* 2001; 2:802-8.
- Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 2003; 301:1374-7.
- Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; 44:388-96.
- Weigle WO, Rpmball CG. CD4+ T-cell subsets and cytokines involved in peripheral tolerance 1997; 18:533-537.

- Wilson AG, Gordon C, di Giovine FS, de Vries N, van de Putte LB, Emery P, Duff GW. A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha. *Eur J Immunol* 1994; 24:191-5.
- Wong M, Tsao BP. Current topics in human SLE genetics. *Springer Semin Immunopathol* 2006; 28:97-107.
- Wu H, Cantor RM, Cunninghame Graham DS, Lingren CM, Farwell L, De Jager PL, Bottini N *et al.* Association analysis of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 in systemic lupus erythematosus families. *Arthritis Rheum* 2005; 52:2396- 2402.
- Yanai H, Chen HM, Inuzuka T, Kondo S, Mak TW, Takaoka A, Honda K, Taniguchi T. Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104:3402–3407.
- Yang LY, Chen WP, Lin CY. Lupus nephritis in children a review of 167 patients. *Pediatrics* 1994; 94:335-40.
- Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V, *et al.* Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 2005; 7; 201:703-11.
- Zappitelli M, Duffy C, Bernard C, Scuccimarri R, Watanabe Duffy K, Kagan R, *et al.* Clinicopathological study of the WHO classification in childhood lupus nephritis. *Pediatr Nephrol* 2004; 19:503-10.
- Zuniga J, Vargas-Alarcon G, Hernandez-Pacheco G, Portal-Celhay C, Yamamoto-Furusho JK, Granados J. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Genes Immun* 2001; 2:363-6.

ANEXO I

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPANTES CON LES.

México, D. F. a _____ de _____ de 200__

Por medio de la presente hago constar que mi hijo (a) _____, mi cónyuge y yo (y en caso necesario mis otros hijos), estamos de acuerdo en participar en el proyecto de investigación ***“Polimorfismos en genes candidato y su asociación con Lupus Eritematoso Sistémico en pacientes pediátricos mexicanos.”***

Estamos enterados de que nuestra participación en el estudio consistirá únicamente en donar una muestra de 10 ml de sangre venosa por parte de mi hijo (a) enfermo y de 15 ml por parte de mi cónyuge y yo, además de responder preguntas relacionadas con la enfermedad de mi hijo(a).

Se nos ha explicado que la sangre será tomada de una vena del brazo con todos los requisitos de seguridad, como el uso de material nuevo y por personal calificado, por lo que no representa ningún riesgo para nosotros y que la única molestia que podría presentarse es la aparición de un pequeño hematoma o moretón que desaparecerá en 3-5 días.

Así mismo, nos han comentado que la información obtenida del estudio genético y de los cuestionarios es absolutamente confidencial y que esta información será manejada únicamente por los investigadores y sólo será utilizada para conocer los antecedentes y evolución de la enfermedad.

Estamos consientes de que nuestra participación en el estudio es completamente voluntaria, que participar no implica pago o retribución alguna y que si en medio del proceso decidimos no continuar, toda la información recopilada será eliminada.

Hemos leído la información descrita y nuestras preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente.

Atentamente

Nombre y firma del padre, la madre o el tutor (No. Telefónico)

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma del testigo

He entregado al padre, madre o tutor del participante con LES la información precisa y necesaria sobre los objetivos del proyecto, riesgos, beneficios y derechos que tienen cada uno de los participantes. Declaro que su decisión de participar en el estudio ha sido tomada de manera libre, sin presiones o influencias de ningún tipo, y soy testigo de que esta carta ha sido firmada por el padre o tutor del participante arriba mencionado.

Nombre y firma del Investigador (No. Telefónico)

ANEXO II

HOJA DE CAPTACIÓN DE DATOS

No. de Familia □□□

No. de Paciente □□□

Fecha de evaluación □□□□□□

Nombre del paciente _____

Registro _____

Institución CMN CMR HIM INP Otras

Especificar _____

Fecha de Nacimiento □□□□□□ Edad actual □□ años □□ meses

Origen geográfico □□

Sexo F M

Lugar de Nacimiento _____

Nombre del Padre _____

Lugar de Nacimiento _____

Nombre de la Madre _____

Lugar de Nacimiento _____

Antecedentes de Nacionalidad Extranjera en: Padres, Abuelos, Bisabuelos, otros.

Sí No Especificar _____

Dirección _____

_____ Teléfono _____

Médico evaluador:

Nombre _____ Firma _____

Fecha de inicio de los síntomas □□□□□□

Edad al inicio de los síntomas □□ años □□ meses

Fecha en que se establece el diagnóstico □□□□□□

Edad al momento del diagnóstico □□ años □□ meses

Cumple con los criterios de clasificación para LES propuestos por el ACR

Sí No Número de criterios □□

Existe algún antecedente de Lupus u otra enfermedad autoinmune en la familia

Sí No Especificar:

Enfermedad _____ Parentezco _____

Enfermedad _____ Parentezco _____

Enfermedad _____ Parentezco _____

Enfermedad _____ Parentezco _____

MANIFESTACIONES CLINICAS

I.- SINTOMAS CONSTITUCIONALES

a). Fiebre

b). Pérdida de peso

c). Fatiga

I.- MUCOCUTANEAS

a) Eritema malar

b) Lesiones discoides

d) Fotosensibilidad

c) Ulceras nasales/orales

e) Alopecia

f) Vasculitis cutánea

Otras (especificar):

II. MUSCULOESQUELÉTICAS

a) Artralgias

b) Artritis

c) Mialgias

Otras (especificar):

III. NEUROPSIQUIÁTRICAS

a) Crisis convulsivas

b) Psicosis

c) Síndrome Orgánico Cerebral

d) Mielitis Transversa

e) Cefalea

f) Enfermedad vascular cerebral

g) Neuropatía craneal

h) Neuropatía periférica

i) Corea

Otras (especificar):

IV.- CARDIOVASCULARES

a) Pericarditis

b) Miocarditis

c) Infarto al miocardio

d) Valvulopatía

Otras (especificar):

V.-PULMONARES

a) Pleuritis

b) Neumonitis

c) Hemorragia

d) Hipertensión pulmonar

Otras (especificar):

VI.-GASTROINTESTINALES

a) Pancreatitis

b) Hepatitis

c) Peritonitis

Otras (especificar):

VII.-HEMATOLÓGICAS

a) Trombocitopenia

b) Anemia hemolítica

c) Leucopenia

d) Linfopenia

e) Neutropenia

Otras (especificar):

VIII.-RENALES

Nefritis Sí No

Proteinuria persistente > 0.5g o proteinuria +++ en el EGO Sí No

Cilindros eritrocitarios, granulados, tubulares, de hemoglobina o mixtos Sí No

Eritrocituria 10 eritrocitos por campo Sí No

Elevación de creatinina sérica (1.5 mg/dl) Sí No

Depuración de Creatinina 100 ml/min/1.73 m2 Sí No

Hipertensión arterial Sí No

Biopsia renal Sí No

a) Glomerulonefritis Clase I

b) Glomerulonefritis Clase II

c) Glomerulonefritis Clase III

d) Glomerulonefritis Clase IV

e) Glomerulonefritis Clase V

IX.-TROMBOSIS

a) Arterial

b) Venosa

X.- OTRAS MANIFESTACIONES

ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS:

- | | | | |
|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| a) Anticuerpos antinucleares | <input type="checkbox"/> Positivos | <input type="checkbox"/> Negativos | <input type="checkbox"/> N.D. |
| b) Anticuerpos anti-DNA | <input type="checkbox"/> Positivos | <input type="checkbox"/> Negativos | <input type="checkbox"/> N.D. |
| c) Anticuerpos anti-Ro | <input type="checkbox"/> Positivos | <input type="checkbox"/> Negativos | <input type="checkbox"/> N.D. |
| d) Anticuerpos anti-La | <input type="checkbox"/> Positivos | <input type="checkbox"/> Negativos | <input type="checkbox"/> N.D. |
| e) Anticuerpos anti-Sm | <input type="checkbox"/> Positivos | <input type="checkbox"/> Negativos | <input type="checkbox"/> N.D. |
| f) Anticuerpos RNP | <input type="checkbox"/> Positivos | <input type="checkbox"/> Negativos | <input type="checkbox"/> N.D. |
| g) Anticuerpos anti-Cardiolipina | <input type="checkbox"/> Positivos | <input type="checkbox"/> Negativos | <input type="checkbox"/> N.D. |
| h) Anticoagulante lúpico | <input type="checkbox"/> Positivos | <input type="checkbox"/> Negativos | <input type="checkbox"/> N.D. |

OTROS ESTUDIOS (especificar):

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Positivo | <input type="checkbox"/> Negativo |
| <input type="checkbox"/> Positivo | <input type="checkbox"/> Negativo |
| <input type="checkbox"/> Positivo | <input type="checkbox"/> Negativo |

TRATAMIENTO

| Medicamento | Dosis | No. De meses |
|------------------------|---------------|---------------|
| Prednisona | > 1 mg/kg/día | |
| | < 1 mg/kg/día | |
| Cloroquina | | |
| Metrotexate oral | | |
| Metrotexate parenteral | | |
| Ciclofosfamida VO | | |
| Azatioprina | | |
| Ciclosporina A | | |
| Pulsos IV | Dosis | No. de pulsos |
| Ciclofosfamida | | |
| Metilprednisolona | | |
| Otros | | |

CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN PARA LES

| | | | |
|--|--------------------------|--------------------------|---|
| 1. Rash malar | <input type="checkbox"/> | | Eritema fijo, plano o elevado, en las eminencias malares, que tienden a respetar los pliegues nasolabiales. |
| 2. Lupus discoide cicatrización | <input type="checkbox"/> | | Placas eritematosas elevadas con descamación queratósica adherente y tapones foliculares; puede ocurrir atrófica en las lesiones antiguas. |
| 3. Fotosensibilidad | <input type="checkbox"/> | | Rash que resulta de reacción poco usual a la luz del sol, por historia o por observación del médico. |
| 4. Úlceras orales observada | <input type="checkbox"/> | | Ulceración oral o nasofaríngea, generalmente indolora, por un médico. |
| 5. Artritis periféricas volumen o | <input type="checkbox"/> | | Artritis no erosiva que afecta dos o más articulaciones caracterizada por dolor a la presión, aumento de derrame. |
| 6. Serositis auscultado | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | a) Pleuritis; historia convincente de dolor pleural o frote por un médico, o evidencia de derrame pleural. b) Pericarditis: documentada por EKG o frote o evidencia de derrame pericárdico. |
| 7. Alteración renal | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | a) Proteinuria persistente mayor de 0.5 g por día o mayor de 3+ si no se cuantifica. b) Cilindros celulares: pueden ser de eritrocitos, hemoglobina, granulares, tubulares o mixtos. |
| 8. Alt. Neurológica alteraciones desequilibrio | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | a) Convulsiones; en ausencia de fármacos causales o metabólicas conocidas (uremia, cetoacidosis, o hidroelectrolítico). b) Psicosis: en ausencia de fármacos causales o alteraciones metabólicas conocidas (uremia, cetoacidosis, o hidroelectrolítico). |
| desequilibrio | | <input type="checkbox"/> | |
| 9. Alt. Hematológica | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | a) Anemia hemolítica con reticulocitosis. b) Leucopenia: menos de 4000/mm ³ en dos o más ocasiones c) Linfopenia: menos de 1500/mm ³ en dos o más ocasiones d) Trombocitopenia: menos de 100,000/mm ³ en ausencia de fármacos causales. |
| 10. Alt. Inmunológica | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | a) Células LE positivas b) Anti-DNA: anticuerpos contra DNA nativo títulos anormales. c) Anti-Sm: anticuerpos contra el antígeno nuclear Sm d) Pruebas serológicas falsas positivas para sífilis que han sido positivas por lo menos 6 meses y confirmadas con inmunización del treponema o prueba de FTA. |
| prueba de | | <input type="checkbox"/> | |
| 11. ANA | <input type="checkbox"/> | | Título anormal de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia o un ensayo equivalente en ausencia de fármacos asociados al síndrome de "lupus inducido por drogas. |
| Número de criterios positivos | | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |