



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ANÁLISIS DE SNPs EN LOS GENES *TNF- α* Y *PTNP22* IMPLICADOS
EN LA SUSCEPTIBILIDAD PARA DESARROLLAR LUPUS
ERITEMATOSO SISTÉMICO EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA MEXICANA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ADRIANA HERNÁNDEZ TREJO



MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2008



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente Profesora Marisol López López

Vocal Profesor Fernando García Tamayo

Secretario Profesora Lorena Sofía Orozco Orozco

1er.Suplente Profesora Patricia Elvira Berrón Ruiz

2do.Suplente Profesora Ma. Benita Leonor Fernández Salgado

Sitio donde se desarrolló el tema:

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Enfermedades Multifactoriales en el Instituto Nacional de Medicina Genómica; bajo la dirección de la Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco, jefa de dicho laboratorio.

Asesor del tema: Dra. Lorena Orozco Orozco _____

Sustentante: Adriana Hernández Trejo _____

AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizar una carrera universitaria con una formación íntegra y completa.

A la Dra. Lorena Orozco por la dirección de esta tesis, la paciencia y comprensión para concluir este trabajo.

Al Dr. Rafael Velázquez Cruz por brindarme la oportunidad de colaborar en este proyecto y de esta manera aprender lo que significa la investigación.

A Mirna Morales por el apoyo, la compañía y todos los buenos momentos compartidos los cuales fueron fundamentales.

A mis compañeros del laboratorio Yolanda, Silvia, Lupita, Julián, por las experiencias aprendidas.

A los sinodales que participaron con su supervisión para el desarrollo de esta tesis.

DEDICATORIAS:

A mi Madre, y a la memoria de mi padre † por darme su apoyo y siempre más de lo necesario para concluir mis estudios, Gracias por todo su esfuerzo.

A mi hermana Gaby, y Daniel, por influenciarme en siempre realizar lo que deseamos.

A Iker, por ser fuente de inspiración.

A mis primos Luis y Dorota, por ser para mí un ejemplo de constancia y esfuerzo.

A mi tía Susana y a la memoria de mi tía Isabel †, por sus palabras de aliento y su ayuda incondicional.

A mis amigos, por su constancia y paciencia: Ana (lolita) †, Andy, Tania, Sandy Dante Katy, Hebe, Luisa, Dulce Irasema, Dulce Islas y Oscar, Andrea, Armando(Chairo), Alejandra y Adrian, Miriam, Salomón, Kame, Iris, Chayo, Pato, Quique, Mariana, Chio y Raúl, Marisol, Chio R., Jhon, Paola F. Mauricio, Luis, Braulio, Benji, Marco, Vico, Francisco Preciado, Paco, Chio, Ubaldo y aquellos a quienes no menciono por exceso de memoria.

La velocidad en la escritura es obra de la práctica y del tiempo. Una mano que empieza a escribir no debe precipitarse, no debe actuar tampoco con demasiada lentitud. Estos dos contrastes producen un efecto también peligroso.

Las prisas dan lugar a una escritura desigual y sin normas, la extrema lentitud produce un signo torpe, titubeante y a veces tembloroso. Por lo tanto, hay que escoger un punto medio entre esos dos extremos.

Cuando la mano que se familiariza con los preceptos, ha alcanzado un cierto grado de perfección, puede acelerar sus movimientos progresivamente y adquiere esa gran libertad que se pide a los que están destinados a ocupar empleos.

Paillason, L'art d'écrire en George Jean. La escritura archivo de la memoria.
Aguilar Universal Arqueología 1989.

INDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
II.1 Epidemiología.....	4
II.2 Manifestaciones clínicas generales	5
II.3 Diagnóstico.....	9
II.4 Tratamiento.....	10
II.5 Patogénesis: Alteraciones inmunológicas.....	10
II.6 Bases genéticas del LES: Estudios de ligamiento, asociación y genes candidato.....	14
II.7 Gen <i>PTPN22</i>	19
II.8 Gen <i>TNF-α</i>	23
III. JUSTIFICACIÓN.....	27
IV. OBJETIVOS.....	28
IV.1 General.....	28
IV.2 Particulares.....	28
V. HIPÓTESIS.....	28
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
VI.1 Diseño del estudio.....	29
VI.2 Estrategia general.....	29
VI.3 Estudio clínico.....	32
VI.4 Estudio molecular.....	34
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	48

VIII. RESULTADOS.....	49
IX. DISCUSIÓN.....	55
X. CONCLUSIONES.....	61
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	62
XII. APÉNDICE.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

- **Tabla 1.** Principales manifestaciones clínicas del LES en la niñez.5
- **Tabla 2.** Clasificación de la nefritis lúpica (OMS) 1982.....8
- **Tabla 3.** Criterios de la clasificación de LES (ACR).....9
- **Tabla 4.** Genes candidato en LES.....18
- **Tabla 5.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de SNPs del gen *TNF- α*36
- **Tabla 6.** Condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa del polimorfismo -238 del gen *TNF- α* 38
- **Tabla 7.** Condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa del polimorfismo -308 del gen *TNF- α*39
- **Tabla 8.** Enzimas de restricción utilizadas para los polimorfismos -238 y -308 del gen *TNF- α* 42
- **Tabla 9.** Condiciones para la restricción de la secuencia del polimorfismo -238 del gen *TNF- α* 42
- **Tabla 10.** Condiciones para la restricción de la secuencia del polimorfismo -308 del gen *TNF- α*43
- **Tabla 11.** Diseño de Sondas Taq-Man® para los polimorfismos -238, -308 del gen *TNF- α* , y 1858 T del gen *PTPN22*.....47

- **Tabla 12.** Distribución genotípica y alélica del polimorfismo 1858 C>T del gen *PTPN22* en pacientes pediátricos con LES y controles sanos.....50
- **Tabla 13.** Distribución del alelo 1858 T del gen *PTPN22* en diferentes poblaciones.....51
- **Tabla 14.** Distribución genotípica y alélica del polimorfismo -238 A>G del gen *TNF- α* en pacientes pediátricos con LES y controles sanos.....52
- **Tabla 15.** Distribución genotípica y alélica del polimorfismo -308 G>A del gen *TNF- α* en pacientes pediátricos con LES y controles sanos.....54
- **Tabla 16.** Asociación del polimorfismo del gen *TNF- α* -308 en diferentes poblaciones.....59

ÍNDICE DE FIGURAS

- **Fig. 1.-** Estudios de asociación.....16
- **Fig. 2.-** Sitios potenciales de la actividad de Lyp.....21
- **Fig. 3.-** Efecto del polimorfismo R620W22
- **Fig. 4.-** Locus del gen *TNF- α* en el genoma humano.....25
- **Fig. 5.-** Localización de los distintos polimorfismos en la región promotora del gen *TNF- α*26
- **Fig. 6.-** Reacción en cadena de la polimerasa para los polimorfismos -238 y -308 del gen *TNF- α*41
- **Fig. 7.-** Discriminación alélica de los genes *TNF- α* y *PTPN22*.....45

I. RESUMEN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es el prototipo de las enfermedades autoinmunes. Se caracteriza principalmente por la producción de autoanticuerpos dirigidos contra varios componentes intracelulares, afectando múltiples órganos y sistemas. Esta enfermedad se presenta en individuos genéticamente susceptibles, en los cuales probablemente existe una alteración en la homeostasis de los linfocitos y la tolerancia periférica que puede asociarse a un proceso apoptótico incrementado y a defectos en los mecanismos de eliminación de los autoantígenos generados.

El LES afecta principalmente al sexo femenino (90%) y aproximadamente 20% de todos los casos se manifiesta en la infancia. La incidencia de la enfermedad es mayor en poblaciones hispanas y afroamericanas, y al parecer se presenta de una forma más grave que en otras poblaciones.

Existen fuertes evidencias de que la susceptibilidad a padecer LES es causada por la interacción entre múltiples genes y el medio ambiente.

En los últimos años mediante estudios completos del genoma humano, se han identificado varios loci potenciales de susceptibilidad en LES, ya que estos han mostrado un nivel de ligamiento significativo (1q23, 1q25-31, 1q41-41, 2q35-37, 4p16-15.2, 6p11-21, 12p24 y 16q12). Por otra parte mediante estudios de asociación se han identificado SNP's en genes que codifican para proteínas, los cuales tienen un papel potencial en la patogénesis del LES. Entre los genes candidato que han mostrado asociación en la mayoría de las poblaciones se encuentran los alelos del complejo MHC clase I y clase II, el gen de muerte celular programada *PDCD1*, *IL-10*, *MBL*, *TNF- α* , *PTPN22* entre otros. La asociación que han mostrado estos genes varía de una población a otra, por lo que se requiere de estudios adicionales para sustentar su implicación en el desarrollo de esta patología en cada población.

El *TNF- α* es un gen que juega un papel importante en la regulación de la inflamación y la apoptosis, procesos involucrados en la patogénesis del LES. Ciertas manifestaciones en LES están asociadas con diferencias en la capacidad de producción del *TNF* y se ha sugerido que elementos polimórficos determinan la

capacidad de producción de esta citocina. El alelo TNF2 (A) del polimorfismo –308 A/G está asociado con una producción más alta de *TNF- α* y se propone como un factor de riesgo para LES.

Por otro lado el gen *PTPN22* localizado en el cromosoma 1q13 se encuentra expresado primariamente en células T, juega un papel muy importante en la ruta de señalización de células T, ya que éste codifica para la proteína tirosina fosfatasa intracelular conocida como Lyp, la cual regula cinasas como Csk que participan en la activación de células T.

En este trabajo se propone identificar polimorfismos asociados con la susceptibilidad a padecer LES en población pediátrica mexicana mediante un estudio de asociación casos y controles, bajo la hipótesis de que la asociación de estos SNPs con esta enfermedad son diferentes a los descritos en otras poblaciones y que pueden contribuir a la susceptibilidad o a sus diversas manifestaciones inmunológicas y clínicas.

Esto sin duda, contribuirá a incrementar el conocimiento de los factores genéticos involucrados en la etiopatogenia de esta enfermedad y a mejorar las estrategias de prevención diagnóstico y tratamiento, encaminadas a disminuir su alto costo social-económico. Además con la realización de este proyecto se sentarán las bases para el estudio de otras entidades autoinmunes en nuestro medio.

En el estudio se captaron 261 pacientes menores de 16 años diagnosticados con LES según los criterios establecidos por el Colegio Americano de Reumatología, así como 357 como controles sanos. Los pacientes fueron captados en la consulta externa de Reumatología de los Hospitales de Pediatría, del Centro Médico Nacional S-XXI y Centro Médico La Raza, del Hospital Infantil de México y del Instituto Nacional de Pediatría. El estudio molecular consistió en la extracción, purificación y genotipificación de DNA de cada una de las muestras de acuerdo a las técnicas especificadas, posteriormente se realizó el análisis de las frecuencias genotípica y alélicas en nuestra población y se compararon los resultados obtenidos con otras poblaciones, sugiriéndonos así que el SNP 1858 C/T del gen *PTPN22* se encuentra involucrado en la susceptibilidad de desarrollar LES en

nuestra población de pacientes pediátricos, mientras que los SNPs (-238, -308) del gen *TNF- α* no se encuentran asociados con el riesgo a padecer LES.

II. ANTECEDENTES

Las enfermedades autoinmunes (EAs) son entidades complejas de curso crónico que comprenden un grupo heterogéneo de trastornos y afectan del 4-5% de la población [1]. El prototipo de estas enfermedades es el lupus eritematoso sistémico (LES), que se caracteriza por la producción de autoanticuerpos y la formación de complejos inmunes que se presentan en individuos susceptibles, en donde existe una alteración en la regulación de los linfocitos, una pérdida en la tolerancia periférica y un posible proceso apoptótico incrementado. Esta entidad tiene una etiología multifactorial, donde existe la participación de factores genéticos y ambientales. En los niños, el LES tiene una forma de presentación y un curso más grave que en los adultos [2].

II.1 Epidemiología

El LES puede aparecer a cualquier edad, sin embargo en la mayoría de los pacientes los síntomas aparecen entre los 15 y 40 años de edad [3].

El LES continúa siendo una causa significativa de morbilidad en la edad pediátrica, representando aproximadamente de 15-20% de todos los pacientes [4-6] Este padecimiento predomina en el sexo femenino, con una razón de mujer a varón que oscila entre 3:1 antes de la pubertad y 9:1 después de la pubertad [7,9,10].

La incidencia de LES en la población en general varía de acuerdo a las características de la población estudiada. Como ha sido reportado para adultos, el grupo étnico también influye en la incidencia y en las manifestaciones clínicas del LES pediátrico.

Los niños afroamericanos e hispanos tienen una alta incidencia y en particular en los afroamericanos se ha reportado una alta prevalencia y gravedad de la enfermedad neuro-psiquiátrica (LESNP) y renal [8].

El diagnóstico del LES infantil no es común antes de los 10 años de edad y la edad promedio de presentación es 12,1 años [7,9,10].

II.2 Manifestaciones clínicas generales

Las características clínicas varían dependiendo de la edad y de los órganos afectados. En niños los síntomas generales más comunes son fiebre, astenia, adinamia y pérdida de peso. Del 20-82% presenta afectación renal, 20-74% síntomas músculo esqueléticos, 44-52% eritema malar, 15-30% linfadenopatía y el 15-74% visceromegalia (**Tabla 1**).

Tabla 1. Principales manifestaciones clínicas del LES en la niñez

Rasgos clínicos	Frecuencia	Referencias
Fiebre, fatiga, pérdida de peso	40-74%	[11-13]
Artritis, artralgia	20-74%	[12,14]
Visceromegalia	15-74%	[11-13]
Trastornos Renales	20-82%	[12,14-15]
Eritema malar	44-52%	[11,12]
Linfadenopatías	15-30%	[12-14]

Manifestaciones cutáneas

La afectación cutánea es variada y va desde una fotosensibilidad a la exposición a la luz ultravioleta B con exantema en alas de mariposa sobre las eminencias malares y el puente de la nariz, hasta una dermatitis generalizada. También se presentan úlceras bucales (26-48%), alopecia (7-48%) fenómeno de Raynaud y lesiones crónicas [11,13, 16-18].

Manifestaciones músculo esqueléticas

En las manifestaciones músculo esqueléticas se observa artralgia y artritis en más del 75% de los casos [2], en donde los síntomas tienden a ser variables, presentándose habitualmente como una poliartritis simétrica, no erosiva muy dolorosa, afectando articulaciones grandes y pequeñas como los dedos de las

manos, las muñecas, rodillas y con menos frecuencia hombros, caderas, codos y tobillos. La artritis que se presenta es proliferativa y responde lentamente al tratamiento.

Las manifestaciones músculo esqueléticas también pueden ser secundarias a efectos adversos de los diversos tratamientos utilizados presentándose osteoporosis, necrosis vascular y retraso en el crecimiento [19].

Manifestaciones cardíacas

La miocarditis ocurre en 25% de los niños con LES y se caracteriza clínicamente por falla cardíaca congestiva, cardiomegalia y bradicardia. La válvula mitral es la más comúnmente afectada, seguida por la aorta pulmonar y las válvulas tricúspides. Estos síntomas requieren tratamiento urgente con esteroides e inmunosupresores [20].

Manifestaciones neuropsiquiátricas

El trastorno neuropsiquiátrico es una de las manifestaciones más comunes del LES pediátrico. Este ocurre en un 20-45% de los niños y adolescentes, constituye la tercera causa de mortalidad en esta población y en la mayoría puede manifestarse en el primer año de la enfermedad [2, 21, 22]. Las manifestaciones neuropsiquiátricas son diversas y varían desde una disfunción global del SNC con parálisis y convulsiones, hasta síntomas más leves o focales como cefalea o pérdida de la memoria [2].

Alteraciones hematológicas

Las alteraciones hematológicas son también comunes en el LES pediátrico. La trombocitopenia autoinmune es la manifestación inicial en el 15% de los casos del LES pediátrico y se ha sugerido que entre el 20-30% de los niños que presentan púrpura trombocitopénica idiopática y anticuerpos antinucleares, desarrollarán LES [23]. Posteriormente en el 27-52% de los casos del LES pediátrico, se observa leucopenia, siendo también común la granulocitopenia [5]. Además de las

alteraciones antes mencionadas, cabe destacar que existen trastornos frecuentes en la coagulación.

Afectación pulmonar

En el LES pediátrico el rango de afectación pulmonar es muy variable (5-77%) [22, 24, 25]. Las manifestaciones pulmonares varían desde alteraciones subclínicas hasta formas más complicadas que pueden llevar a la muerte. Las formas más frecuentes de afectación pulmonar incluyen pleuritis, neumonitis, neumonía, neumotórax e hipertensión pulmonar. La mayoría de los niños desarrollan manifestaciones pulmonares en algún momento de la evolución de la enfermedad. La afectación pulmonar asintomática o subclínica en el LES pediátrico puede ser más común de lo que se piensa [19].

Afectación renal

La nefritis lúpica es una de las principales manifestaciones clínicas en la edad pediátrica, aproximadamente un 60-80% de los pacientes la presentan. Existen algunos parámetros asociados con la nefritis, entre los que destacan el sexo, la raza, edad, hipertensión persistente entre otros [15,16].

En 1982, la Organización Mundial de la Salud (OMS), clasificó la nefritis lúpica en 6 categorías basándose en los hallazgos histológicos (**Tabla 2**) [26] siendo la nefropatía grado VI la más común en el LES [19]. 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 (de más de 0.5g/24h ó 3+++ persistente). La presencia de hipertensión arterial y edema periférico usualmente se asocian con las nefropatías en grado III y IV [16].

Tabla 2. Clasificación de la nefritis lúpica OMS (1982)

I Glomérulos Normales

II Nefropatía mesangial

- a) Ensanchamiento mesangial leve o hiper celularidad leve (+).
- b) Hiper celularidad moderada (++)

III Glomerulonefritis proliferativa focal y segmentaria

- a) Lesiones necrotizantes activas
- b) Lesiones activas y esclerosantes
- c) Lesiones esclerosantes

IV Glomerulonefritis proliferativa difusa

- a) Sin lesiones segmentarias
- b) Con lesiones necrotizantes activas
- c) Con lesiones activas y esclerosantes
- d) Con lesiones esclerosantes

V Glomerulonefritis membranosa difusa

- a) Glomerulonefritis membranosa pura
- b) Asociada con lesiones de clase II

VI Glomerulonefritis esclerosante avanzada

II.3 Diagnóstico

El diagnóstico del LES en niños se basa en los mismos criterios que en los adultos [26, 27]. Debido a que no existe un síntoma o hallazgo patognomónico de la enfermedad, el Colegio Americano de Reumatología (ACR) ha establecido criterios clínicos generales para diagnóstico y clasificación de los pacientes. El diagnóstico de LES se establece cuando se cumplen cuatro de los once criterios descritos (Tabla 3) [27].

Tabla 3. Criterios de la clasificación del Lupus Eritematoso Sistémico (ARC)

1. Eritema malar: eritema fijo plano o elevado, que se localiza sobre las prominencias malares, sin afectación de los pliegues nasolabiales.
2. Erupción discoide: placas eritematosas elevadas con descamación queratótica adherente.
3. Fotosensibilidad: erupción cutánea provocada por una reacción inusual de los rayos solares.
4. Úlceras orales: ulceración oral o nasofaríngea usualmente indolora.
5. Artritis no erosiva: involucra articulaciones periféricas, caracterizadas por dolor, tumefacción y derrame.
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 Neumológica: 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.

II.4 Tratamiento

El tratamiento de LES depende de las manifestaciones clínicas y de la presencia o ausencia de afectación de órganos vitales. La mayoría de los niños con LES reciben corticosteroides como la metilprednisona (MEP) e hidroxicloroquina como primer línea de tratamiento, aunque éstos tienen efectos adversos muy agresivos por lo que constituyen una causa importante de morbilidad en el LES pediátrico [19]. La ciclofosfamida intravenosa es comúnmente usada para enfermedad renal proliferativa y patologías involucradas con el SNC, en donde se ha observado una mejoría en los últimos 20 años [28].

Otro fármaco utilizado para el tratamiento de la nefritis lúpica es el mofetil micofenolato, el cual ha mostrado muy buenos resultados en niños que presentan nefritis membranosa.

El tratamiento del LES no solamente es farmacológico, ya que otras medidas son de gran importancia para la evolución del paciente como la protección contra los rayos ultravioleta, el tratamiento y la prevención de las infecciones y de los factores de riesgo cardiovascular entre otros [19].

II.5 Patogénesis

La patogénesis del LES no ha sido elucidada; como se mencionó anteriormente la etiología es multifactorial. Uno de los factores ambientales implicados en la patogénesis del LES es la exposición al sol, ya que el sol emite radiaciones UV en tres bandas del espectro conocidas como bandas A, B y C. Las dos primeras, ultravioleta A (UVA) y ultravioleta B (UVB) son las que lesionan la piel de los pacientes con LES, dañando así depósitos superficiales del DNA de las células y dando como resultado la liberación de sustancias que inducen la formación de anticuerpos anti-DNA, responsable del daño de los tejidos. El virus de Epstein-Barr es otro factor ambiental el cual se sospecha juega un papel importante en la predisposición al LES. Muchos niños y adultos con LES cuando se comparan con individuos sanos se han encontrado con una alta carga de EBV en sangre y altos títulos de anticuerpos anti-EBV [29,30].

Nuevas tecnologías aplicadas a estudios de expresión en genes y la genómica en pacientes con LES han revelado nuevas mutaciones en genes y alteraciones en citocinas que pueden explicar probablemente la enfermedad.

Algunos de los factores que tienen impacto sobre la autoinmunidad sistémica son: defectos en las señales inhibitorias de la activación de linfocitos, defectos en la apoptosis, así como una activación celular incrementada.

Aún no se conoce qué desencadena la autoinmunidad, pero se sabe que factores medioambientales y genéticos son significativos.

La producción de autoanticuerpos es la principal característica en la patogénesis del LES, alrededor de 100 autoanticuerpos han sido descritos en los pacientes; la mayoría de ellos se encuentran asociados a la actividad de la enfermedad [31].

El desarrollo de autoanticuerpos refleja la pérdida de tolerancia de células B y células T, el cual se incrementa si hay respuestas inflamatorias persistentes, por un manejo anormal del material apoptótico, por la formación de complejos inmunes, o por la presentación anormal de autoantígenos [32].

Alteraciones Inmunológicas

Esta enfermedad se caracteriza por diversas anomalías en las respuestas inmunes que involucran hiperreactividad de células B, células T, células dendríticas, funciones fagocíticas anormales y defectos en la eliminación de complejos inmunes y del material apoptótico [33].

Por otro lado, independientemente de la edad de presentación, los pacientes con LES presentan hipergammaglobulinemia y un aumento en los títulos de los autoanticuerpos en el suero. Así mismo pacientes pediátricos y adultos muestran alteraciones en células B [34], en células naive y en el número de células B de memoria [35].

Células B y autoanticuerpos

Las células B juegan un papel muy importante en la patogénesis de la enfermedad. En pacientes con LES se presenta una marcada linfopenia, afectando células naive y células B de memoria, así como una expansión en células que expresan CD38 [35]. A pesar de los bajos niveles de linfocitos circulantes, las células B son más propensas a la activación policlonal por antígenos, citocinas y otros estímulos, los cuales llevan a hipergammaglobulinemia, producción de autoanticuerpos y la formación de complejos inmunes [36]. El LES también está asociado con el incremento en los niveles de *IL-10* y de *IL-6* que promueven la diferenciación de células plasmáticas. Los linfocitos B participan en la respuesta inmune humoral y dirigen la diferenciación de células del sistema inmune. En individuos sanos se ha demostrado que los linfocitos B en la médula ósea y los que migran a sangre periférica expresan anticuerpos autorreactivos. Sin embargo, la mayoría de estos linfocitos B autorreactivos son eliminados del repertorio de linfocitos B naive en dos estadios de su desarrollo [37]. En pacientes con LES se observan anomalías en células B, lo cual puede ser reflejo de múltiples factores genéticos que afectan la función intrínseca de éstas, por ejemplo anomalías durante la diferenciación de células B en tejidos linfoides secundarios pueden permitir la generación y la supervivencia de las células del sistema inmune que secretan autoantígenos patogénicos.

Los autoanticuerpos dirigidos contra componentes de cromatina (dsADN, nucleosomas e histonas) son de gran importancia en LES ya que se han reportado niveles altos de anti-dsADN relacionados con la actividad de la enfermedad [38]. Sin embargo varios estudios han mostrado inconsistencias en los datos relacionados con el título de anti-dsADN y la actividad de la enfermedad, lo que podría ser debido a diferentes variables como el tiempo de obtención de la muestra, el uso de diferentes técnicas, la evaluación de distintas subpoblaciones de anticuerpos entre otros [39].

Células T

Se han descrito numerosas anormalidades en la función de células T en pacientes con LES. Como mencionamos anteriormente una fuerte evidencia de esto, es la marcada linfopenia, los defectos funcionales como la disminución de la actividad citotóxica, menor capacidad de controlar la producción de autoanticuerpos por los linfocitos B y algunos defectos en la producción de citocinas [33]. Las células T de pacientes con LES, exhiben respuestas de señalización aceleradas sobre TCR/CD3 comparado con células de sujetos sanos [40-43], así como respuestas aberrantes a ciertos estímulos como a una mayor producción de Ca^{2+} y menor secreción de *IFN- α* e *IL-2* [19,44]. Estos linfocitos expresan marcadores de activación como DR+ [43], lo cual facilita la producción de inmunoglobulinas [45]. Se piensa que los linfocitos T lúpicos utilizan mecanismos diferentes de supervivencia ante la coestimulación comparado con linfocitos T normales.

Se ha descrito que los linfocitos T activados de pacientes con LES son más resistentes a la anergia y a la apoptosis debido a un aumento en la expresión de la ciclooxigenasa-2 (*COX-2*), la cual por medio de distintos mecanismos atenúa la señal de FAS que es un mediador de la apoptosis [46].

Apoptosis

Los autoantígenos en pacientes con LES se encuentran expuestos en la superficie de las células dendríticas, en donde el sistema inmune se encarga de detectarlos [47].

En condiciones normales, el mecanismo de eliminación de estos cuerpos apoptóticos es realizado por las células dendríticas inmaduras, las cuales se encargan de presentarlos para inducir tolerancia a los linfocitos T [48].

Una deficiente eliminación de estos linfocitos T autorreactivos, facilitan la pérdida de la tolerancia periférica.

II.6 Bases genéticas del LES

Existen varias evidencias que sugieren un fuerte componente genético en LES [49]. El riesgo de los familiares a padecer la enfermedad es 20 veces mayor que la población en general [50,51]. Se ha documentado una alta agregación familiar 10-16% y la concordancia en gemelos monocigóticos (24-58%) es 10 veces mayor que en gemelos dicigóticos (2-5%) [27,52].

Por otro lado la heredabilidad (fracción de la enfermedad que puede ser atribuida a los genes) estimada para esta enfermedad es del 66% [52].

Datos epidemiológicos sugieren que la combinación de varios genes son los que causan la predisposición a LES [53].

Existen diferentes estrategias para la identificación de los factores genéticos involucrados en las enfermedades complejas, como el caso de LES:

1. Análisis de ligamiento; 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. La evidencia estadística de ligamiento se conoce como LOD score, que es el logaritmo de base 10 del cociente de 2 probabilidades: la probabilidad de que dos loci se encuentren ligados entre la posibilidad de que no haya ligamiento. Convencionalmente se ha considerado que un LOD score mayor de tres es una evidencia de ligamiento entre dos loci específicos, mientras que valores negativos o menores de tres, nos indican que el ligamiento es poco probable. De esta manera, el objetivo del análisis de ligamiento genético es ayudar a la identificación y al mapeo de los genes que provocan desórdenes hereditarios y los cuáles no han podido ser abordados a través de análisis bioquímicos o moleculares. Para poder realizar un análisis de ligamiento es necesario que la familia sea informativa respecto a los loci en cuestión, para poder determinar la fase. Es decir para el análisis de ligamiento es necesario que uno de los progenitores sea heterocigoto para los loci marcadores. Los loci más informativos para el análisis de ligamiento son aquellos que son muy polimórficos y heterocigotos. Además de los puntos anteriormente mencionados sabemos que para la detección de ligamiento las

familias con grandes pedigrees y varios individuos afectados son de mayor utilidad, siendo un problema para este tipo de análisis, lo que es una limitante del estudio de las enfermedades multifactoriales.

2. Análisis de asociación; en este tipo de estudios se compara la frecuencia de un marcador entre casos no relacionados y controles y se investiga su coocurrencia con la enfermedad a nivel de la población (**Fig.1**) [54]. Una asociación significativa del marcador con la enfermedad sugiere un gen candidato en la etiología de la enfermedad. Algunas de las causas de asociación son:

- a) Efecto directo del marcador alélico en estudio, el cual se refiere a que el marcador utilizado sea un polimorfismo que altere la secuencia de aminoácidos o la transcripción, por lo que los diferentes alelos pueden mostrar diferencias en la calidad y cantidad del producto génico y esto generar un efecto directo en la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad.
- b) Desequilibrio de ligamiento, en donde si la causa de asociación se debe a que el gen portador de la mutación se encuentra en estrecha proximidad al marcador polimórfico. El desequilibrio de ligamiento depende del efecto fundador ejercido sobre la población. Es decir un alelo determinado (A) puede estar asociado con la enfermedad en una población determinada, mientras que en otra población puede estar asociado otro alelo. O en poblaciones muy mezcladas podría no existir asociación alguna con estos alelos.
- c) Estratificación de la población, cuando en una población existen grupos que no se mezclan, podrían condicionar a que tanto la enfermedad como algunos marcadores alélicos sean más comunes en individuos de un cierto sub-grupo que en otro, lo que podría originar falsos positivos [54].

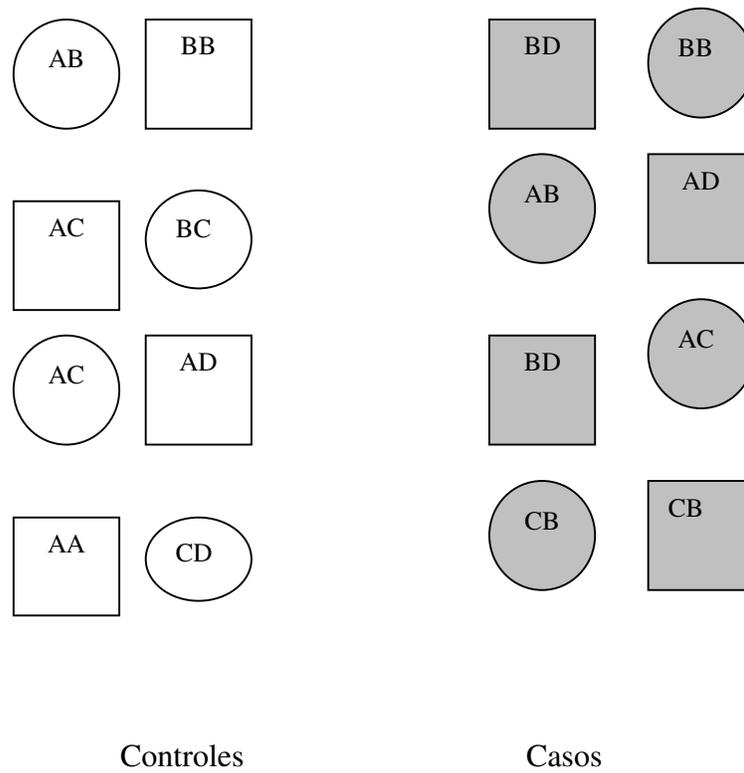


Figura 1. Estudios de asociación. En donde observamos que el alelo B se encuentra más frecuente entre los casos que entre los controles [54].

Estudios de ligamiento usando marcadores moleculares como microsatélites y polimorfismos de un solo nucleótido (**SNPs**) han identificado un gran número de loci ligados a LES. Estos incluyen: 1q23 (*FcγRIIA*, *FcγRIIB*, *FcγRIIIA*), 1q25-31, 1q41-42 (*PARP* o *ADP-ribosiltransferasa*), 2q35-37 (*PDCD1*), 4p16-15.2, 6p11-21 (MHC haplotipos) y 16q12, entre otros [52, 55- 57].

Dentro de los estudios de asociación, los marcadores genéticos de elección son los SNPs que son los marcadores bialélicos más frecuentes en el genoma. Estos SNPs, o estas variaciones genéticas, son sustituciones de una sola base en una posición o región específica en la secuencia del DNA, que comprenden el 90% de la cantidad total de variación en el genoma humano [58] En promedio se estima que existen aproximadamente 10 millones de SNPs por genoma haploide [59].

Genes Candidato

Mediante estudios de asociación se han identificado SNPs (variaciones de un solo nucleótido) en genes que codifican para proteínas que tienen un efecto potencial en el fenotipo de LES (genes candidato). Diversos estudios han logrado identificar varios genes, que muestran una fuerte evidencia de asociación alélica con LES. Aunque esta asociación resulta controversial debido a que no han sido replicados en todas las poblaciones[60].

Entre los genes que han mostrado resultados más contundentes se encuentran múltiples alelos de la región HLA [Harley y cols., 1998], *PDCD1* [Prokunina y cols., 2002], *IL-10* [Gibson y cols., 2001], componentes del complemento C2 [Arnett y Reveille, 1992], C4 [Tsao, 2002], factor de necrosis tumoral (*TNF-α*), receptores para la fracción Fc de IgG [Zúñiga y cols. 2001, Hatta y cols., 1999, González-Escribano y cols., 2002], proteína de unión a manosa (MBL)[Sullivan y cols., 1999, Davies y cols., 1997], *FAS*, *FASL* y *BCL2* [Kelly cols., 2002], (*IRF5*), entre otros (**Tabla 4**) [61].

Tabla4. Genes Candidato en LES

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

II.7 Gen *PTPN22* (Proteína Tirosina Fosfatasa)

La fosforilación de tirosinas es catalizada por proteínas tirosin cinasas las cuales están representadas por 90 genes en el genoma humano [41]. Esta fosforilación es un mecanismo fundamental para numerosos aspectos importantes de la fisiología de los eucariontes, así como en la salud y en la enfermedad [40]. Este mecanismo es utilizado para la comunicación intercelular, la forma y la movilidad de éstas, para decisiones de proliferar versus diferenciarse, procesos de regulación y transcripción de genes, procesamiento de mRNA y en el transporte de moléculas dentro y fuera de la célula. La fosforilación de tirosinas también juega un papel importante en la coordinación de procesos entre células vecinas en la embriogénesis, en el desarrollo de órganos, en la homeostasis tisular y en el sistema inmune y por lo tanto, anormalidades en este proceso podrían estar involucrados en la patogénesis de numerosos desórdenes hereditarios y enfermedades adquiridas como cáncer y deficiencias del sistema inmune. Esta fosforilación es regulada por la misma acción balanceada de las proteínas tirosin cinasas (PTKs) y las proteínas tirosin fosfatasa (PTPs) [41].

Aunque los datos actualmente disponibles sugieren que el gen *PTPN22* está expresado principalmente en células T, está ahora claro que esta molécula también se expresa en otros tipos de células como linfocitos B, monocitos, células NK y neutrófilos [62,63]. Este gen se encuentra localizado en el cromosoma 1p13 y como codifica para una proteína tirosin fosfatasa llamada fosfatasa linfoide específica o Lyp, la cual es una proteína tirosina fosfatasa de 110 kDa que consiste de un dominio fosfatasa N-terminal y un C terminal no catalítico con dominios ricos en prolina, regulando tirosin cinasas que participan en la activación de células T [64]. *PTPN22* puede además unirse a otras proteínas como c-Cb1 y Grb2.

Lyp es una proteína específica del tejido hematopoyético, la cual se piensa inhibe la activación de linfocitos T, a través de la asociación de sus dominios ricos en prolina (P1) con el dominio SH3 de la proteína tirosin cinasa Csk, combinación que funciona como importante supresor de la familia Scr de cinasa Lck y Fyn, éste último media la señalización del TCR (Fig. 2) [65].

El locus del gen *PTPN22* (1p13) ha mostrado ligamiento con LES. Recientemente se ha identificado un SNP funcional en este gen. Este SNP (rs2476601) consiste en el cambio de una C por una T en la posición 1858 del gen. El polimorfismo 1858 C/T está situado dentro de la región codificadora para el dominio SH3 de la proteína, y resulta en la sustitución del aminoácido de arginina por triptofano en el codón 620 (R620W) de Lyp. De este modo, el alelo 620W asociado a la enfermedad es probable que cause cambios en la regulación de Lck, resultando en una pérdida de la regulación negativa de la señalización del receptor de células T. El dominio SH3 es importante para la unión del carbono terminal Scr y la tirosin cinasa (Csk). Se ha demostrado que la enfermedad está asociada con el alelo T 1858C>T que rompe el sitio de unión de la cinasa Csk y la fosfatasa Lyp.

Se ha propuesto recientemente que un aumento en la actividad del gen podría incrementar el umbral requerido para la efectiva señalización en el desarrollo de timocitos, resultando en la ausencia o disminución de la selección negativa de células T autoreactivas (**Fig. 3**). Sin embargo el efecto funcional del alelo 620W en la función de las células T en humanos no se ha demostrado todavía. No se conoce si *PTPN22* es un factor de riesgo para el desarrollo de autoanticuerpos per se, o confiere el riesgo para la progresión de la enfermedad después de la aparición de autoanticuerpos.

Una asociación entre la alteración de Lyp y la autoinmunidad está relacionada con el papel de las PTPs en la atenuación de rutas de señalización a la reactividad celular inmune. Por otro lado Lyp se puede unir también a Grb2, la cual es una molécula adaptadora de señalización que está involucrada en la coestimulación mediada por CD28 y en la activación de las células T. Además Lyp también se ha implicado en la degradación de otros efectores de la señalización, un papel que puede reflejar su unión y modulación de la molécula adaptadora c-Cb1, una ligasa ubiquitina con efectos inhibidores en la activación de células linfoides atribuida en parte a su actividad de proteína degradante.

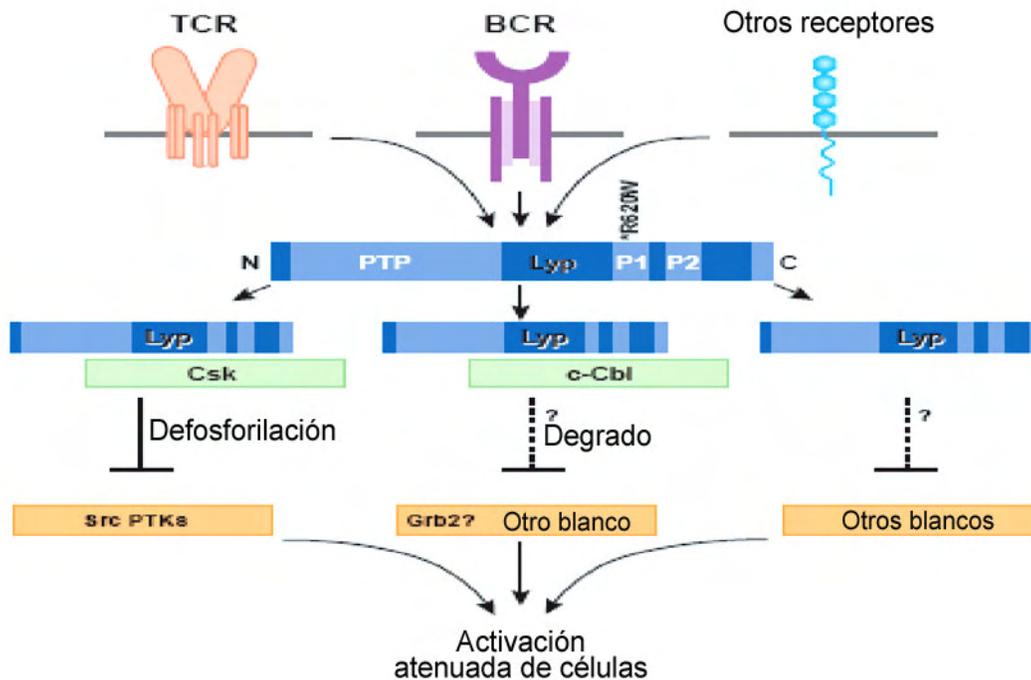


Figura 2. Sitios potenciales conocidos de la actividad de Lyp. Lyp actúa como regulador negativo del TCR y posiblemente del receptor de antígenos (BCR) y otros receptores y promotores de crecimiento, los cuales actúan en combinación con c-Cbl para inhibir a la familia Src de las proteínas tirosin cinasas (PTKs) y otros blancos que atenúan la activación celular [65].

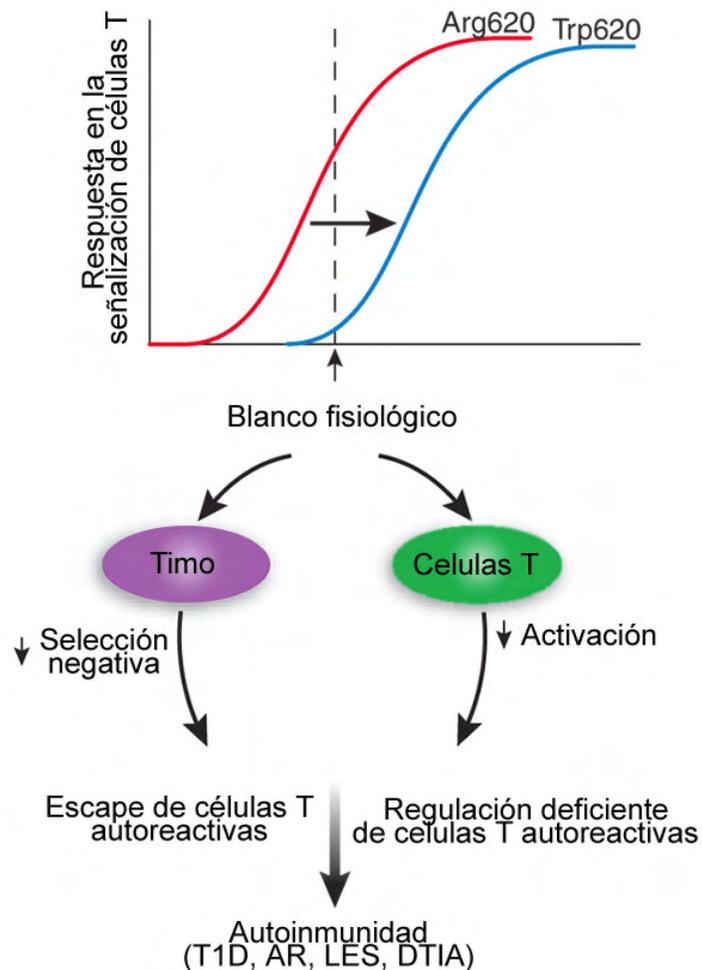


Figura 3. Efecto del polimorfismo R620W. El resultado de la sustitución R620W pronostica el aumento del umbral de señalización del TCR. En el timo este cambio en la señalización del umbral podría resultar en la selección positiva de timocitos dando como resultado la aparición de células T autoreactivas en la periferia. Un segundo mecanismo podría involucrar una señalización reducida en células T reguladoras, produciendo una deficiencia en la regulación de células T autoreactivas. Cada uno de estos mecanismos podrían dirigir a un nivel de susceptibilidad para desórdenes autoinmunes como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y diabetes tipo 1 [66].

II.8 TNF- α (factor de necrosis tumoral alpha)

El factor de necrosis tumoral-alpha (TNF- α) es una citocina que tiene una gran cantidad de actividades pro-inflamatorias [67,68]. Es producido principalmente por macrófagos y monocitos, aunque también es secretado por otros tipos de células [69]. TNF- α es una proteína de membrana de 26 kDa (pro-TNF) involucrada en procesos enzimáticos [70,71], para liberar una molécula soluble de 17 kDa (TNF- α), que es una proteína glicosilada, la cual puede unirse subsecuentemente a otros receptores como el receptor 1 (TNF-R1) y el receptor 2 (TNF-R2) de 55 y 75 kDa, que se encuentran ampliamente distribuidos en las distintas líneas celulares [72].

Después de la interacción de estos receptores con TNF- α se desencadena una gran variedad de respuestas, que pueden afectar la regulación de un gran número de genes [68].

TNF- α aumenta la expresión del MHC clase I en células T activadas, promueve la proliferación de células T dependientes de IL-2 y es un cofactor en la producción de células B y en la producción de inmunoglobulinas [73], además de su papel en la regulación de la inflamación y apoptosis, dos procesos involucrados en la patogénesis de LES.

Varias alteraciones en el metabolismo de TNF- α han sido implicadas en diversos desórdenes.

Recientes reportes mostraron el papel de TNF- α en enfermedades autoinmunes y en diferentes infecciones como ejemplo, se ha asociado a desórdenes como artritis reumatoide [74], LES [75], enfermedad de Crohn's [76], malaria cerebral [77] y leishmaniasis [78]. Estudios más recientes han dado evidencias del papel de TNF- α en obesidad y en la resistencia a la insulina [79,80].

En condiciones fisiológicas posee actividad antitumoral, antiviral y antimicrobiana, induce el crecimiento tisular, diferenciación de tejidos e inmunorregulación. Por poseer efectos sobre la adhesión leucocitaria, actividad pro-coagulante e influir sobre la vascularización, TNF- α puede llegar a tener repercusiones a gran escala en el organismo como shock séptico y coagulación intravascular diseminada [81].

El gen que codifica a *TNF- α* está ubicado en la región MHC clase III del brazo corto del cromosoma 6, en la región p21, entre los loci HLA-B (región del MHC clase I) y HLA-DR (MHC clase II) **(Fig. 4) [81]**.

La expresión de *TNF- α* está genéticamente determinada, esto es, contiene sitios polimórficos intragénicos que están relacionados con la secreción intracelular de *TNF- α* **[75, 82, 83]**, siendo esta una evidencia de la regulación transcripcional de la expresión del gen **[84, 85]**.

En la región promotora se han descrito varios polimorfismos, los cuáles se encuentran asociados a diversas enfermedades **(Fig. 5) [81]** de éstos los más importantes son : -308 G/A, -238 G/A.

Se ha observado que pacientes con LES tienen niveles elevados de *TNF- α* , lo que se ha correlacionado con la presencia de la enfermedad **[86]**.

Ciertas manifestaciones en LES están asociadas con diferencias en la capacidad de producción de *TNF- α* y se ha sugerido la presencia de ligamiento entre secuencias polimórficas de *TNF- α* y la región HLA clase II, determinan la capacidad de producción de *TNF- α* **[75]**.

El primero de estos SNPs (-238 G/A) se localiza en la posición -238 en el sitio de inicio de la transcripción, en donde la presencia de adenina (A) define el alelo menor *TNF-238 A*, y la presencia de guanina (G) define el alelo más común *TNF-238G* **[87]**.

El segundo polimorfismo está localizado en la posición -308 G/A en donde la presencia del alelo G define el *TNF-308 T1*, y el alelo A define el *TNF-308 T2* **[88]**.

El alelo A se ha encontrado asociado a LES, sin embargo esto se ha atribuido a que está en desequilibrio de ligamiento con los alelos HLA-DR3, aunque esto no se ha demostrado.

La asociación de los diferentes alelos de susceptibilidad es particular en las diferentes poblaciones, por ejemplo en la población Caucásica, el alelo *TNF2*, se ha asociado con la susceptibilidad a padecer LES. En pacientes de Sudáfrica, se ha demostrado que el alelo *TNF2* y el HLA-DR contribuyen independientemente para la susceptibilidad al LES, a diferencia de la población Caucásica en donde el alelo *TNF2* está en desequilibrio de ligamiento con HLA-DR3 **[89]**.

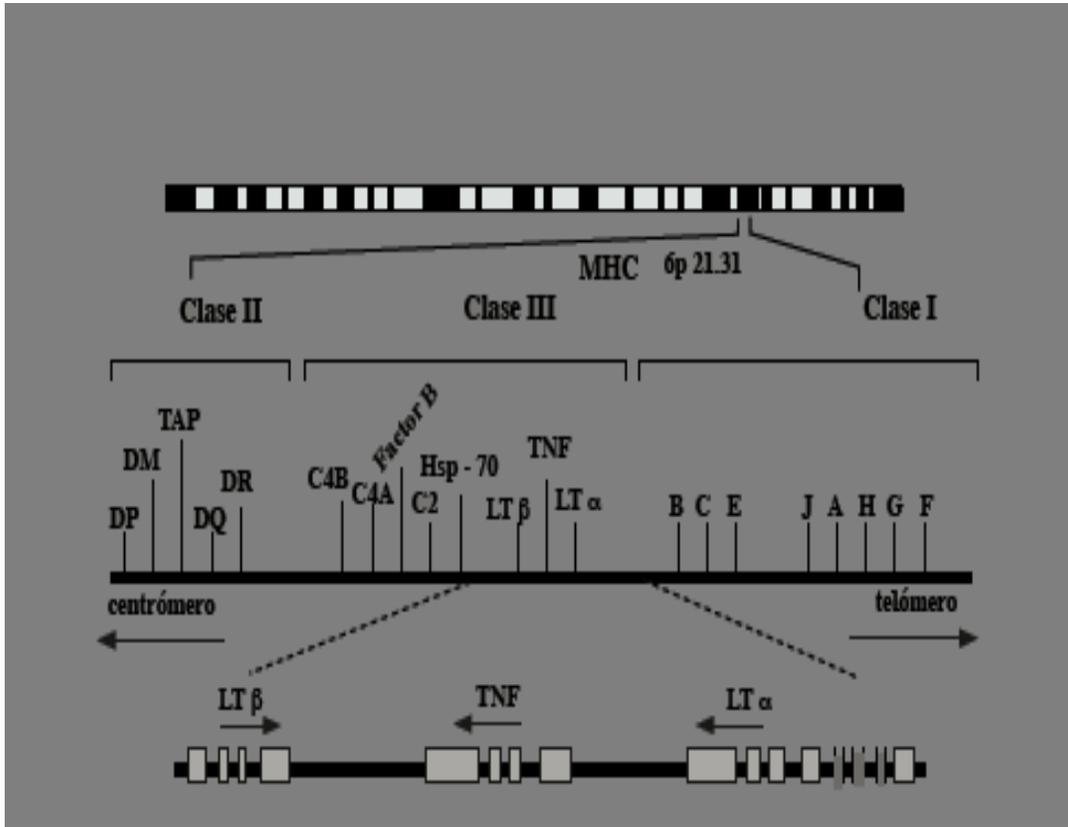


Figura 4. Locus del gen *TNF-α* en el genoma humano [81].

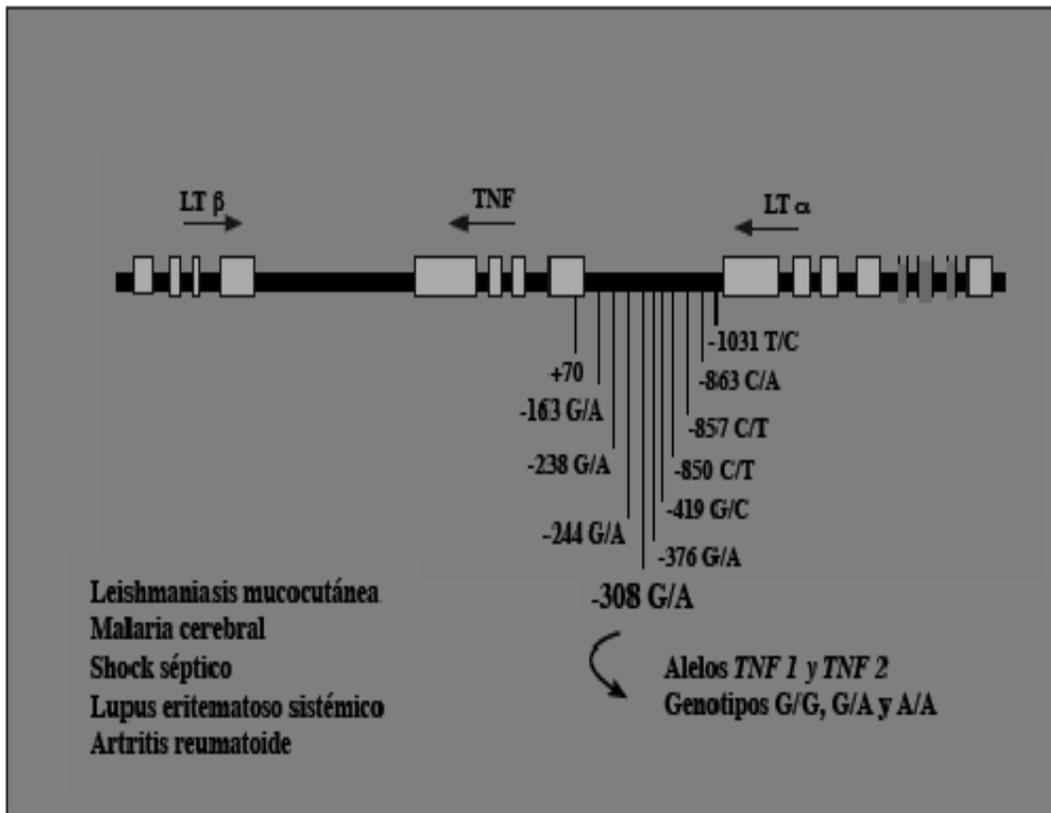


Figura 5. Localización de los distintos polimorfismos en la región promotora del gen *TNF-α* [81].

III. JUSTIFICACIÓN

A la fecha existen pocos estudios sobre las bases genéticas del LES en población mexicana y estos se encuentran enfocados principalmente a población adulta; sin embargo, debido a que LES es una de las enfermedades autoinmunes que se presentan con mayor gravedad en la infancia representando un elevado costo socio-económico, que afecta principalmente al sexo femenino alcanzando una incidencia máxima después de la adolescencia y que actualmente se conoce poco de la etiopatogenia es necesario identificar los posibles factores genéticos de riesgo existentes en población pediátrica mexicana que se encuentran asociados al fenotipo de la enfermedad. De esta manera, el conocimiento generado se pueda utilizar para implementar medidas preventivas, de diagnóstico y tratamiento enfocadas a darle una mejor calidad de vida al paciente.

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

- ❖ Determinar si los SNPs localizados en los genes *TNF- α* y *PTPN22* se encuentran asociados a la susceptibilidad para desarrollar LES en población pediátrica mexicana.

IV.2 Particulares

- ❖ Determinar la frecuencia de los SNPs -238 G/A, -308 G/A y 1858 C/T localizados en los genes *TNF- α* y *PTPN22* en una muestra de individuos sanos y pacientes con LES en población pediátrica mestizo mexicana.
- ❖ Determinar si existe asociación de estos SNPs con la susceptibilidad para desarrollar LES en población mexicana.
- ❖ Comparar las frecuencias analizadas con otras poblaciones estudiadas.

V. HIPÓTESIS

Los SNPs -238 G/A, -301 G/A y 1850 C/T localizados en los genes *TNF- α* y *PTPN22* se encuentran asociados a la susceptibilidad para desarrollar LES en población pediátrica mexicana.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

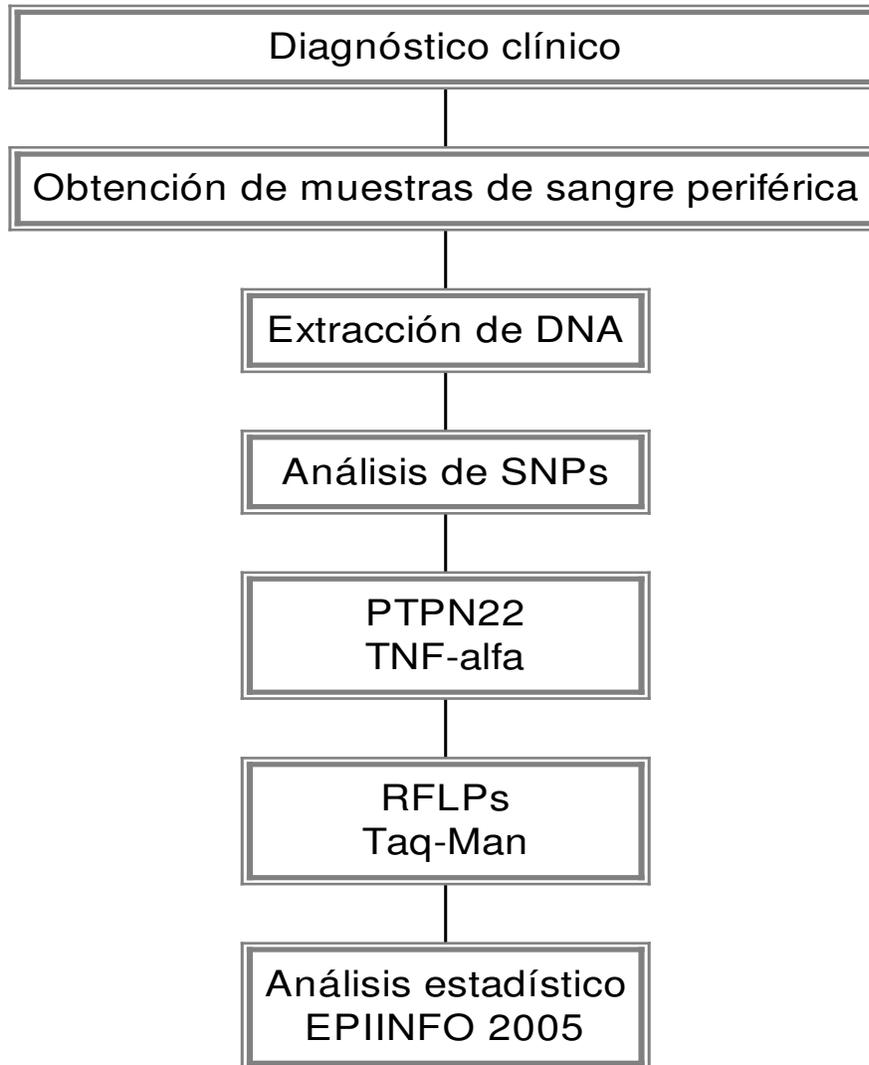
VI.1 Diseño del estudio: Estudio de casos y controles, transversal, prospectivo y comparativo.

VI.2 Estrategia general:

- ❖ Población de estudio. Se capturaron 250 pacientes con diagnóstico de LES antes de los 16 años de edad, de acuerdo con los criterios del ACR. Las muestras fueron obtenidas de los pacientes y familiares que aceptaron firmar la carta de consentimiento informado (anexo 1). Los pacientes se capturaron en la consulta externa de reumatología de los Hospitales de Pediatría, del Centro Médico Nacional S-XXI, Centro Médico “La Raza”, Hospital Infantil de México e Instituto Nacional de Pediatría. Se incluyeron como controles 350 individuos sin antecedentes de enfermedades autoinmunes o crónicas y captados de un banco de sangre.
- ❖ En todos los casos se procedió a la extracción del DNA genómico a partir de leucocitos de sangre periférica (5-10 ml) con EDTA como anticoagulante, utilizando la técnica convencional de fenol-cloroformo y precipitación con etanol [90]. Alternativamente la extracción de DNA se realizó mediante un Kit PUREGENE (Gentra Systems, USA). La integridad del DNA fué verificada en un gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio.
- ❖ Se diseñaron los oligonucleótidos (**Tabla 5**) y las sondas (**Tabla 11**) correspondientes para cada análisis.
- ❖ El análisis molecular para la genotipificación de los SNPs se realizó por diferentes metodologías como **Taq-Man**® y **RFLPs** (fragmentos de restricción de longitud polimórfica).

- ❖ La asociación se determinó a través del software StatCalc (Epi Info 2005; Centers for disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA). Valores de P por debajo de 0.05 se consideraron como estadísticamente significativos.

ESTRATEGIA GENERAL



VI.3 Estudio clínico:

- ❖ Se captaron 250 pacientes diagnosticados clínicamente y por estudios de laboratorio y gabinete con LES antes de los 16 años de edad, tomando en cuenta los criterios del ACR, así como 355 controles sanos. Los pacientes se captaron en la consulta externa de reumatología de los Hospitales de Pediatría, Centro Médico Nacional S-XXI, Centro Médico “La Raza”, Hospital Infantil de México e Instituto Nacional de Pediatría.

VI.3.1 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 establecidos por el ACR y que aceptaron firmar la carta de consentimiento informado. Se incluyeron también controles sanos mayores de 18 años, sin antecedentes de enfermedades autoinmunes (determinado por la aplicación de un cuestionario), pareados por sexo. Todos los individuos eran mestizos- mexicanos. Se consideraron como mestizos- mexicanos, aquellos individuos quienes en sus dos últimas generaciones hayan nacido en México y que no refieran antecedentes extranjeros.

VI.3.2 Criterios de Exclusión:

- ❖ Pacientes con cualquier enfermedad crónica o autoinmune. Controles con SIDA, hepatitis u otra enfermedad infecto-contagiosa, con antecedentes de enfermedades autoinmunes, por razones de seguridad.
- ❖ Los pacientes transfundidos en los últimos 3 meses fueron excluidos en forma temporal.

VI.3.3 Cálculo de tamaño de muestra:

El tamaño de la muestra requerido para el estudio fue estimado de acuerdo a lo siguiente:

- ❖ Las frecuencias alélicas previamente reportadas de los SNPs
- ❖ El valor de la prevalencia de la enfermedad en la población (K_p), debido a que no existen datos de prevalencia de LES en población mexicana, se tomó el valor más bajo de la enfermedad reportada en una población latinoamericana (brasileña) que es de 0.01% [91].
- ❖ El poder deseado es del 80% con un nivel de significancia es de 0.05, con una hipótesis alternativa de 2 colas.
- ❖ Se utilizó un rango de valores de riesgo relativo, que abarca los descritos para los SNPs a analizar, para detectar o descartar una asociación con los mismos odds ratio detectada en estudios previos (odds ratio de 1.8 para *PTPN22* y de 3.62 para *TNF- α*) [92].
- ❖ Se utilizó un límite de confianza del 95% ($1-\alpha=95$), 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.
- ❖ De esta manera el número de tamaño de muestra requerido para nuestro estudio fue de: 206 pacientes, teniendo un poder estadístico del 80%.

VI.4 Estudio molecular:

VI.4.1 Extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica por medio de la técnica fenol-cloroformo y precipitación con etanol:

Se colectó una muestra de 10-15 ml de sangre periférica en tubos con EDTA al 5% como anticoagulante. Se centrifugaron las muestras a 2,500-3,000 rpm durante 20 min (para separar eritrocitos, leucocitos y plasma). Se tomó la capa de leucocitos y se vació a un tubo estéril. Se resuspendieron en 6 ml de amortiguador para lisis de células rojas (RCLB), el cual contiene Tris-HCl 10 Mm, pH=7.6, MgCl₂ 5Mm y NaCl 10 Mm, para eliminar eritrocitos que hubieran quedado en la muestra. La mezcla anterior se centrifugó a 2, 500 rpm/10 min, para separar los leucocitos de otros componentes, se decantó el líquido y se lavó el botón de la misma forma. Posteriormente se centrifugó a 2, 500 rpm durante 10 min, se decantó el líquido y se resuspendió el botón en 2 ml de amortiguador (WCLB) el cual contiene Tris-HCl 10 mM pH=7.6, EDTA 10 Mm pH=8.0, NaCl 50 mM, SDS 0.2% y proteinasa K=200 mg/ml. Se tapó el tubo con parafilm y se incubó a 42°C en baño maría durante toda la noche para que la proteinasa K degradara las proteínas. Se agregaron 2 ml de fenol (pH>7.6) amortiguado con amortiguador Tris- 1 M, se agitó con vortex durante 20 segundos y después se agitó suavemente durante 10 min. Se centrifugó a 2, 500 rpm durante 10 min. Se pasó la fase acuosa a un tubo previamente identificado y evitando remover la fase intermedia (proteica) con ayuda de una pipeta Pasteur.

Se agregó a cada tubo 1 ml de fenol amortiguado con Tris 1 M y 1 ml de cloroformo y se agitó suavemente durante 10 min. Las muestras se centrifugaron a 2, 500 rpm durante 10 min se extrajo la fase acuosa y se puso en un tubo estéril. Se agregaron 2 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo y se agitó suavemente durante 10 min. Se centrifugó a 2, 500 rpm durante 10 min, se extrajo la fase acuosa y finalmente se agregó 60 µl de NaCl 1 M y etanol 6 M. El DNA se recuperó con un asa de vidrio y se enjuagó con etanol al 70%. Posteriormente se dejó secando hasta la evaporación total del etanol y se resuspendió en 200 µl de agua bidestilada estéril.

Se verificó la integridad del DNA extraído en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (5 mg/ml). La electroforesis se corrió a 100 volts por 20 min y se observó con un transluminador con luz ultravioleta.

VI.4.2 Extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica por medio de un Kit comercial GENTRA:

Se centrifugó la muestra de sangre total (periférica) a 2,500-3,000 rpm durante 20 min. Una vez centrifugada la muestra se extrajo con sumo cuidado la capa de leucocitos formada en la interfase del plasma y los glóbulos rojos. Esto se realizó con una pipeta Pasteur y en un tubo limpio y seco. Al tubo con los leucocitos, se le agregaron de 8-10 ml de RCLB (Red Cell Lysis Buffer, el cual contenía: Tris-HCl 10 Mm pH 7.6, MgCl₂ 5Mm y NaCl 10 mM) tratando de que se llene tres cuartas partes del volumen del tubo. Se agitó vigorosamente la muestra en un vortex cerca de 2 minutos. Se centrifugó 2,500-3,000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se agregó el mismo volumen de RCLB. Se realizó un nuevo lavado centrifugando 2,500-3,000 rpm/10 minutos. Al sedimento obtenido se le adicionaron 500 µl de RCLB agitando vigorosamente en vortex hasta resuspender totalmente el sedimento. Se agregaron 3 ml de WCLB (White Cell Lysis Buffer, el cual contiene Tris-HCl 10 mM pH7.6, EDTA 10 Mm pH 8.0, NaCl 50 Mm, SDS 0.2%) agitando vigorosamente en vortex. Se agregó 1 ml de precipitador de proteínas agitando el tubo x 20 segundos. Se centrifugó la muestra a 3500 rpm x 5 minutos transfiriendo el sobrenadante a un tubo limpio y seco. Para la precipitación del DNA se agregó isopropanol al 100% en proporción 1:2 o 1:1 al volumen de sobrenadante obtenido en el paso anterior, se agitó suavemente por inversión, hasta obtener las fibras de DNA. Se evitó agitar vigorosamente para no compactar las fibras de DNA, lo que haría más difícil el trabajo. Se retiró el DNA con ayuda de una pipeta de punta en gancho, realizando movimientos giratorios en torno a las hebras formadas. Se secó al aire y a temperatura ambiente. Para el lavado del DNA en un tubo limpio se colocó cerca de 1 ml de etanol al 70% y se enjuagó el DNA por inmersión, introduciendo y retirando la punta de la pipeta

varias veces y con mucho cuidado, enseguida se secó al aire y a temperatura ambiente. En un microtubo rotulado el cual contiene 90 µl de solución hidratante, el DNA se suspendió con movimientos suaves para desprenderlo de la pipeta. El tubo se tapó cuidadosamente y se mantuvo a – 20 °C, o bien a 4°C una alícuota. Se verificó la integridad del DNA extraído en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (5 mg/ml). La electroforesis se corrió a 100 volts por 20 min. y se observó con un transluminador con luz ultravioleta.

VI.4.3 Diseño de oligonucleótidos:

Los oligonucleótidos empleados para los polimorfismos –238 y –308 del gen *TNF-α* se diseñaron de acuerdo a la secuencia reportada por Hernández-Pacheco et al.2003 (Tabla 5) [93].

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de SNPs del gen *TNF-α*

Región	Primer F (5'-3')	Primer R (5'-3')
-238	AAACAGACCACAGACCTGGTC	CTCACACTCCCCATCCTCCCGGATC
-308	GAGCAATAGGTTTTGAGCGCCAT	GGGACACACAAGCATCAAG

Los oligonucleótidos se centrifugaron por 15 seg y se reconstituyeron con 500 µL de agua destilada. Se realizó una dilución 1:200. El tamaño de los oligonucleótidos se comprobó por medio de un PCR y utilizando un marcador de 100 pb en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (5 mg/ml).

VI.4.4 Reacción en Cadena de la polimerasa:

- ❖ La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación en forma exponencial de un fragmento de DNA (**Fig.6**) [94]. Para este trabajo se empleó el DNA de cada paciente así como el de los controles y los oligonucleótidos arriba mencionados del gen *TNF- α* (**Tabla 5**).

- ❖ Los ciclos que definen la PCR son :
 - a) Desnaturalización a 94°C. Durante este paso, las dos hebras del DNA dúplex se separa por el aumento de la temperatura.

 - b) Alineación a 54°C. Aquí los oligonucleótidos se hibridan específicamente con el templado de DNA.

 - c) Extensión a 72°C. los oligonucleótidos son extendidos mediante una DNA polimerasa.

VI.4.5 Análisis molecular del GEN *TNF- α* polimorfismo –238.

1. En un microtubo de 0.5 mL, se mezclaron en el siguiente orden los reactivos presentados en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa del polimorfismo -238 del gen *TNF- α*

Reactivos	1 muestra (μL)
DNA	3.0
Amortiguador	2.5
MgCl ₂	1.25
Nucleotidos	2.0
Primer F	1.5
Primer R	1.5
DMSO	0.5
Enzima AmpliTaq®	0.5
H ₂ O	12.25
	Vol. Final: 25

2. Se colocó el DNA de cada paciente en un tubo de reacción y después se le adicionó la mezcla de reacción anterior.

3. Dicha mezcla se homogenizó suavemente por agitación y se colocó en un termo ciclador (Termal Cyclor 9600 de Perkin Elmer) con el siguiente programa:

Condiciones de los ciclos:

94° C/2 min.	94° C/12 seg.
94° C/20 seg.	60° C/20 seg.
59° C/30 seg.	72° C/7 min.
72° C/30 seg.	

Total de ciclos =35

5. Una vez que concluyó la amplificación, se tomaron 5 μL del amplificado y se mezclaron con 5 μL de colorante acarreador para verificar el producto amplificado por electroforesis en gel de agarosa al 3% (1.5 g de agarosa/50 mL de TBE 1X), con un corrimiento a 100 volts por 15 min. El gel se tiñó con 7.3 μL de bromuro de etidio (5 mg/mL), y se observó en un transiluminador (con luz UV). Se utilizó 1 μg

del marcador de pesos moleculares (DNA Ladder 100 pb) para cotejar el amplificado.

VI.4.6 Análisis molecular del **GEN *TNF- α*** polimorfismo –308.

1. En un microtubo de 0.5 mL, se mezclaron en el siguiente orden los reactivos presentados en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa del polimorfismo –308 del gen *TNF- α*

Reactivos	1 muestra (μ L)
DNA	3.0
Amortiguador	2.5
MgCl ₂	1.55
Nucleotidos	2.0
Primer F	1.0
Primer R	1.0
DMSO	0.5
Enzima AmpliTaq®	0.5
H ₂ O	15.0
	Vol. Final: 25

2. Se colocó el DNA de cada paciente en un tubo de reacción y después se le adicionó la mezcla de reacción.

3. Dicha mezcla se homogenizó suavemente por agitación y se colocó en un termo ciclador (Termal Cyclor 9600 de Perkin Elmer) con el siguiente programa:

Condiciones de los ciclos:

94° C/3 min.

94° C/30 seg.

59° C/ 1 min.

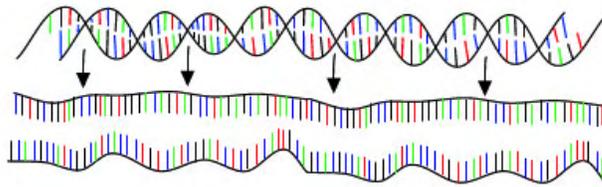
72° C/2 min.

Total de ciclos =35

5. Una vez que concluyó la amplificación, se tomaron 5 μ l del amplificado y se mezclaron con 5 μ l de colorante acarreador para verificar el producto amplificado por electroforesis en gel de agarosa al 3% (1.5 g de agarosa/50 mL de TBE 1X), con un corrimiento a 100 volts por 15 min. El gel se tiñó con 7.3 μ l de bromuro de etidio (5 mg/mL), y se observó en un transiluminador (con luz UV). Se utilizó 1 μ g del marcador de pesos moleculares (DNA Ladder 100 pb) para cotejar el amplificado.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

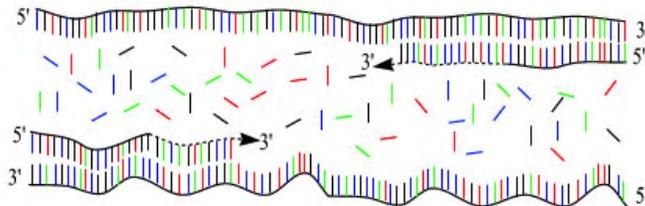
30-40 ciclos de 3 pasos



Paso 1: desnaturalización
1 minuto 94°C



Paso 2: alineación
45 segundos 54°C



Paso 3: extensión
2 minutos 72°C

solo dNTP's

Figura 6. Reacción en cadena de la polimerasa. La cual consiste en una serie de ciclos, que pueden ser definidos en los siguientes pasos 1: desnaturalización, 2: Alineación y 3: Extensión [94].

VI.4.7 Fragmentos de restricción de longitud polimórfica RFLPs para el gen *TNF-α* :

Los RFLPs son cambios o variaciones en la molécula de DNA que eliminan o crean un sitio de restricción para una endonucleasa específica.

En esta técnica el DNA genómico se trató con enzimas de restricción (**Tabla 8**), las cuales generan un patrón único y específico de restricción.

Tabla 8. Enzimas de restricción utilizadas para los polimorfismos –238 y –308 del gen *TNF-α*.

Región	Enzima
TNF-238	BamHI
TNF-308	NcoI

VI.4.8 Análisis molecular del GEN *TNF-α* polimorfismo –238.

1. La reacción de digestión se llevó a cabo en tubos de reacción con la mezcla mostrada en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones para la restricción de la secuencia del polimorfismo –238 del gen *TNF-α*.

Reactivos	1 muestra (μL)
Amortiguador	2.5
BamHI	0.5-0.7
H ₂ O	2.0-1.8
	Vol. Final: 5

2. La mezcla de restricción anterior se incubó 12 hrs. a 37° C.

3. Posteriormente se tomaron 5 μL del producto restringido para analizarlos en un gel de acrilamida al 15% y se corrió en una fuente de poder a 100 volts durante 30 min. La tinción del gel se realizó con 50 mL de TBE 1X/20 μL durante 5-10 min. y se observó en un transiluminador (con luz UV).

VI.4.9 Análisis molecular del GEN *TNF- α* polimorfismo –308.

La reacción de digestión se llevó acabo con las condiciones señaladas en la tabla 10.

Tabla 10. Condiciones para la restricción de la secuencia del polimorfismo – 308 del gen *TNF- α* .

Reactivos	1 muestra (μL)
Amortiguador	2.5
NcoI	0.5
H₂O	2.0
	Vol. Final: 5

2. La mezcla de restricción anterior se incubó 12 hrs. a 37° C.

3. Posteriormente 5 μL del producto restringido fueron analizados por electroforesis en geles de acrilamida al 15% a 100 volts durante 30 min. La tinción del gel se realizó con bromuro de etidio contenido en 50 mL de TBE 1X/20 μL durante 5-10 min. y se observó en un transiluminador (con luz UV).

VI.5.0 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 (**Tabla 11**), además ambas sondas tendrán en el extremo 3' un "quencher" (TAMRA) el cual mientras la sonda permanece intacta, inhibe la fluorescencia (**Fig. 7**). Durante la reacción de PCR los primers hibridan con una secuencia específica del templado del 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 es posible diferenciar un alelo del otro con base en el tipo de fluorescencia emitida.

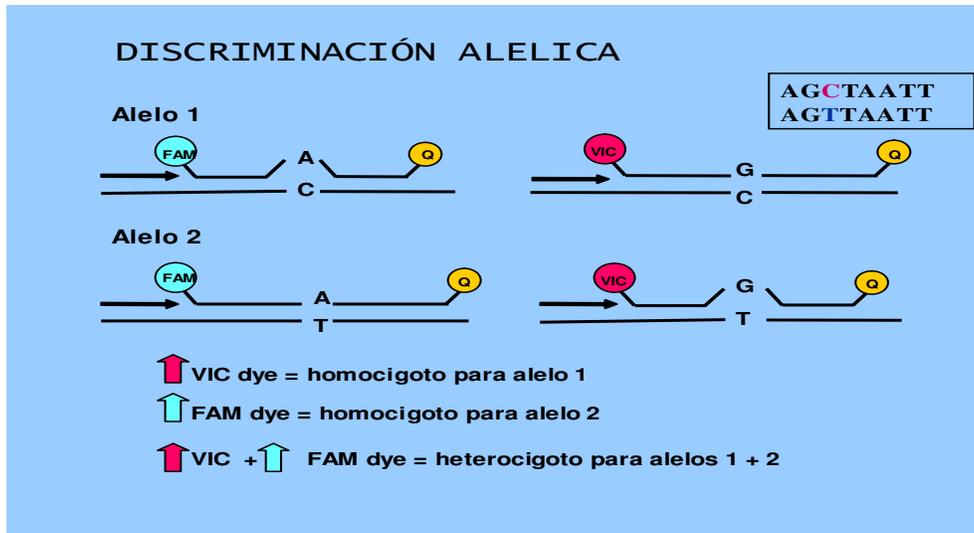


Figura 7. Discriminación alélica. La sonda que híbrida perfectamente con la secuencia blanco es escindida por la Taq polimerasa, mientras que la diferencia en un solo nucleótido reduce la eficiencia de unión de la sonda a la secuencia blanco y por lo tanto su degradación. De esta forma, la presencia en la señal para solo uno de los reporteros indicará homocigotidad para el nucleótido dimórfico que reporta fluorescencia específica; mientras que si se observa fluorescencia de VIC y FAM es un indicativo de heterocigotidad (Modificado de Applied Biosystems México).

VI.5.1 Análisis molecular del **GEN *PTPN22* y *TNF- α*** por el método 5' exonucleasa (**Taq-Man®**).

La genotipificación de los polimorfismos **1858 C/T, -238 A/G y -308 A/G** de los genes ***PTPN22* y *TNF- α*** respectivamente, fueron analizados usando el sistema Taq-Man® discriminación alélica 5' (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

1. En una placa de 96 pozos, se colocaron 2 μ l de cada una de las muestras de los casos y los controles, 3 μ l de la sonda específica para cada gen las cuales se muestran en la tabla 11.

2. Posteriormente se introdujo cada una de las placas al Taq-Man® y se dejaron correr las muestras durante 2 horas, hasta el momento de su lectura.

3. La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo con el siguiente programa:

Condiciones de los ciclos:

95° C/10 min.

92° C/15 seg.

60° C/ 1 min.

Total de ciclos =40

Tabla 11. Diseño de sondas Taq-Man®.

Gen	Secuencia	VIC	FAM
TNF-238	F GGCCAGAAGACCCCCCTCGG R GAGGATGGGGAGTGTGAG	AATCA A GAGCAGG	AATC G GAGCAGG
TNF-308	F CCAGCTTCCTCAACCACAATAAATG R CAACTGCTCCAAGGATAGATGATGA	TCAGGTGTCC A TACAGG	TCAGGTGTCC G TACAGG
PTPN22	F CCAAAAGAAATGGAGGCAATAGGTT R GTGTAGGACCCTGGACTGAAC	CCCGTCC C CATGCC	CCCGTCC T CATGCC

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

- ❖ Las frecuencias genotípicas y alélicas de todas las variantes genéticas, fueron obtenidas por conteo directo. El análisis estadístico para comparar las distribuciones genotípicas y alélicas se realizó utilizando la X^2 , en tablas de contingencia de 2x2 combinadas. La razón de momios (OR) y los intervalos de confianza del 95% (CI) fueron calculados de acuerdo al método de Woolfs. El programa que se usó fue el Statcalc (Epi Info 2005; Centers for disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA). Los valores de probabilidad (p) < 0.05 fueron considerados significativos.

VIII. RESULTADOS:

Para este estudio se incluyeron **250** pacientes pediátricos con LES y **355** controles sanos sin antecedentes de enfermedades autoinmunes, los cuales fueron pareados por sexo. Todos los pacientes fueron menores de 16 años de edad. De los **250** pacientes, **214** eran mujeres (**85.6%**) y **36** hombres (**14.4%**).

Discriminación alélica del gen *PTPN22*

La distribución de los genotipos se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg en ambos grupos. La **Tabla 12**, muestra las frecuencias genotípicas y alélicas del gen *PTPN22* de los pacientes con LES comparada con los controles, en donde podemos observar que éstas mostraron una fuerte evidencia de asociación con el riesgo a padecer LES en pacientes pediátricos mexicanos.

El genotipo **C/T** se encontró con una mayor frecuencia para los casos siendo ésta del **6.8%** comparada con el **2.3%** obtenido en los controles, alcanzando así valores estadísticamente significativos con un valor de **P = 0.0057** y un **OR** de **3.17 (95 %CI 1.34-7.45)**.

El genotipo homocigoto **T/T** no se encontró ni en los pacientes ni en los controles. Al obtener la frecuencia del alelo de riesgo **1858T**, observamos que a pesar de que muestra un valor relativamente bajo (**3.4%**) comparada con lo reportado en colombianos, españoles, suecos y caucásicos [**95-98**] (**Tabla 13**), este alelo muestra una fuerte asociación con un valor **OR** de **3.09 (95% CI 1.32-7.21)** para población pediátrica mexicana.

Discriminación alélica del gen *TNF-α*

La **Tabla 14** muestra la distribución genotípica y alélica en **241** pacientes con LES y **346** controles sanos, en donde se observa que el genotipo **-238 G/G** es el que se encuentra con una mayor frecuencia en ambos grupos. La comparación de los genotipos no mostró asociación al riesgo a padecer LES (**P =0.11757**). Así mismo al obtener las frecuencias alélicas podemos observar que no existe una diferencia

Tabla 12. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo 1858C>T del gen *PTPN22* en pacientes pediátricos con LES y controles sanos.

SNP	LES (n=250/500)	CONTROLES (n=355/710)	χ^2	P	OR (95% CI)
Genotipo 1858C >T					
CC	233 (93.2)	347 (97.7)			
CT	17(6.8)	8 (2.3)	7.65	0.0057	3.17 (1.34-7.45)
TT	0 (0)	0 (0)			
Alelos					
C	483 (96.9)	702 (98.9)			
T	17 (3.4)	8 (1.1)	7.49	0.0062	3.09(1.32-7.21)

Tabla 13. Distribución del alelo 1858T del gen *PTPN22* en diferentes poblaciones

Población	LES n/N (%)	Controles n/N (%)	P	OR(95% CI)
Pediátricos Mexicanos	17/550(3.4)	8/710(1.1)	0.0062	3.09 (1.32-7.21)
Caucásicos⁹⁸ Americanos	133/1050(12.6)	339/3,922(8.6)	0.00010	1.53 (1.23-1.89)
Espanoles⁹⁶	66/676(9.8)	71/1024(7)	0.03	1.45 (1.01-2.09)
Colombianos⁹⁵	30/286(10)	27/616(4)	0.001	2.56 (1.49-4.39)
Suecos⁹⁷	189/1142(16.5)	256/2084(12.3)	0.0007	1.41 (1.15-1.73)

Tabla 14. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo –238 A>G del gen *TNF- α* en pacientes pediátricos con LES y controles sanos.

SNP	LES (n=241/482)	CONTROLES (n=346/692)	P	OR (95% CI)
Genotipo -238 G>A				
GG	217(90.04)	325(93.9)		
GA	23(9.54)	20(5.8)	0.11757	
AA	01(0.42)	01(0.3)		
Alelos				
G	457(94.8)	670(96.8)		
A	25(5.2)	22(3.2)	0.1153	1.67(0.89-3.11)

significativa del alelo de riesgo TNF A entre casos (5.2%) y controles (3.2%) obteniendo un valor de **P = 0.1153** .

Del mismo modo el polimorfismo **-308** del gen *TNF- α* no mostró frecuencias genotípicas que fueran estadísticamente significativas, ya que el genotipo **G/A** mostró una **P =0.0985**, y las frecuencias alélicas obtenidas mostraron de igual modo que no hay diferencia del alelo de riesgo TNF A en ambas poblaciones mostrando una **P =0.06362** con un **OR** de **1.62 (95% CI 0.98-2.69)** (Tabla 15).

Tabla 15. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo –308 G>A del gen *TNF- α* en pacientes pediátricos con LES y controles sanos.

SNP	LES (n=241/482)	CONTROLES (n=346/692)	P	OR (95% CI)
Genotipo -308 G>A				
GG	205(85.1)	314(90.2)		
GA	35(14.5)	34(9.8)	0.0985	
AA	01(0.4)	0		
Alelos				
G	445(92.3)	662(95.11)		
A	37(7.67)	34(4.8)	0.06362	1.62(0.98-2.69)

IX. DISCUSIÓN:

Las enfermedades autoinmunes (EAs) afectan a más del 5% de la población mundial [99]. Además de que las EAs poseen ciertas características que sugieren un agente etiológico y mecanismos comunes, su co-ocurrencia en familias, dirige a la hipótesis de que éstas patologías tienen el mismo fondo genético [100-102]. El LES es el prototipo de este grupo de enfermedades, en donde la respuesta inmune está dirigida contra una amplia variedad de antígenos propios. Se caracteriza por daño a múltiples órganos y sistemas, lo que causa una gran diversidad en los síntomas clínicos. Esta entidad tiene una prevalencia aproximada de 1: 2000 (según sea el grupo étnico) [52]. La etiología de la enfermedad aún no está clara, pero se sabe que el LES es una entidad multifactorial donde los factores genéticos y ambientales en conjunto, dirigen a un individuo susceptible al desarrollo de la enfermedad. En los últimos años, se han realizado varios análisis del genoma completo en LES y se han identificado alrededor de 60 loci potenciales de susceptibilidad [55, 103-106], en donde a través del análisis de ligamiento y estudios de asociación se ha podido conocer más sobre su etiopatogenia, sin embargo hasta el momento las bases genéticas en el LES de inicio en la edad pediátrica, son inciertas, ya que los pocos estudios dirigidos a la caracterización de los factores genéticos involucrados en la susceptibilidad al LES se han realizado en pacientes adultos, aunado a esto, los estudios de asociación realizados en otras poblaciones no pueden ser extrapolados a nuestra población, debido a que las diferencias alélicas varían substancialmente en los diferentes grupos étnicos [99]. Así, el objetivo de este trabajo fue determinar si los SNPs localizados en los genes *TNF- α* y *PTPN22*, se encuentran asociados a la susceptibilidad para desarrollar LES en población pediátrica mexicana.

Debido a su importancia funcional como regulador negativo de la activación de células T y a que su posición en la región cromosómica muestra ligamiento para LES y AR [57,107], el gen *PTPN22*, el cual es una tirosin fosfatasa específica de linfocitos T, es un gen candidato para el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

En el presente estudio, nosotros encontramos asociación entre el polimorfismo funcional **1858 C/T** y la susceptibilidad para desarrollar LES (**Tabla 12**), lo cual puede ser explicado por que este polimorfismo elimina la interacción de Lyp y Csk, evitando así la formación de este complejo, y por lo tanto la supresión de la activación de células T, condición que puede resultar en una respuesta autoinmune **[66,108]**. El alelo T mostró asociación con LES en nuestra población sugiriendo que este SNP influye en la baja regulación y en la proliferación persistente de células T activadas policlonalmente, así como en la liberación de citocinas por células T en reposo. Cuando existe el polimorfismo **R620W** en donde hay una sustitución de una arginina (R) por un triptofano (W) se elimina el sitio de unión de la proteína con Csk; es probable que existan cambios en la regulación de **Lck** y por lo tanto una pérdida de la regulación negativa de la señalización del receptor de células T y posiblemente, desarrollo de autoinmunidad.

La baja frecuencia del alelo T en el grupo de pacientes pediátricos (**3.4%**), comparada con los estudios previamente reportados en otras poblaciones para los adultos (**Tabla 13**), puede ser explicada por las diferencias étnicas entre poblaciones; es posible que el alelo *PTPN22* **1858T** se encuentre relacionado con la gravedad de la enfermedad, sin embargo el OR encontrado para nuestra población de pacientes pediátricos muestra una fuerte asociación con la susceptibilidad a LES (**OR=3.09**) comparado con lo reportado en otros grupos (**Tabla 13**). Estas diferencias, pueden ser debidas a la heterogeneidad genética y el origen étnico de las poblaciones estudiadas. Cabe destacar que en el LES pediátrico los síntomas tienden a ser más graves y presentan un curso clínico más agresivo que en los pacientes adultos. Además, según **Begovich et al. 2004[62]**, el alelo de riesgo 1858T es menos común en poblaciones hispanas y afroamericanas que en poblaciones blancas norte-americanas, nuestros resultados confirman lo observado por **Begovich**, pues en nuestra población no se encontró ningún genotipo homocigoto para el alelo de riesgo 1858T. Otros estudios han reportado asociación del polimorfismo 1858C/T en población norte-americana, en donde se muestra un elevado valor de (**OR =4.37**) comparado con los otros grupos estudiados, sugiriendo un efecto de dosis génica para los

homocigotos del alelo T, lo cual podría provocar una reducción más severa en la unión de **Lyp** con **Csk** que lo observado en los individuos heterocigotos, reduciendo así de una manera importante la capacidad en la regulación de las células T y de ésta manera confiriendo un alto riesgo para individuos homocigotos para T [98].

Para tratar de entender el papel de los polimorfismos del gen *TNF- α* en el desarrollo de LES en pacientes pediátricos, se analizó la distribución genotípica y alélica de los siguientes SNPs **-238 G/A**, y **-308 G/A**, debido a que este gen es bien conocido por su participación en la regulación de la inflamación y en los procesos apoptóticos, los cuales se encuentran asociados a la patogenia de la enfermedad.

Múltiples asociaciones genéticas han sido identificadas actualmente, la mayoría de éstas sugieren que el complejo mayor de histocompatibilidad (**MHC**) se encuentra involucrado en la susceptibilidad a LES [109]. Actualmente no está claro si las asociaciones reportadas del HLA-DRB*1 con los alelos *TNF* con LES representa genes independientes o son secundarios al fuerte desequilibrio de ligamiento que es una característica de la región del **MHC**.

El gen *TNF- α* está localizado dentro de la región del MHC clase III en el cromosoma 6p21.3 [113]. *TNF- α* estimula la producción de citocinas aumentando la expresión de moléculas de adhesión y la activación de neutrófilos y actúa como un co-estimulador para la activación de células T y la producción de anticuerpos.

Varios estudios han encontrado un aumento en los niveles de *TNF- α* en pacientes con LES comparado con controles, lo que sugiere que éste se encuentra involucrado con la patogénesis de LES [86].

Sin embargo aunque la participación de *TNF- α* en la patogénesis del LES no está clara, sabemos que diferencias pequeñas en la producción de esta citocina pueden resultar en autoinmunidad.

En el caso de nuestro trabajo los resultados mostraron que para el grupo de pacientes pediátricos con LES, no existe asociación alguna con los polimorfismos estudiados; por otro lado, se ha demostrado en algunos estudios que la posición –

238 no tiene relevancia fisiológica [110,111], lo cual corresponde a lo encontrado en nuestra población.

Sin embargo, en un estudio realizado para el caso de los mexicanos adultos [92], se sugiere que hay una asociación entre **TNFA-238** y LES, la cual puede ser el resultado del desequilibrio de ligamiento entre alelos *TNF* y *DRB* en pacientes mexicanos y que en combinación podrían ser importantes para la susceptibilidad genética.

En relación a lo anterior, las diferencias que existen entre los resultados obtenidos de los pacientes pediátricos comparados con los adultos, pueden ser debidas al número de pacientes utilizados (51 pacientes) [92], lo cual puede dirigir a falsos positivos, además de que la interacción de los genes en el LES pediátrico se encuentra relacionada al grado de exposición de los diversos factores ambientales, los cuáles permanecen desconocidos.

Para el polimorfismo **TNF2-308**, se han reportado varios estudios en donde se ha podido demostrar la asociación (**Tabla 16**), por ejemplo en el caso de los caucásicos de EUA [112], hay una asociación del **TNF-308A** y el genotipo **IL-1 α – 889 C/C**, lo que sugiere una fuerte evidencia de interacción entre la variante alélica **TNF-308A** y otras citocinas pro-inflamatorias, dándonos una evidencia de epistásis entre estos dos genes [112].

Para las poblaciones afro-americanas [113] y caucásicos de Leiden (Holandeses) [114], se encontró que el alelo **TNFA-308** y **HLA-DR3** son factores de susceptibilidad independientes, además de que se observó un efecto de dosis génica para individuos homocigotos del alelo de riesgo, lo cual aumentó significativamente los valores de OR. Para el caso de los caucásicos de Inglaterra [89], se observa que el polimorfismo –308 del gen *TNF- α* se encuentra en desequilibrio de ligamiento con DR3. Sin embargo en un estudio reciente, a través de un meta-análisis de los estudios de asociación publicados y estratificando por origen étnico se detecta que el alelo **TNF-308A** presenta una asociación significativa en muestras de europeos, pero no en muestras de pacientes de origen africano y asiático [115].

Tabla 16. Asociación del polimorfismo del gen *TNF- α* -308 en diferentes poblaciones.

Población	LES/ Control	Alelo asociado / haplotipo	P	OR(95%CI)
Caucásicos, Carolina, EUA ¹¹²	(86/203)	TNF-308 GA o AA con IL-1 α -889 C/C	0.013	–
Caucásicos Inglaterra ⁸⁹	(98/192)	TNF2-308 en desequilibrio de ligamiento con DR3	0.042	1.85(1.05-3.25)
Caucásicos Leiden ¹¹⁴	(99/177)	TNF-308 y HLA-DR3 factores de susceptibilidad independientes	–	5.0 (2.8-8.8)
Afro-Americanos ¹¹³	(88/64)	TNFA-308 y HLA-DR3 factores de susceptibilidad independientes	0.0052	4.44(1.50-13.3)

Las diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones, pueden deberse a los distintos alelos HLA-DR3 encontrados para cada población, siendo para los caucásicos el DRB1*0301 el alelo más común y para los afro-americanos el DRB1*0302 [114].

Diversos estudios han sugerido que el alelo *-308A TNF* es un importante factor de susceptibilidad [89,116], sin embargo el aumento de OR en pacientes con LES que ha sido atribuido al desequilibrio de ligamiento con *HLA-DR3* no ha sido demostrado, por lo cual el mecanismo bajo el cual la alta prevalencia del alelo *-308A TNF* en pacientes con LES permanece desconocido [114].

En el presente trabajo, se observó una tendencia a la asociación en pacientes pediátricos mexicanos (Tabla 15) con un valor de **P = 0.06**, posiblemente por el tamaño de la muestra, el cual es necesario incrementar para descartar o confirmar asociación de este gen y la susceptibilidad para desarrollar LES.

X. CONCLUSIONES:

- 1.** Nuestros resultados sugieren que el polimorfismo 1858C/T localizado en el gen *PTPN22*, se encuentra asociado con el riesgo para desarrollar LES en nuestra población de pacientes pediátricos.
- 2.** A diferencia de lo reportado en otras poblaciones, el análisis de los polimorfismos -238 y -308 del gen *TNF- α* , no se encontraron asociados a la susceptibilidad a desarrollar LES, en pacientes pediátricos mexicanos. Estas diferencias pueden ser debidas a la variabilidad en el grupo étnico, a un tamaño de muestra pequeño, a la influencia de los factores genéticos desconocidos asociados con LES, o a que los pacientes pediátricos muestran heterogeneidad de su fondo genético distinta a la de los adultos.
- 3.** Debido a que la región promotora de este gen *TNF- α* es altamente polimórfica, no podemos descartar que otros polimorfismos localizados en esta región pueden encontrarse asociados con la enfermedad.

XII. APÉNDICE:

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS, Hospital General Centro Médico “La Raza” IMSS, Instituto Nacional de Pediatría SS y Hospital Infantil de México “Federico Gómez” SS.

Yo _____ Padre o Madre del niño (a) _____

_____ con registro _____ estoy de acuerdo en que mi hijo con Lupus Eritematoso Sistémico, mi cónyuge y yo participemos en el estudio **“POLIMORFISMOS EN GENES CANDIDATOS Y SU ASOCIACIÓN CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO DE INICIO EN LA EDAD PEDIÁTRICA”**.

Estoy de acuerdo en que se nos tome una muestra de sangre de 10-15 ml de una vena periférica utilizando aguja y jeringa nuevas. Se me ha informado que puede haber una leve molestia durante la extracción de la sangre y que pueden presentarse complicaciones mínimas como la formación de un hematoma (“moretón”) con el procedimiento, pero que su frecuencia es muy baja.

Se me ha explicado que el objetivo principal del presente estudio es detectar genes asociados a la susceptibilidad para desarrollar Lupus Eritematoso Sistémico. Se ha hecho de mi conocimiento que la muestra que se obtenga se le realizará un análisis genético y que los resultados derivados de este estudio serán manejados bajo estricta confidencialidad.

También se me ha informado que es probable que mi hijo (a) no reciba un beneficio inmediato por su participación en el estudio y que la intervención es completamente voluntaria y que si no deseamos participar, no repercutirá en la atención de mi hijo.

Nombre y firma del Padre y / o Madre

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma del investigador responsable

XI. BIBLIOGRAFÍA:

1. Wandstrat A, Wakeland EK. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nature Immunol* 2001; 2:802-8.
2. Klein-Gitelman M, Reiff A, Silverman ED. Systemic lupus erythematosus in childhood. *Rheum Dis Clin North Am* 2002;28:561-577.
3. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastián GD, Gil A, Lavilla P, Doménech I, Aydintug AO, Jedryka-Góral A, de Ramón E. Systemic lupus erythematosus: Clinical and immunological patterns of disease in cohort of 1000 patients. *Medicine (Baltimore)* 1993; 72:113-124.
4. Font J, Cervera R, Espinosa G, Pallarés L, Ramos-Casals M, Jiménez S, García-Carrasco M, Seisdedos L, Ingelmo M. 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;57:456-459.
5. Tucker LB, 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;34:866-872.
6. 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;8:287-292.
7. Lo JT, Tsai MJ, Wang LH, Huang MT, Yang YH, Lin YT, Liu J, Chiamg BL. Sex differences in pediatric systemic lupus erythematosus: A retrospective analysis of 135 cases. *J Microbiol Immunol Infect* 1999;32:173-178.

8. 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;17:45-49.
9. Benseler SM, Silverman ED. Systemic lupus erythematosus. *Pediatr Clin North Am* 2005;52:443-467.
10. 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;46:436-444.
11. Iqbal S, Sher MR, Good RA, Cawkwell GD. Diversity in presenting manifestations of systemic lupus erythematosus in children. *J Pediatr* 1999;135:500-505.
12. Rood MJ ten Cate R, van Suijlekom-Smith LW, et al. Childhood-onset systemic lupus erythematosus: clinical presentation and prognosis in 31 patients. *Scand JRheumatol* 1999;28:222-226.
13. Bader-Meunier B, Quartier P, Deschenes G, Cochat P, Haddad E, Kone-Paut, Leblanc T, Prieur AM, Salomon R, Bodemer C, Levy M; Group française d'étude du lupus érythémateux disséminé de l'enfant. Childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arch Pediatr* 2003;10:147-157.
14. Sztajn bok FR, Serra CR, Rodrigues MC, Mendoza E. Rheumatic diseases in adolescence. *J Pediatr* 2001;77 Suppl 2:S234-S244.
15. Bakkaloglu A. Lupus nephropathy in children. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16 Suppl 6:126-128.

16. 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.
17. Sibbitt WL Jr, Brandt JR, Johnson CR, Maldonado ME, Patel SR, Ford CC, Bankhurst AD, Brooks WM. The incidence and prevalence of neuropsychiatric syndromes in pediatric onset systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2002;29:1536-1542.
18. Wananukul S, Watana D, Pongprasit P. Cutaneous manifestations of childhood systemic lupus erythematosus. *Pediatr Dermatol* 1998;15:342-346.
19. Stichweh D, Pascual V. Lupus eritematoso sistémico pediátrico. *An Pediatr* 2005;63(4):321-329.
20. Boon SJ, Mc Curdy D. Childhood systemic lupus erythematosus. *Pediatric Annals* 2002 Jul 31 (7):407-417.
21. Arkachaisri T, Lehman TJ. Systemic lupus erythematosus and related disorders of childhood. *Curr Opin Rheumatol* 1999;11:384-392.
22. Lehman TJ. Systemic Lupus erythematosus in childhood and adolescence. Williams and Wilkins. 5^a edición. Baltimore 1997. pp 851-870.
23. Schmugge M, Revel-Vilk S, Hiraki L, Rand ML, Blanchette VS, Silverman ED. Thrombocytopenia and thromboembolism in pediatric systemic lupus erythematosus. *J Pediatr* 2003;143:666-669.
24. 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;7:545-550.

25. Ciftci E, Yalcinkaya F, Ince E, Ekim M, Orgerin Z, Fitöz S, Güriz H, Aysey AD, Dogry U. Pulmonary involvement in childhood-onset systemic lupus erythematosus: A report of five cases. *Rheumatology* 2004;43:587-591.
26. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfiel NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-1277.
27. Hochberg MC. Updating the American Collage of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
28. Hagelberg S, Lee Y, Bargman J, Mah G, Schneider R, Laskin C, Eddy A, Gladman D, Urowitz M, Hebert D, Silverman E. Long term follow-up of childhood lupus nephritis. *J Rheumatol* 2002;29:2635-2642.
29. Gross AJ, Hochberg D, Rand WM, Thorley-Lawson DA: EBV and systemic lupus erythematosus: a new perspective. *J Immunol* 2005;174:6599-6607.
30. Moon UY, Park SJ, Oh ST, Kim WU, Park SH, Lee SH, Cho CS, Kim HY, Lee WK, Lee SK. Patients with systemic lupus erythematosus have abnormally elevated Epstein-Barr virus load in blood. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R295-R302.
31. Sherer, Y. Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum* 2004; 34:501-537.
32. Zieve, G.W. and Khusial. The anti-Sm immune response in autoimmunity and cell biology. *Autoimmun Rev* 2003;2:235-240.

33. Mageed RA, Prud'homme GJ. Immunopathology and the gene therapy of lupus. *Gene Ther* 2003;10:861-874.
34. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR, Lipsky PE, Radbruch A, Dörner T. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001;65:5970-5979.
35. Arce E, Jackson DG, Gill MA, Bennett LB, Banchereau J, Pascual V. Increased frequency of pre-germinal center B cells and plasma cell precursors in the blood of children with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001;167:2361-2369.
36. Vasoo S, Hughes GR: Theory targets and therapy in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2005;14:181-188.
37. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science*. 2003; 301:1374-1377.
38. Schur, P.H. and Sandson, J. Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 1998;278:533-538.
39. Waldman, M. and Madaio, M.P. Pathogenic autoantibodies in lupus nephritis. *Lupus* 2005; 14:19-24.
40. Hunter T. A thousand and one protein kinases. *Cell* 1987;50:823-829.
41. Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T. Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. *Cell* 117:699-711.

42. Tsokos GC, Nambiar MP, Tenbrock K, et al. Rewiring the T-cell: signaling defects and novel prospects for the treatment of SLE. *Trends Immunol* 2003;24:259-263.
43. Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus: A disease with a complex pathogenesis. *Lancet* 2001;358 Suppl:65.
44. Kyttaris VC, Tsokos GC. T lymphocytes in systemic lupus erythematosus: An update. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16:548-552.
45. Inghirami G, Simon J, Balow JE, Tsokos GC. Activated T lymphocytes in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus induce B cells to produce immunoglobulin. *Clin Exp Rheumatol* 1988;6:269-276.
46. Xu L, Zhang L, Yi Y, Kang HK, Datta SK. Human lupus T cells resist inactivation and escape death by upregulating COX-2. *Nat Med* 2004;10:411-415.
47. 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;179:1317-1330.
48. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:685-711.
49. Steinsson K, Arnason A, Erlendsson K, Fossdal R, Skaftadottir I, Jonsdottir S, Fjalarnson M, Thorsteinsson J. A Study of the major histocompatibility complex in a Caucasian family with multiple cases of systemic lupus erythematosus: association with the C4AQ0 phenotype. *J Rheumatol* 1995;22:1862-1866.

50. Alarcón, GS, Friedman AW, Straaton KV, Moulds JM, Lisse J, Bastian HM, McGwin G Jr, Bartolucci AA, Roseman JM, Reveille JD. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: III. A comparison of characteristics early in the natural history of the LUMINA cohort. Lupus in minority populations: Nature vs Nurture. *Lupus* 8, 197-209.
51. Jawaherr D, Gregersen PK. Rheumatoid arthritis. The genetic components. *Rheum Dis Clin North Am* 2002;28:1-15.
52. Tsao BP. The genetics of human systemic lupus erythematosus. *Trends Immunol* 2003;24:595-602.
53. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003;56:481-490.
54. 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.
55. Moser K.L., Neas, B.R., Salmon, J.E., Yu, H., Gray-McGuire, C., Asundi, N., Bruner, GR., Fox, J., Kelly, j., Henshall, S. Bacino D, Dietz M, Hogue R, Koelsch G, Nightinggale L, Shaver T, Abdou NI, Albert DA, Carson C, Petri M, Treadwell EL, James JA, Harley JB. 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.
56. Kelly JA, Moser KL, Harley JB. The genetics of systemic lupus erythematosus: putting the pieces together. *Genes Immun* 2002;3 (Suppl 1):S71-S85.
57. Gaffney PM, Kearns, G.M., Shark, K.,B., Ortmann, W.A., Selby, S.A., Malmgren, M.L., Rohlf, K.E., Ockenden, T.C., Messner, R.P., King, R.A. Rich

- SS, Behrens TW. A genome-wide search for susceptibility genes in human systemic lupus erythematosus sib-pair families. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14875-14879.
58. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 1998; 8:1229-31.
59. Kruglyak y Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet* 2001; 27:234–6.
60. Steinsson K, Alarcón-Riquelme. Genetic aspects of rheumatic diseases. *Scand J Rheumatol* 2005;34:167-177.
61. Sestak AL, Nath SK, Sawalha AH, Harley JB. Current status of lupus genetics. *Arthritis Res Ther* 2007; 9:210-19.
62. Begovich AB; Carlton VE; Honigberg LA; Schrodi SJ, Choklingam AP; Alexander HC, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004;75:330-7.
63. Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VE, Ghang M, Ramos P, Baechler EC, Batliwalla FM, Novitzke J, Williams AH, Gillett C, Rodine P, Graham RR, Ardlie KG, Gaffney PM, Moser KL, Petri M, Begovich AB, Gregersen PK, Behrens TW. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet* 2004; 75:504-7.
64. Mustelin T, Alonso A, Bottini N, Huynh H, Rahmouni S, Nika K, et al. Protein tyrosine phosphatases in T cell physiology. *Mol Immunol* 2004; 41:687-700.

65. Siminovitch, K. *Nat. Genet* 2004;36:1248-1249.
66. Gregersen PK. Gaining insight into PTPN22 and autoimmunity. *Nat Genet* 2005; 37: 1300-1302.
67. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992;10:411-452.
68. Beutler B. TNF immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J Invest Med* 1995;43:227-235.
69. Beutler B. and Cerami A. The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 1998; 7:625-655.
70. Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C. J., Peschon, J.J., Slack, J. L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J. and Cerretti, D.P. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 1997; 385: 729-733.
71. Rosendahl, M.S., Ko, S.C., Long, D.L., Brewer, M.T., Rosenzweig, B. Hedl, Anderson L, Pyle SM, Moreland J, Meyers MA, Kohno T, Lyons D, Lichenstein HS. Identification and characterization of a tumor necrosis factor- α -processing enzyme from the ADAM family of zinc metaproteases. *J Biol Chem* 1997;272:24588-24593.
72. Beutler B. and van Huffel C. Unraveling function in the TNF ligand and receptor families. *Science* 1994;264:667-668.
73. Balkwill FR. Tumor necrosis factor. *Br Med Bull* 1989; 45:389-400.

74. Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H. and Woody, J.N. Repeated therapy with monoclonal antibody to tumor necrosis factor α (cA2) in patients with rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994;344:1125-1127.
75. Jacob, C.O., Fronek, Z., Lewis, G.D., Koo, M., Hansen, J.A. and McDevitt, H.O. Heritable major histocompatibility complex class II—associated differences in production of tumor necrosis factor α : relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:1233-1237.
76. Van Dullemen, H. M., van Deventer, S. J., Hommes, D.W., Bijl, H.A., Jansen, J, Tytgat, G.N. and Woody J. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 1995;109:129-135.
77. Mc Guire, W., A.V., Allsopp, C.E., Greenwood, B.M. and Kwiatkowski, D. Variation in the TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994;371:508-510.
78. Cabrera, M., Shaw, M.A., C., Williams, H., Castes, M., Convit, J. and Blackwell, J. M. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 1995;182:1259-1264.
79. Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S. and Spiegelman, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993;259:87-91.
80. Hotamisligil, G.S. and Spiegelman, B.M. Tumor necrosis factor α : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 1994;43:1271-1278.
81. Llanos C, Soto L, Sabugo F, Bastías MJ, Salazar L, Aquillón JC, Cuchacovich M. Utilidad de determinar el polimorfismo de la región promotora -308 del gen

factor de necrosis tumoral alfa, en pacientes con artritis reumatoidea. *Reumatología* 2004;20(3):125-128.

82. Bendtzen, K., Morling, N., Fomsgaard, A., Svenson, M., Jakobsen, B., Odum N, Svejgaard A. Association between HLA-DR2 and production of tumor necrosis factor α and interleukin 1 by mononuclear cells activated by lipopolysaccharide. *Scand J Immunol* 1998;28:599-606.
83. Pociot F., Briant, L., Jongeneel, C.V., Molving, J., Worsaae, H., Abbal, M., Thomsen, M., Nerup, J. and Cambon-Thomsen, A. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF- α and TNF- β by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1993;23:224-231.
84. Sariban, E., Imamura, K., Luebbers, R. And Kufe, D. Transcriptional and postranscriptional regulation of tumor necrosis factor gene expression in human monocytes. *J Clin Invest* 1998;81:1506-1510.
85. Goldfeld, A.E., Doyle, C. and Maniatis, T. Human tumor necrosis factor α gene regulation by virus and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:9769-9773.
86. Studnicka-Benke A, Steiner G, Petera P, Smolen JS. Tumor necrosis factor α and its soluble receptors parallel clinical disease and autoimmune activity in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1996;35:1067-74.
87. D'Alonso S, Richiardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNF alpha promoter region. *Immunogenetics* 1994;38:150-4.

88. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3195-9.
89. Rudwaleit M, Tikly M, Kamashta M, Gibson K, Klinke J, Hughes G, Wordsworth P. Interethnic differences in the association of tumor necrosis factor promoter polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1996; 23:1725-1728.
90. Blin N, Sttaford D. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acid Res* 1976; 3:2303-2308.
91. Senna ER, De Barros AL, Silvia EO, Costa IF, Pereira LV, Ciconelli RM, Feraz MB. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol* 2004; 31:594-7.
92. Zúñiga J, Vargas Alarcón G, Hernández 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: 363-366.
93. Guadalupe Hernández-Pacheco et al. Tumor necrosis factor –alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with rheumatic heart disease. *J Autoimmun* 2003;21: 59–63.
94. http://pharm.shams.edu.eg/undergraduates/educational_aids/general/pcr.shtml
95. Gomez LM, Anaya JM, Gonzalez CI, Pineda-Tamayo R, Otero W, Arango A et al. PTPN22 C1858T polymorphism in Colombian patients with autoimmune disease. *Genes Immun* 2005; 6:628-631.

96. 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.
97. Reddy MVPL, M Johansson, G Sturfelt, Jönsen A, Gunnarsson I, Svenungsson E, Rantapää-Dahlqvist S, Alarcón-Riquelme ME. 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.
98. Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VE, Ghang M, Ramos P, Baechler EC, Batliwalla FM, Novitzke J, Williams AH, Gillett C, Rodine P, Graham RR, Ardlie KG, Gaffney PM, Moser KL, Petri M, Begovich AB, Gregersen PK, Behrens TW. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet* 2004; 75:504-7.
99. Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R, Yamamoto K. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs.
100. Tait KF, Marshall T, Berman J, Carr-Smith J, Rowe B, Todd JA, Bain SC, Barnett AH, Gough SC. Clustering of autoimmune disease in parents of siblings from the Type 1 diabetes Warren repository. *Diabet Med* 2004;21:358-62.
101. Becker KG. Comparative genetics of type 1 diabetes and autoimmune disease: common loci, common pathways? *Diabetes* 1999; 48: 1353-8.
102. Becker KG. The common variants/multiple disease hypothesis of common complex genetic disorders. *Med Hypotheses* 2004; 62:309-17.

103. Tsao BO, Cantor RM, Kalunian KC, Chen CJ, Badsha H, Singh R, Wallace DJ, Kitridou RC, Chen SL, Shen N, Song YW, Isenberg DA, Yu CL, Hahn BH, Rotter JI. Evidence for linkage of a candidate chromosome 1 region to human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1997;99(4):725-31.
104. Shai R, Quismorio FP Jr, Li L, Kwon OJ, Morrison J, Wallace DJ, Neuwelt CM, Brautbar C, Gauderman WJ, Jacob CO. Genome-wide screen for systemic lupus erythematosus susceptibility genes in multiplex families. *Hum Mol Genet* 1999;8(4):639-44.
105. Gaffney PM, Ortmann WA, Selby SA, Shark KB, Ockenden TC, Rohlf KE, Walgrave NL, Boyum WP, Malmgren ML, Miller ME, Kearns GM, Messner RP, King RA, Rich SS, Behrens TW. Genome screening in human systemic lupus erythematosus: results from a second Minnesota cohort and combined analyses of 187 sib-pair families. *Am J Hum Genet* 2000;66(2):547-56.
106. Lindquist AK, Steinsson K, Johanneson B, Kristjánsdóttir H, Arnasson A, Gröndal G, Jonasson I, Magnusson V, Sturfelt G, Truedsson L, Svenungsson E, Lundberg I, Terwillier JD, Gyllensten UB, Alarcón-Riquelme ME. A susceptibility locus for human systemic lupus erythematosus (hsle1) on chromosome 2q. *J Autoimmun* 2000;14(2):169-78.
107. Jawaheer D, Seldin MF, Amos CI, Chen WV, Shigeta R, Etzel C, Damle A, Xiao X, Chen D, Lum RF, Monteiro J, Kern M, Criswell LA, Albani S, Nelson JL, Clegg Do, Pope R, Schroeder HW Jr, Bridges SL Jr, Pisetsky DS, Ward R, Kastner DL, Wilder RL, Pincus T, Callahan LF, Flemming D, Wener MH, Gregersen PK, North American Rheumatoid Arthritis Consortium. Screening the genome for rheumatoid arthritis susceptibility genes: a replication study and combined analysis of 512 multicase families. *Arthritis Rheum* 2003; 48:906-16.

108. Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orrú V, Zavattari P, Nika K, Tautz L, Taskén K, Cucca F, Mustelin T, Bottini N. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet* 2005;37(12):1317-9.
109. Dunham I, Sargent CA, Trowsdale J, Campbell RD: Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7237-7241.
110. Ugliatororo AM, Turbay D, Pesavento PA, Delgado JC, McKenzie FE, Gribben JG, Hartl D, Yunis EJ, Goldfeld AE. Identification of three new nucleotide polymorphism in the human tumor necrosis factor α gene promoter. *Tissue Antigens* 1998; 52:359-67.
111. Pociot F, D'Alfonso S, Compasso S, Scorza R, Richiardi PM. Functional analysis of a new polymorphism in the human TNF-alpha gene promoter. *Scand J Immunol* 1995; 42:501-4.
112. Parks CG, Pandey JP, Dooley MA, Treadwell EL, Clair E.W. St., Gilkeson, Carol A, Bostwick-Feghali, Cooper GS: Genetic polymorphisms in tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF-beta in a population based study of systemic lupus erythematosus: associations and interaction with the interleukin-1alpha-889 C/T polymorphism. *Hum Immunol* 2004; 65: 622-631.
113. Sullivan KE, Wooten C, Schmeckpeper BJ, Goldman D, Petri MA: A promoter polymorphism of tumor necrosis factor alpha associated with systemic lupus erythematosus in African-Americans. *Arthritis Rheum* 1997;40:2207-2211.
114. Rood MJ, van Krugten MV, Zanelli E et al: TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43:129-134.

115. Lee YH, Harley JB, Nath S. Meta-analysis of TNF-alpha promoter -308 A/G polymorphism and SLE susceptibility. *Eur J Human Genet* 2006;14:362-71.
116. Wilson AG, Gordon C, di Giovine FS, de Vries N, van de Putte LB, Emery P, et al. A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor α . *Eur J Immunol* 1994; 24:191-5.