



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS DE LA SALUD**

**Análisis de la Expresión y Funcionalidad de IRF-5 en
Células Dendríticas de Pacientes con Lupus Eritematoso**

Generalizado

TESIS

Que para optar por el grado de Maestra en

Ciencias Médicas

PRESENTA

KARINA SANTANA DE ANDA

Tutor: **Dr. Jorge Carlos Alcocer Varela**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS DE LA SALUD

México D.F. Octubre, 2013





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.

INDICE

MARCO TEÓRICO	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
JUSTIFICACIÓN	10
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	11
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
CONSIDERACIONES ETICAS	16
FINANCIAMIENTO	16
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES.....	25
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
ANEXO 1	32

Marco Teórico

El sistema inmune involucra tanto la respuesta innata como la adaptativa y su homeostasis depende de la compleja interacción entre ambas. Las células dendríticas constituyen un elemento clave para dicha interacción. Las células dendríticas (CDs) son conocidas como las células presentadoras de antígeno profesionales, y dentro de sus principales funciones, se encuentran el reconocimiento de una gran diversidad de antígenos y el procesamiento de los mismos[1]. La evidencia actual sugiere que esta población celular es capaz de discernir si un antígeno debe ser reconocido como propio o extraño[2], para lo cual expresan una gran variedad de moléculas de superficie, tales como receptores de moléculas de patrón y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) mediante las cuales pueden detectar múltiples patógenos de origen infeccioso o señales provenientes de células propias que han sufrido algún tipo de daño[3].

Las células dendríticas migran principalmente hacia las mucosas, en donde tras la interacción con receptores de reconocimiento de patrón, presentan un proceso de maduración y activación que se asocia a la migración hacia los ganglios linfáticos regionales[4, 5]. En estas regiones interactúan con linfocitos T que reconocen los péptidos antigénicos procesados y presentados a través de moléculas MHC en la superficie de las células dendríticas, formando la denominada sinapsis inmunológica[6] y favoreciendo la síntesis y liberación de diversas citocinas por parte de las CDs, tales como IL-6, IL-10, IL-12, IL-23 e IFN tipo I.

Lo anterior se relaciona a la inducción de una respuesta inmune proliferativa, por lo que esta subpoblación de células dendríticas, se conoce como células dendríticas inmunogénicas.

Dentro de las múltiples citocinas producidas por las CDs, los IFN tipo I se han considerado como de gran relevancia tanto para el efecto inmunogénico de esta subpoblación celular, como para la modulación de las respuestas tolerogénicas.

Las células dendríticas plasmocitoides son consideradas como la principal fuente de producción de IFN tipo I [7]. Los IFN tipo I (α y β) tienen efectos pleiotrópicos y son capaces de modular tanto cuantitativa como cualitativamente, características básicas de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa[8, 9]. La gran diversidad de procesos que regulan los INF tipo I dependen de factores, tales como los receptores a través de los cuales señalizan, así como la regulación de una gran variedad de genes, relacionados con múltiples procesos, tales como diferenciación de linajes, y regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa (celular y humoral)[10].

Los IFN tipo I pertenecen a la familia de citocinas clase II (α -hélice). El IFN- α es codificado por 20 diferentes genes, de los cuales se obtienen 13 péptidos funcionales, mientras que el IFN- β solo es codificado por un gen, tanto en humanos como en ratones. Su expresión y funcionalidad, en términos de la regulación de la expresión de diversos genes, depende de la molécula que estimula su producción, así como de la célula que lo produce[11].

El receptor heterodimérico de IFN tipo I está constituido por dos subunidades (AR1 y AR2), es ampliamente expresado por diversas células del sistema inmune y es un receptor de alta afinidad (constante de disociación 10^{-4}

⁹ a 10^{-11}). La unión del ligando con su receptor se asocia a la fosforilación de cinasas de tirosina de la familia JNK (Tyk2 y Jak1) y a la señalización mediada por STAT1 y 2. Posteriormente el heterodímero de STAT1 y STAT2 fosforilados es traslocado al núcleo en donde se une a diversas secuencias génicas para inducir la transcripción de múltiples genes[12]. Cabe destacar que la expresión constitutiva de bajas concentraciones de IFN tipo I es relevante tanto para la expresión inducible de éstos, como para la de IFN- γ , lo cual tiene impacto dentro de la respuesta inmune a diversos microorganismos, como virus, así como dentro de la modulación de la respuesta a auto-antígenos[13].

Los efectos de IFN tipo I sobre la respuesta inmune innata y adaptativa depende de diversos factores, dentro de los cuales se destaca la interacción con IFN- γ , así como IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12, entre otras[7]. El IFN- α induce la diferenciación de monocitos hacia CDs, así como la maduración de éstas, incluyendo la diferenciación y maduración de CDs capaces de presentar auto-antígenos (inmunogénicas), las cuales pueden inducir la diferenciación de diversas subpoblaciones de células T efectoras. Asimismo, se asocia a un incremento en la producción de BAFF, lo cual favorece las respuestas humorales, con la subsecuente producción de auto-anticuerpos.

El incremento en los niveles séricos de IFN tipo I se ha descrito en múltiples patologías autoinmunes, tanto en humanos como en modelos murinos[14, 15]. Actualmente el estudio genómico y proteómico ha permitido establecer como la firma molecular de LEG a la sobreexpresión de niveles séricos de IFN tipo I, con un patrón de expresión génica diferencial, encaminado al incremento en la producción de dicha citocina (firma del IFN) [16-18]. Dentro de este patrón de expresión génica, se encuentran los factores

reguladores de interferón (IRFs), los cuales son factores de transcripción inducidos a través de diferentes receptores (IFNRs y TLRs).

Debido a la gran relevancia de los IFN tipo I en la regulación de la respuesta inmune tanto proliferativa como dentro de los mecanismos de tolerancia periférica, principalmente aquellos relacionados con la función de las células dendríticas tolerogénicas, su modulación involucra una compleja red de factores, dentro de los cuales se destacan los factores reguladores del IFN (IRFs).

Actualmente se han descrito 9 miembros de la familia de factores de transcripción IRF (IRF 1-9), los cuales contienen un dominio de unión a DNA rico en triptófano, el cual reconoce a la secuencia correspondiente al elemento de respuesta estimulado por interferón (ISRE)[19]. Su expresión es predominante en células de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa. Los IRFs pueden actuar como activadores (ej IRF-1) o represores (ej IRF-2)[20], e interactúan con otros factores, tales como STAT y NF- κ B. Dentro de los múltiples genes que regulan se encuentran IFN- α y β , IL-12p40, IL-15, p21, iNOS y múltiples caspasas, entre otros[21].

En términos del desarrollo de patologías autoinmunes, específicamente, LEG, el incremento en la activación de la vía de INF- α se ha propuesto como uno de los mecanismos fisiopatogénicos, así como un potencial biomarcador. Por lo anterior, se ha sugerido que los elementos involucrados en la regulación de esta vía pueden formar parte del esquema fisiopatogénico de diversas enfermedades autoinmunes, como LEG. Dentro de éstos, los IRFs juegan un papel de gran relevancia, tanto por sus funciones biológicas como por los diversos estudios de asociación genética que los han catalogado como genes

de susceptibilidad para LEG[22, 23].

El LEG constituye una patología autoinmune, cuyo contexto genético es muy complejo y hasta el momento se han reportado una gran diversidad de genes de susceptibilidad, cuya contribución varía dependiendo del grupo étnico[24-26] y en algunos casos del grupo étnico[27]. Asimismo, se ha descrito la relevancia de la interacción entre algunos de ellos, como determinantes de susceptibilidad tanto para la enfermedad, como algunos asociados a la predominancia de algunas manifestaciones clínicas [17]. Dentro de los múltiples loci de susceptibilidad descritos, se destacan los siguientes: *IRF-5, MHC, TNFSF4, BANK1, CTLA-4, STAT-4 y PTPN22*[24, 28, 29].

Diversos estudios de asociación genética han relacionado a múltiples polimorfismos de IRF-5 con la susceptibilidad para LEG en diversos grupos étnicos[30, 31], incluyendo población mestiza mexicana[32] o de origen amerindio[33]. Así mismo, se han reportado múltiples variantes funcionales, las cuales se han asociado tanto con la susceptibilidad a LEG[34-36], como con algunas manifestaciones clínicas como nefritis[37] o niveles elevados de anti-DNAc[38].

El cDNA de IRF-5 proveniente de CD4 o células B codifica para una proteína de 488 aminoácidos[39], la cual tiene una expresión diferencial dependiente del estímulo (ej virus) y la forma fosforilada es capaz de inducir la producción de IFN tipo I en conjunto con IRF-3, aún en ausencia de IRF-7[40, 41].

Dentro de las diversas variantes génicas que se han reportado, las de mayor relevancia, en términos de funcionalidad evaluada mediante su asociación con niveles incrementados de INF- α en suero de pacientes con

LEG, se encuentran las siguientes: rs2004640, rs3807306 y rs10488631[42-44]. Los estudios previamente citados evalúan la asociación de dichas variantes génicas (SNPs) con niveles incrementados de IRF-5, tanto a nivel de RNAm como de proteína, así como con incremento en los niveles séricos de IFN- α . Sin embargo, dicha expresión se ha evaluado en CMN y los niveles de INF en suero, lo cual puede no reflejar la fuente principal de la sobreexpresión de IFN tipo I, es decir las CDs y la producción de dicho IFN y otras citocinas por esta subpoblación celular, cuyo fenotipo y funcionalidad se ha mostrado alterado, tanto en modelos murinos como en humanos con LEG por múltiples autores[45-47].

Desde el punto de vista funcional, Yasuda K y cols [48] demostraron que la inducción de producción de interferón tipo I (α y β) e IL-6 por DCs por complejos inmunes que contienen RNA y ligandos de TLR7 y TLR9 es dependiente de IRF-5 en CDs de ratones que fueron estimulados con suero o IgG purificada de pacientes con LEG. Asimismo, se ha demostrado que los ligandos de TLR-4 (LPS) inducen la producción de IFN- α por CDs de ratón y por monocitos humanos, posterior a la estimulación con IFN- β , lo cual es dependiente de la expresión de IRF-5 y de la señalización a través de TRIF y MyD88[49].

Lo anterior sugiere que la expresión de IRF-5 puede funcionar como un mecanismo de retroalimentación positiva para amplificar la señalización a través de IFN tipo I, lo cual podría potenciar dicha vía en un contexto inadecuado, es decir en presencia de auto-antígenos, específicamente aquellos que contengan RNA y que funcionen como ligandos para TLRs.

Recientemente, se ha reportado que la inhibición de la expresión endógena de miRNA-146a incrementó la producción de IFN tipo I por CMN de pacientes con LEG mediante la modulación de IRF-5 y STAT-1[50], lo cual sugiere que la regulación de IRF-5 puede presentarse a diversos niveles y que implica una gran variedad de elementos, pues su modulación es de gran impacto dentro de la activación de la vía de IFN tipo I.

En resumen, actualmente existe evidencia de que la sobre-expresión de IFN tipo I es considerada la firma molecular de LEG y que el factor de transcripción IRF-5, juega un papel relevante dentro de la fisiopatogenia de patologías autoinmunes, tales como LEG. La principal asociación proviene de estudios genéticos en los cuales, diversas variantes génicas de IRF-5 se han asociado a un incremento en los niveles séricos de IFN tipo I y han correlacionado con algunas manifestaciones clínicas o serológicas de LEG. Las CD8 son consideradas como la principal fuente de IFN tipo I, sin embargo en humanos la producción de IFN tipo I se ha evaluado básicamente en CMN, lo cual pudiera no ser representativo desde el punto de vista fisiopatogénico. Sin embargo, desde el punto de vista funcional se desconoce si existen alteraciones en la expresión de IRF-5 en CD8 de pacientes con LEG y su impacto en la producción de IFN tipo I por esta población celular, lo cual a su vez podría asociarse a un incremento en CD8 inmunogénicas vs tolerogénicas.

Planteamiento del Problema

El LEG es considerado como el prototipo de las enfermedades autoinmunes. Se han descrito múltiples alteraciones en los mecanismos de tolerancia periférica, que caracterizan dicha patología. La alteración en la expresión de genes de la firma molecular de LEG, tales como IRF-5 puede tener un papel en la ruptura de la tolerancia periférica, con un incremento en la producción de CDs inmunogénicas, lo cual podría asociarse a la persistencia de patología autoinmune como LEG. Actualmente se desconoce si existen alteraciones en la expresión y funcionalidad de IRF-5 en pacientes con LEG.

Justificación

El lupus eritematoso generalizado es considerado el prototipo de las enfermedades autoinmunes, por lo que su estudio es de gran relevancia para el conocimiento de la fisiopatogenia de este grupo de enfermedades, cuyo impacto en morbilidad y mortalidad es ampliamente reconocido.

Por su parte, también es importante resaltar que recientemente se ha demostrado que la incidencia en población catalogada como “hispana” es mayor a la reportada para otros grupos étnicos, llegando a ser de aproximadamente 94 casos por 100 000 individuos [51], mientras que en Estados Unidos se han reportado entre 14.6 y 50.8 casos por 100 000 individuos [52].

Desde el punto de vista fisiopatogénico, las alteraciones en la expresión y funcionalidad de IRF-5 pueden relacionarse con un incremento en la producción de IFN tipo I y funcionar como un mecanismo de retroalimentación positiva, que permita que se sobre-exprese IFN tipo I, en condiciones en las

que exista un microambiente que lo favorezca (mayor expresión de ligandos de TLR-4, 7 y 9. La evaluación de la expresión y funcionalidad de IRF-5 por CDs, las cuales constituyen la principal fuente de producción de IFN tipo I es de gran relevancia para ampliar el modelo fisiopatológico de la enfermedad.

Pregunta de Investigación

¿Cuáles son las alteraciones en la expresión y funcionalidad de IRF-5 en células dendríticas de pacientes con LEG?

Hipótesis

La expresión del transcrito de IRF-5 es mayor en CDs provenientes de pacientes con LEG en comparación con controles sanos, lo cual se asocia a un incremento en la producción de IFN tipo I, IL-6 e IL-10 por dichas CDs.

Objetivos

General

Evaluar la expresión y funcionalidad de IRF-5 en células dendríticas de pacientes con LEG.

Específicos

1. Evaluar la expresión del transcrito del gen de IRF-5 en células dendríticas de pacientes con LEG por PCR en tiempo real.
2. Evaluar la expresión de IRF-5 a nivel de proteína en células dendríticas de pacientes con LEG, tanto por citometría de flujo como por Western

Blot.

3. Evaluar la funcionalidad de IRF-5, en términos de la producción de IFN- α , IL-6, e IL-10 en CDs de pacientes con LEG ante diferentes estímulos (ligandos de TLR-4, TLR-7, TLR-9 y suero de pacientes con LEG).

Material y Métodos

Pacientes y Controles. Se estudiaron 37 pacientes entre 18 y 45 años de edad, con diagnóstico de LEG acorde a los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología [53] provenientes del servicio de consulta externa de reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Se obtuvo información clínica relevante a partir de su expediente y se registró la actividad de su enfermedad el día de la toma de la muestra de acuerdo al índice SLEDAI [54].

Criterios de Inclusión

Pacientes:

- Pacientes de 18 a 45 años de edad con diagnóstico de LEG según los criterios del Colegio Americano de Reumatología, que se encuentren en remisión (SLEDAI=0) ó activos (SLEDAI \geq 6).
- Sin antecedente de tratamiento con corticoesteroides e inmunosupresores en los 12 meses previos a la toma de muestra para pacientes en remisión y 1 mes previo para pacientes activos.
- Aceptación voluntaria de ingreso al estudio (consentimiento informado).

Controles:

- Individuos sanos de 18 a 45 años de edad.
- Sin antecedentes heredo familiares de LEG.

Criterios de Exclusión

- Diagnóstico o sospecha de proceso infeccioso al momento de la toma de muestra.
- Diagnóstico de neoplasia al momento de la toma de muestra o en los 5 años previos.
- Diagnóstico de embarazo o puerperio.

La participación de los pacientes y controles fue voluntaria; cada individuo firmó una hoja de consentimiento informado (Anexo 1).

Cálculo del tamaño de la muestra

Actualmente no contamos con datos sobre la expresión del transcrito de IRF-5 en CDs, por lo que se realizó un estudio exploratorio en 74 sujetos (37 pacientes y 37 controles).

Obtención de células. Los experimentos se realizaron con monocitos obtenidos de sangre periférica. A cada sujeto se le extrajeron 60 mL de sangre venosa periférica, la cual se anticoaguló con heparina.

Se separaron las células mononucleares, por centrifugación a través de gradientes de densidad (Ficoll-Hypaque). Posteriormente se purificaron los monocitos por selección positiva utilizando un anticuerpo anti-CD14 precubierto con microesferas magnéticas.

Maduración de CDs. A partir de los monocitos purificados, se diferenciaron *in vitro* hacia CDs, mediante el empleo de GM-CSF (50 ng/ml), IL-4 (15 ng/ml) y LPS (200 ng/ml), éste último con el fin de inducir la maduración de las células dendríticas.

Fenotipificación de CDs. Mediante citometría de flujo se corroboró la maduración de CDs, empleando marcadores de superficie, tales como CD40, CD80, HLA-DR, CD86, CD11c. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-HLA-DR acoplado a PerCP, anti-CD80 y anti-CD86 acoplados a PE-Cy5, anti-CD40 acoplado a FITC, anti-CD11c acoplado a PE (se utilizaron anticuerpos de las siguientes marcas comerciales: BD Biosciences, San Jose, CA). Para el marcaje intracelular de IRF5, se utilizó un anticuerpo anti-IRF5 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA) purificado. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de ratón generado en conejo marcado con PE (BD Biosciences).

Las células dendríticas maduras se incubaron con los anticuerpos de superficie durante 20 minutos a 37°C, posteriormente se lavaron y permeabilizaron con el kit Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences). Una vez permeabilizadas se incubaron con el anticuerpo anti-IRF5 purificado, durante 20 minutos a 4°C, posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a PE. La adquisición de datos se realizó mediante el uso del citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson), con el software CellQuest.

Expresión del transcrito de IRF-5. Se obtuvo RNA total de las células dendríticas maduras como se ha reportado previamente mediante el empleo de RNeasy Kit (QIAGEN) y posteriormente se sintetizó DNAc por RT-PCR mediante el empleo de polimerasa AMVRT como se reportó previamente[58]. Se amplificó el transcrito de IRF5 por medio de PCR en tiempo real usando primers específicos para IRF-5: Forward: CTGCTCCCACAGACTCCCAG; Reverse: TCCTCTCCTGCACCAAAGAG [59].

Expresión de la proteína IRF-5 por Western Blot. Las células

dendríticas se lisaron con 10 ul de buffer ELB (Hepes 50 mM pH 7.4, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, NP-40 0.1%, NaF 10 mM, BGP 50 mM, Na₃VO₄ 1 mM) e inhibidores de proteasas. Las proteínas se separaron mediante un SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó por 12 horas en presencia del anticuerpo IRF5 purificado, posteriormente se incubó en presencia de un anticuerpo secundario conjugado a HRP. La membrana se reveló utilizando el reactivo ECL-PLUS.

Funcionalidad de IRF-5: Se evaluará mediante la medición de IFN tipo I, IL-6 e IL-10 en los sobrenadantes de los cultivos de CDs maduras mediante ELISA. Asimismo, se evaluará la producción de IFN tipo I en suero de pacientes con LEG.

Se evaluará la respuesta en términos de producción de IFN tipo I de las CDs maduras tanto de pacientes como controles, posterior a la estimulación con ligandos de TLR-4, 7 y 9, así como del suero de pacientes con LEG.

Análisis Estadístico. Los resultados se expresan en términos de mediana e intervalo intercuartilar. Se realizó la comparación entre grupos por variable desenlace mediante U de Mann Whitney. Se consideró como significancia estadística una $p < 0.05$. El análisis se realizó con apoyo del programa estadístico SPSS para Windows versión 16.0.

Consideraciones Éticas

La participación de los pacientes y controles será voluntaria; cada individuo firmará una hoja de consentimiento informado (Anexo 1).

Los investigadores se apegarán a los preceptos de la Declaración de Helsinki. Así mismo, seguiremos los lineamientos éticos en materia de investigación que señala la Norma Oficial Mexicana (NOM 166-SSA1-1997).

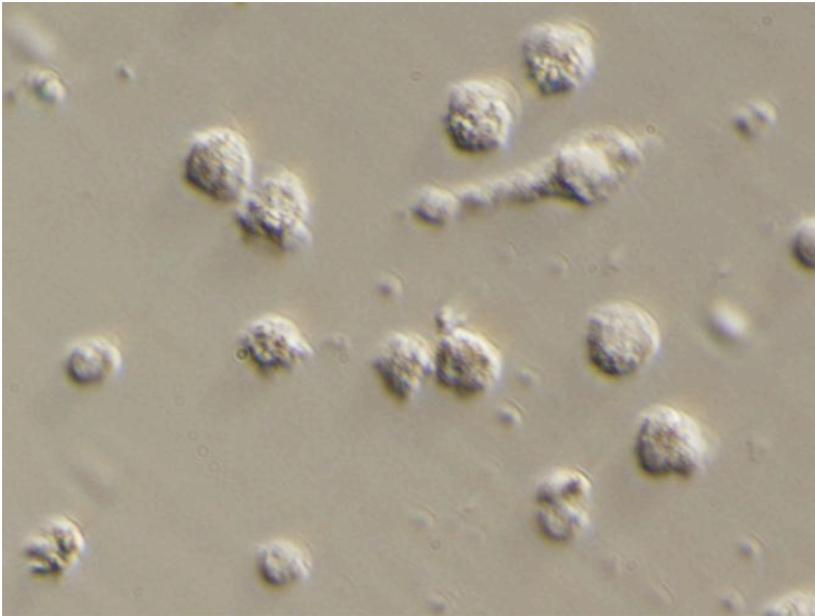
El proyecto ya fue autorizado por el Comité de ética institucional, con el número de referencia REF.98.

Financiamiento

El proyecto cuenta con financiamiento FONCICYT. IRE-98-09/11-1.

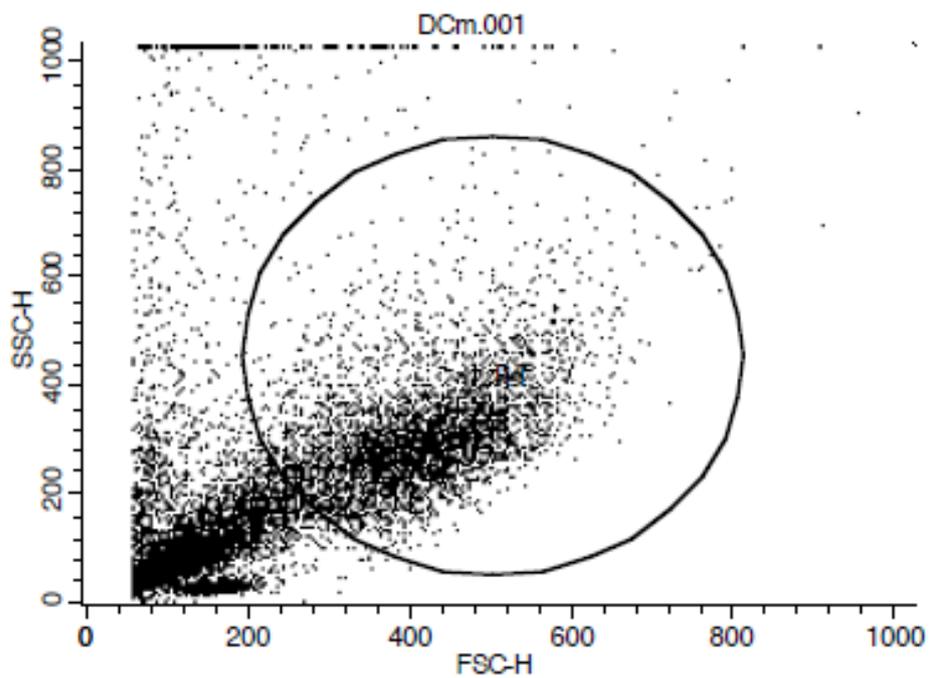
Resultados

Se reclutaron 35 pacientes con LEG y 35 controles sanos.



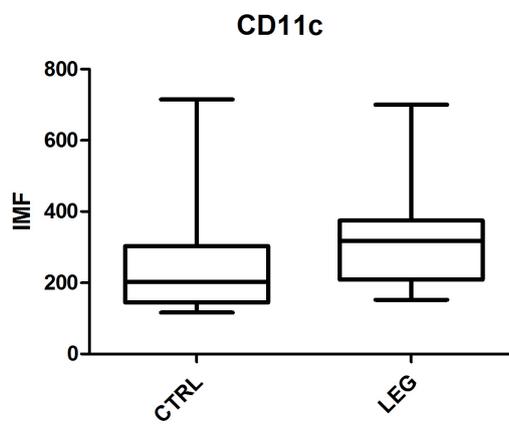
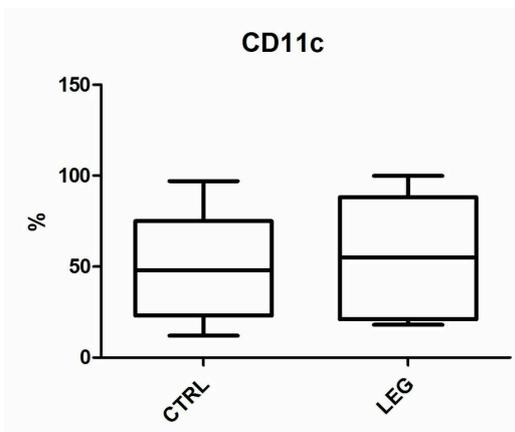
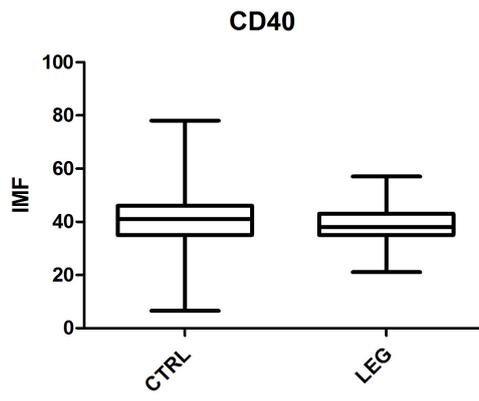
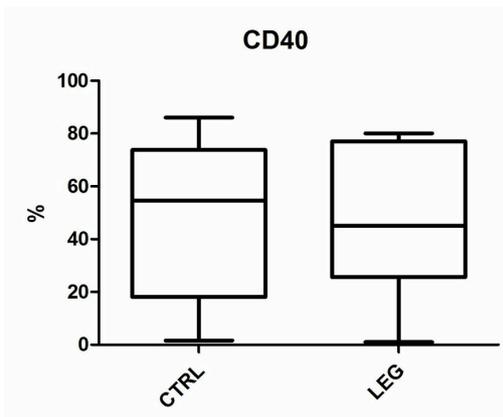
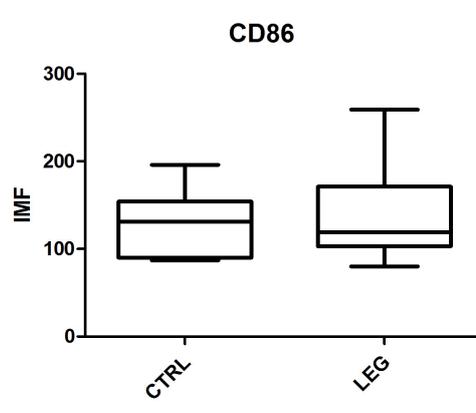
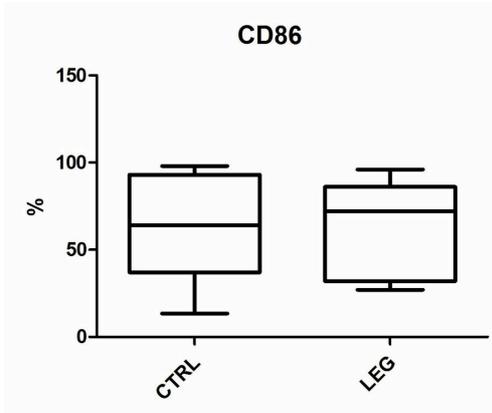
Cultivo de monocitos en presencia de GM-CSF e IL-4 para inducir la diferenciación hacia células dendríticas.

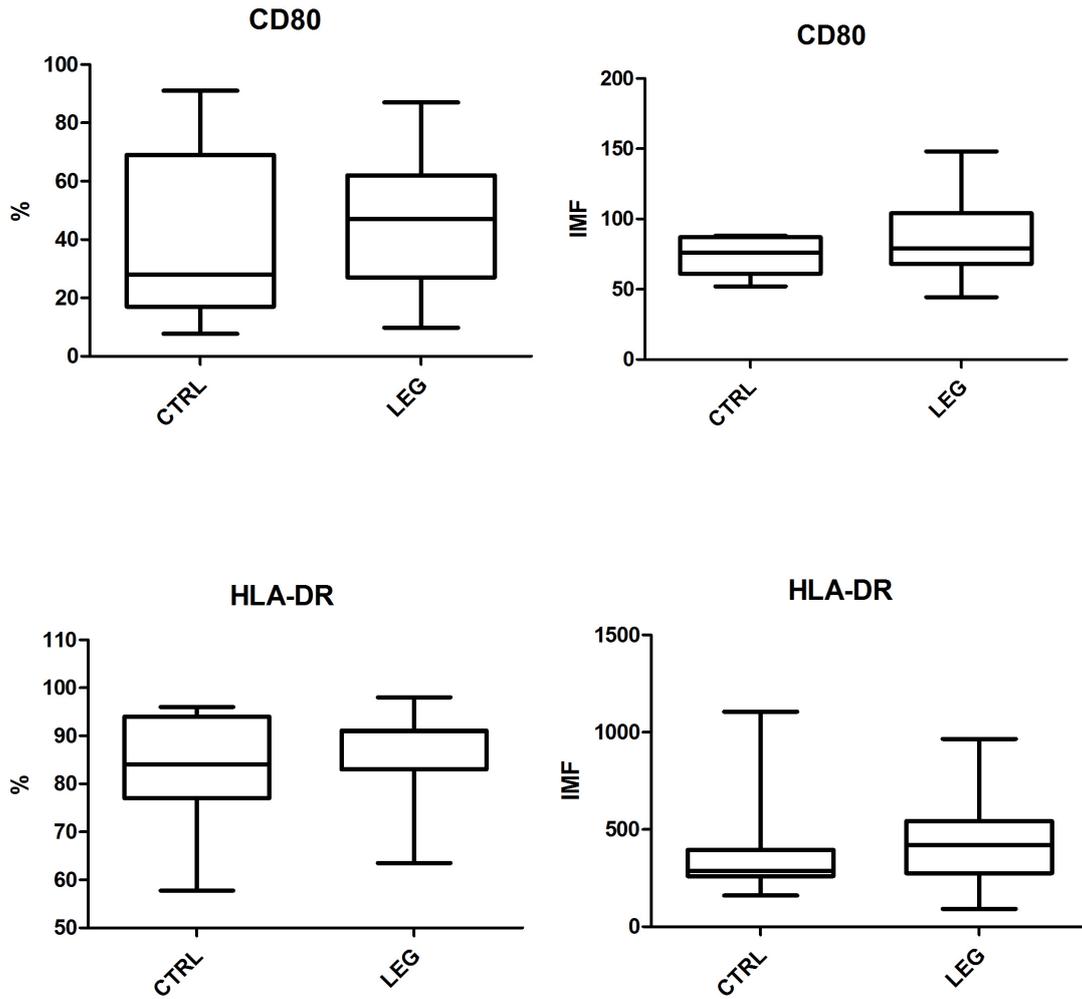
Se realizaron marcajes de moléculas de superficie sobre las células dendríticas maduras y posteriormente se evaluaron por citometría de flujo.



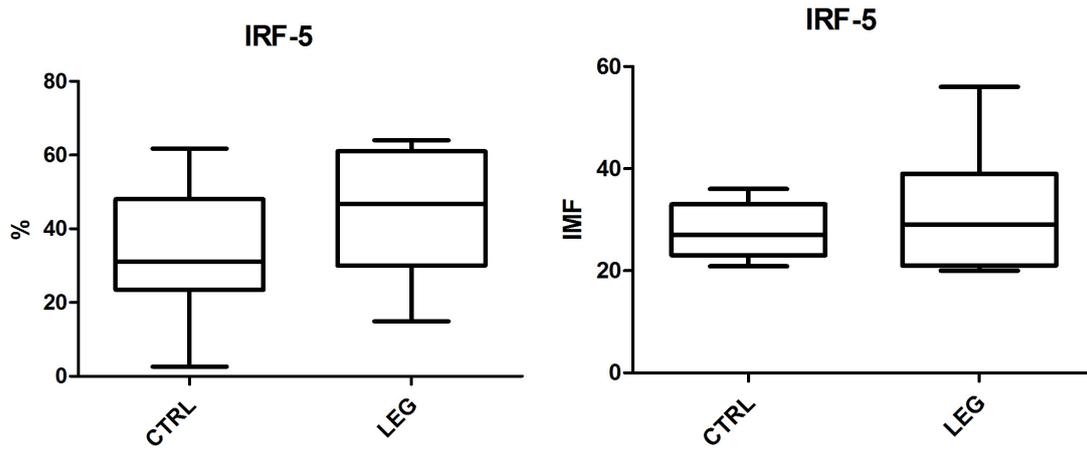
Población de células dendríticas maduras

En cuanto a la expresión de moléculas de superficie no hubo diferencias al comparar pacientes vs controles, se evaluó tanto porcentaje de células positivas como intensidad media de fluorescencia. (n=11)

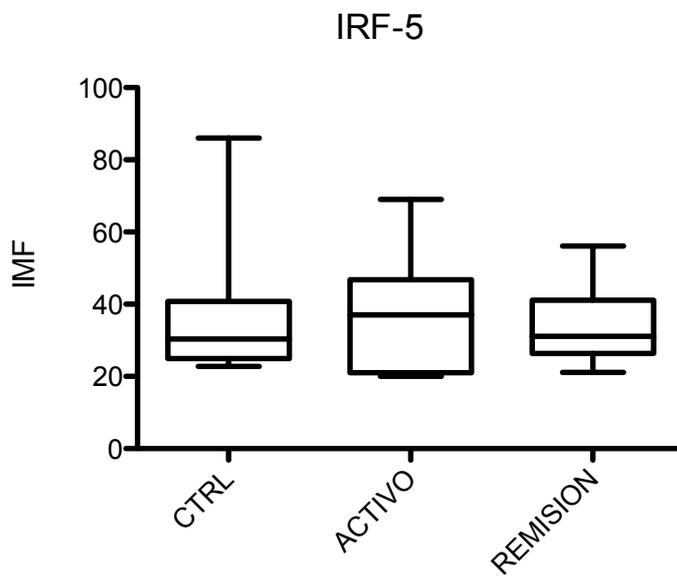




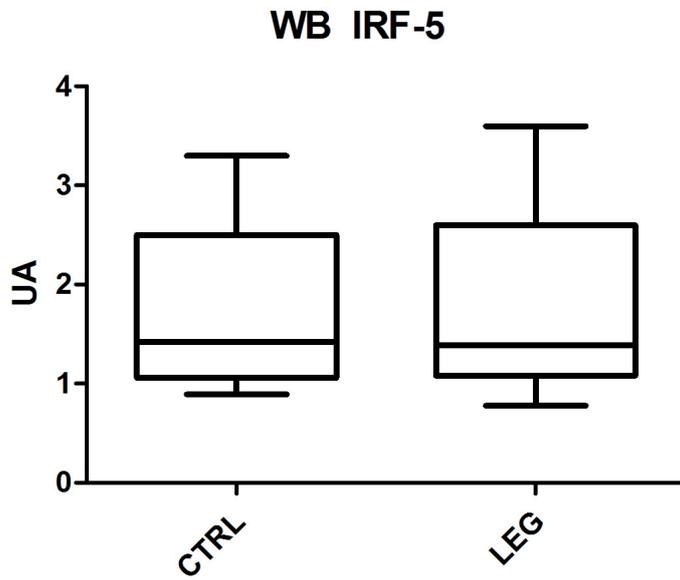
Se realizó marcaje intracelular para IRF-5, no se encontraron diferencias entre pacientes vs controles, tanto en porcentaje de células positivas como intensidad media de fluorescencia. (n=11)



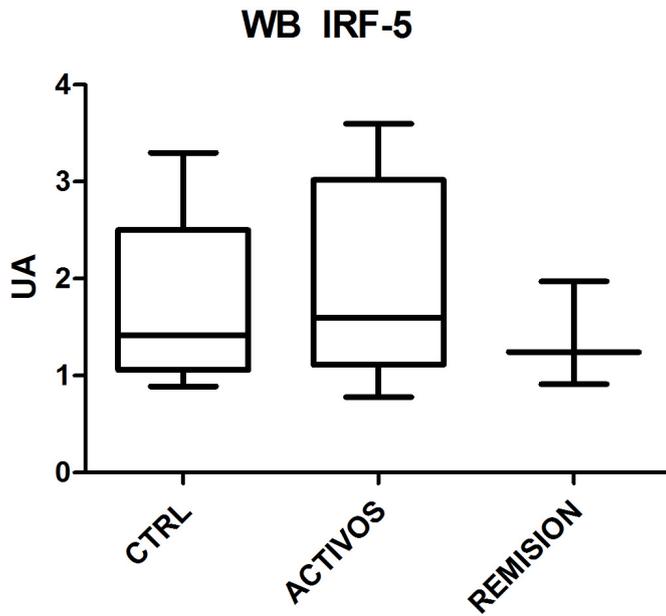
Al comparar la expresión de IRF-5 en pacientes activos vs en remisión tampoco se encontraron diferencias.



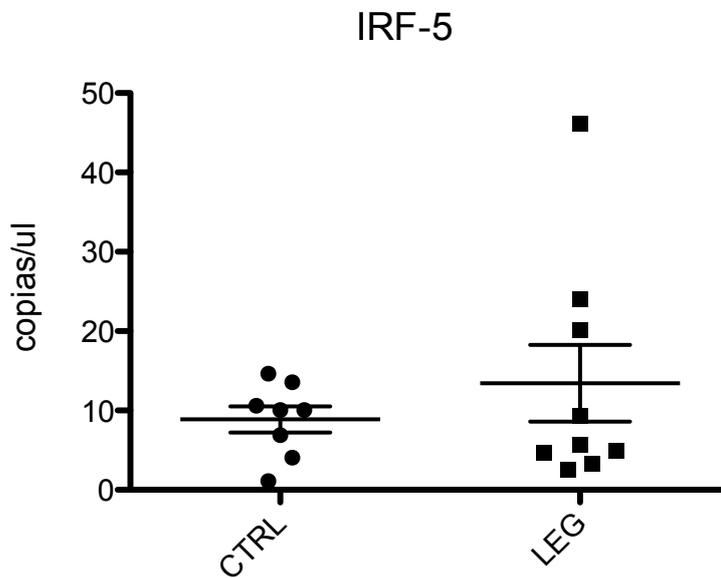
Se analizó la expresión de IRF-5 a nivel de proteína por medio de Western blot, sin encontrarse diferencias entre pacientes vs controles. (n=11)



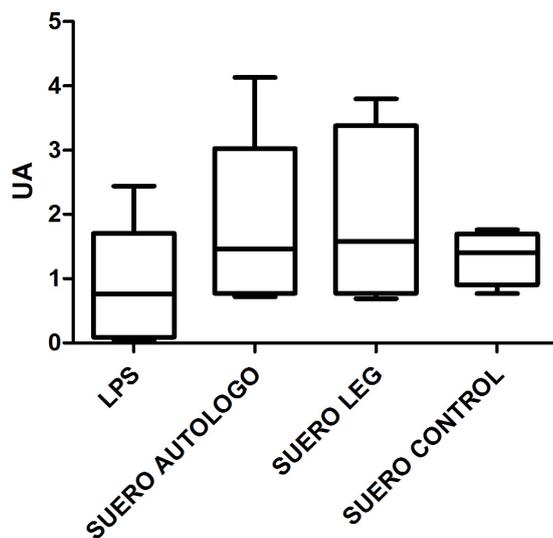
Tampoco se encontraron diferencias al comparar pacientes activos vs remisión.



Así mismo se analizó la expresión del transcrito de IRF-5 por medio de PCR en tiempo real, no se observaron diferencias entre pacientes y controles. (n=8)



Se analizó, por medio de Western Blot, la expresión de IRF-5 en células dendríticas maduras ante diferentes estímulos: LPS, suero autólogo, suero de pacientes con LEG activo y suero de controles sanos, no se encontraron diferencias significativas. (n=5)



Discusión

El lupus eritematoso generalizado se ha asociado con la “firma de interferón”, la cual se refiere a una regulación a la alta de genes responsables de la producción de Interferón (16,67,68). La producción de interferón alfa en pacientes con LEG se desencadena por complejos inmunes de anticuerpos y DNA o RNA de células dañadas; el interferón producido por las células dendríticas plasmacitoides actúa sobre las células dendríticas mieloides, desencadenando autoinmunidad mediada por células T y promoviendo la diferenciación de células B en células plasmáticas que producen anticuerpos autoreactivos.

Desde 2005 han surgido múltiples reportes que demuestran una asociación entre polimorfismos de IRF5 y un incremento o disminución del riesgo de desarrollar LEG en humanos (32,35,60-63), sin embargo poco se sabe acerca del papel que juega el IRF5 en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. En pacientes con LEG algunos polimorfismos se han asociado con niveles séricos elevados de IFN α (32,43), así mismo se ha observado que complejos inmunes presentes en el suero de pacientes con LEG inducen la producción de IL-6 e IFN tipo I por células dendríticas de ratones, y éste efecto se elimina en células dendríticas que carecen de IRF5 (48). Complejos inmunes que contienen DNA activan a las células dendríticas mediante TLR9 e inducen la producción de TNF- α , IL-12 e IFN- α (64,65), y complejos inmunes que contienen RNA activan a las células dendríticas mediante TLR7, resultando la producción de IL-6 e IFN- α (48,66). Con estos datos se ha sugerido que IRF5 promueve el desarrollo del LEG por medio de la inducción de dichas citocinas inflamatorias, probablemente en respuesta a los complejos inmunes compuestos por₂₃

autoanticuerpos y ácidos nucleicos.

Recientemente se demostró que la expresión de IRF5 en células mononucleares de pacientes con LEG se encuentra significativamente sobre-regulada en comparación con controles sanos, así mismo, se ha visto que el splicing alternativo se encuentra incrementado en pacientes con LEG, lo cual sugiere que pueden identificarse isoformas específicas de IRF5 en pacientes con LEG (42); sin embargo, éstos estudios se han hecho en células mononucleares totales de sangre periférica de pacientes con LEG, hasta la fecha no se ha analizado la expresión de IRF5 ni la producción de citocinas por células dendríticas en humanos, motivo por el cual, decidimos evaluar la expresión total de IRF5 exclusivamente en células dendríticas mieloides de pacientes con LEG. En contra de lo que se ha reportado previamente no encontramos diferencias en dicha expresión cuando lo comparamos con controles sanos, lo cual sugiere que la sobreexpresión de IRF5 no se encuentra en las células dendríticas mieloides, abriendo nuevas propuestas de investigación para analizar la expresión de IRF5 específicamente en células dendríticas plasmacitoides, ya que son, por excelencia, células productoras de IFN tipo I.

Por otra parte, aún queda por realizar la medición de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-12, TNF α e IFN α), ya que aunque no se han encontrado diferencias en cuanto a la expresión del transcrito de IRF5, es probable que la funcionalidad de dicho factor regulador se encuentre regulada a la alta específicamente en células dendríticas mieloides de pacientes con LEG, con la consecuente sobreproducción de dichas citocinas.

Conclusiones

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la expresión de moléculas de superficie en células dendríticas maduras de pacientes con LEG cuando se compararon con células dendríticas maduras de controles sanos; esto sugiere que no existen diferencias fenotípicas en cuanto al proceso de maduración de células dendríticas in vitro.

Tampoco se encontraron diferencias en cuanto a la expresión de IRF-5 en células dendríticas maduras de pacientes con LEG vs controles sanos, sin embargo aún queda por ser evaluada la funcionalidad de dicho factor de transcripción, mediante la medición de citocinas en los sobrenadantes de células dendríticas maduras ante los diferentes estímulos.

Al analizar la expresión de IRF-5 en pacientes con actividad de LEG vs pacientes en remisión, tampoco se encontraron diferencias significativas.

Referencias Bibliográficas

1. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**:767-811.
2. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002; **296**:298-300.
3. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; **296**:301-5.
4. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007; **449**:419-26.
5. Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sanchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol* 2008; **26**:293-316.
6. Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**:975-1028.
7. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**:275-306.
8. Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J, Murali-Krishna K. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med* 2005; **202**:637-50.
9. Marrack P, Kappler J, Mitchell T. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* 1999; **189**:521-30.
10. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**:307-36.
11. Schlaak JF, Hilkens CM, Costa-Pereira AP, Strobl B, Aberger F, Frischauf AM, Kerr IM. Cell-type and donor-specific transcriptional responses to interferon-alpha. Use of customized gene arrays. *J Biol Chem* 2002; **277**:49428-37.
12. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**:900-11.
13. Hata N, Sato M, Takaoka A, Asagiri M, Tanaka N, Taniguchi T. Constitutive IFN-alpha/beta signal for efficient IFN-alpha/beta gene induction by virus. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **285**:518-25.
14. Gottenberg JE, Chiochia G. Dendritic cells and interferon-mediated autoimmunity. *Biochimie* 2007; **89**:856-71.
15. Ytterberg SR, Schnitzer TJ. Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; **25**:401-6.
16. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, Pascual V. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 2003; **197**:711-23.
17. Feng X, Wu H, Grossman JM, Hanvivadhanakul P, FitzGerald JD, Park GS, Dong X, Chen W, Kim MH, Weng HH, Furst DE, Gorn A, McMahon M, Taylor M, Brahn E, Hahn BH, Tsao BP. Association of increased interferon-inducible gene expression with disease activity and lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2006; **54**:2951-62.

18. Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Peterson MG, Crow MK. Activation of the interferon-alpha pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. *Arthritis Rheum* 2005; **52**:1491-503.
19. Tamura T, Yanai H, Savitsky D, Taniguchi T. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol* 2008; **26**:535-84.
20. Harada H, Fujita T, Miyamoto M, Kimura Y, Maruyama M, Furia A, Miyata T, Taniguchi T. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* 1989; **58**:729-39.
21. Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**:623-55.
22. Kyogoku C, Tsuchiya N. A compass that points to lupus: genetic studies on type I interferon pathway. *Genes Immun* 2007; **8**:445-55.
23. Niewold TB, Hua J, Lehman TJ, Harley JB, Crow MK. High serum IFN-alpha activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2007; **8**:492-502.
24. Forabosco P, Gorman JD, Cleveland C, Kelly JA, Fisher SA, Ortmann WA, Johansson C, Johanneson B, Moser KL, Gaffney PM, Tsao BP, Cantor RM, Alarcon-Riquelme ME, Behrens TW, Harley JB, Lewis CM, Criswell LA. Meta-analysis of genome-wide linkage studies of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2006; **7**:609-14.
25. Kim I, Kim YJ, Kim K, Kang C, Choi CB, Sung YK, Lee HS, Bae SC. Genetic studies of systemic lupus erythematosus in Asia: where are we now? *Genes Immun* 2009; **10**:421-32.
26. Han JW, Zheng HF, Cui Y, Sun LD, Ye DQ, Hu Z, Xu JH, Cai ZM, Huang W, Zhao GP, Xie HF, Fang H, Lu QJ, Li XP, Pan YF, Deng DQ, Zeng FQ, Ye ZZ, Zhang XY, Wang QW, Hao F, Ma L, Zuo XB, Zhou FS, Du WH, Cheng YL, Yang JQ, Shen SK, Li J, Sheng YJ, Zuo XX, Zhu WF, Gao F, Zhang PL, Guo Q, Li B, Gao M, Xiao FL, Quan C, Zhang C, Zhang Z, Zhu KJ, Li Y, Hu DY, Lu WS, Huang JL, Liu SX, Li H, Ren YQ, Wang ZX, Yang CJ, Wang PG, Zhou WM, Lv YM, Zhang AP, Zhang SQ, Lin D, Low HQ, Shen M, Zhai ZF, Wang Y, Zhang FY, Yang S, Liu JJ, Zhang XJ. Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2009; **41**:1234-7.
27. Kariuki SN, Moore JG, Kirou KA, Crow MK, Utset TO, Niewold TB. Age- and gender-specific modulation of serum osteopontin and interferon-alpha by osteopontin genotype in systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2009; **10**:487-94.
28. Abelson AK, Delgado-Vega AM, Kozyrev SV, Sanchez E, Velazquez-Cruz R, Eriksson N, Wojcik J, Linga Reddy MV, Lima G, D'Alfonso S, Migliaresi S, Baca V, Orozco L, Witte T, Ortego-Centeno N, Abderrahim H, Pons-Estel BA, Gutierrez C, Suarez A, Gonzalez-Escribano MF, Martin J, Alarcon-Riquelme ME. STAT4 associates with systemic lupus erythematosus through two independent effects that correlate with gene expression and act additively with IRF5 to increase risk. *Ann Rheum Dis* 2009; **68**:1746-53.

29. Budarf ML, Goyette P, Boucher G, Lian J, Graham RR, Claudio JO, Hudson T, Gladman D, Clarke AE, Pope JE, Peschken C, Smith CD, Hanly J, Rich E, Boire G, Barr SG, Zummer M, Fortin PR, Wither J, Rioux JD. A targeted association study in systemic lupus erythematosus identifies multiple susceptibility alleles. *Genes Immun* 2010.
30. Kelly JA, Kelley JM, Kaufman KM, Kilpatrick J, Bruner GR, Merrill JT, James JA, Frank SG, Reams E, Brown EE, Gibson AW, Marion MC, Langefeld CD, Li QZ, Karp DR, Wakeland EK, Petri M, Ramsey-Goldman R, Reveille JD, Vila LM, Alarcon GS, Kimberly RP, Harley JB, Edberg JC. Interferon regulatory factor-5 is genetically associated with systemic lupus erythematosus in African Americans. *Genes Immun* 2008; **9**:187-94.
31. Lee YH, Song GG. Association between the rs2004640 functional polymorphism of interferon regulatory factor 5 and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Rheumatol Int* 2009; **29**:1137-42.
32. Reddy MV, Velazquez-Cruz R, Baca V, Lima G, Granados J, Orozco L, Alarcon-Riquelme ME. Genetic association of IRF5 with SLE in Mexicans: higher frequency of the risk haplotype and its homozygosity than Europeans. *Hum Genet* 2007; **121**:721-7.
33. Sanchez E, Webb RD, Rasmussen A, Kelly JA, Riba L, Kaufman KM, Garcia-de la Torre I, Moctezuma JF, Maradiaga-Cecena MA, Cardiel-Rios MH, Acevedo E, Cucho-Venegas M, Garcia MA, Gamron S, Pons-Estel BA, Vasconcelos C, Martin J, Tusie-Luna T, Harley JB, Richardson B, Sawalha AH, Alarcon-Riquelme ME. Genetically determined amerindian ancestry correlates with increased frequency of risk alleles for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2010; **62**:3722-9.
34. Ferreira-Neira I, Calaza M, Alonso-Perez E, Marchini M, Scorza R, Sebastiani GD, Blanco FJ, Rego I, Pullmann R, Jr., Pullmann R, Kallenberg CG, Bijl M, Skopouli FN, Mavromati M, Migliaresi S, Barizzone N, Ruzickova S, Dostal C, Schmidt RE, Witte T, Papasteriades C, Kappou-Rigatou I, Endreffy E, Kovacs A, Ordi-Ros J, Balada E, Carreira P, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Opposed independent effects and epistasis in the complex association of IRF5 to SLE. *Genes Immun* 2007; **8**:429-38.
35. Graham RR, Kyogoku C, Sigurdsson S, Vlasova IA, Davies LR, Baechler EC, Plenge RM, Koeth T, Ortmann WA, Hom G, Bauer JW, Gillett C, Burt N, Cunninghame Graham DS, Onofrio R, Petri M, Gunnarsson I, Svenungsson E, Ronnblom L, Nordmark G, Gregersen PK, Moser K, Gaffney PM, Criswell LA, Vyse TJ, Syvanen AC, Bohjanen PR, Daly MJ, Behrens TW, Altshuler D. Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**:6758-63.
36. Sigurdsson S, Goring HH, Kristjansdottir G, Milani L, Nordmark G, Sandling JK, Eloranta ML, Feng D, Sangster-Guity N, Gunnarsson I, Svenungsson E, Sturfelt G, Jonsen A, Truedsson L, Barnes BJ, Alm G, Ronnblom L, Syvanen AC. Comprehensive evaluation of the genetic variants of interferon regulatory factor 5 (IRF5) reveals a novel 5 bp length polymorphism as strong risk factor for systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 2008; **17**:872-81.
37. Qin L, Lv J, Zhou X, Hou P, Yang H, Zhang H. Association of IRF528

- gene polymorphisms and lupus nephritis in a Chinese population. *Nephrology (Carlton)* 2010; **15**:710-3.
38. Sigurdsson S, Nordmark G, Garnier S, Grundberg E, Kwan T, Nilsson O, Eloranta ML, Gunnarsson I, Svenungsson E, Sturfelt G, Bengtsson AA, Jonsen A, Truedsson L, Rantapaa-Dahlqvist S, Eriksson C, Alm G, Goring HH, Pastinen T, Syvanen AC, Ronnblom L. A risk haplotype of STAT4 for systemic lupus erythematosus is over-expressed, correlates with anti-dsDNA and shows additive effects with two risk alleles of IRF5. *Hum Mol Genet* 2008; **17**:2868-76.
 39. Barnes BJ, Moore PA, Pitha PM. Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes. *J Biol Chem* 2001; **276**:23382-90.
 40. Barnes BJ, Field AE, Pitha-Rowe PM. Virus-induced heterodimer formation between IRF-5 and IRF-7 modulates assembly of the IFNA enhanceosome in vivo and transcriptional activity of IFNA genes. *J Biol Chem* 2003; **278**:16630-41.
 41. Barnes BJ, Kellum MJ, Field AE, Pitha PM. Multiple regulatory domains of IRF-5 control activation, cellular localization, and induction of chemokines that mediate recruitment of T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 2002; **22**:5721-40.
 42. Feng D, Stone RC, Eloranta ML, Sangster-Guity N, Nordmark G, Sigurdsson S, Wang C, Alm G, Syvanen AC, Ronnblom L, Barnes BJ. Genetic variants and disease-associated factors contribute to enhanced interferon regulatory factor 5 expression in blood cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2010; **62**:562-73.
 43. Niewold TB, Kelly JA, Flesch MH, Espinoza LR, Harley JB, Crow MK. Association of the IRF5 risk haplotype with high serum interferon-alpha activity in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum* 2008; **58**:2481-7.
 44. Rullo OJ, Woo JM, Wu H, Hoftman AD, Maranian P, Brahn BA, McCurdy D, Cantor RM, Tsao BP. Association of IRF5 polymorphisms with activation of the interferon alpha pathway. *Ann Rheum Dis* 2010; **69**:611-7.
 45. Crispin JC, Alcocer-Varela J. The role myeloid dendritic cells play in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2007; **6**:450-6.
 46. Ding D, Mehta H, McCune WJ, Kaplan MJ. Aberrant phenotype and function of myeloid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2006; **177**:5878-89.
 47. Scheinecker C, Zwolfer B, Koller M, Manner G, Smolen JS. Alterations of dendritic cells in systemic lupus erythematosus: phenotypic and functional deficiencies. *Arthritis Rheum* 2001; **44**:856-65.
 48. Yasuda K, Richez C, Maciaszek JW, Agrawal N, Akira S, Marshak-Rothstein A, Rifkin IR. Murine dendritic cell type I IFN production induced by human IgG-RNA immune complexes is IFN regulatory factor (IRF)5 and IRF7 dependent and is required for IL-6 production. *J Immunol* 2007; **178**:6876-85.
 49. Richez C, Yasuda K, Watkins AA, Akira S, Lafyatis R, van Seventer JM, Rifkin IR. TLR4 ligands induce IFN-alpha production by mouse conventional dendritic cells and human monocytes after IFN-beta²⁹

- priming. *J Immunol* 2009; **182**:820-8.
50. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, Huang X, Zhou H, de Vries N, Tak PP, Chen S, Shen N. MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum* 2009; **60**:1065-75.
 51. Walsh BT, Pope C, Reid M, Gall EP, Yocum DE, Clark LC. SLE in a United States-Mexico Border Community. *J Clin Rheumatol* 2001; **7**:3-9.
 52. Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus* 2006; **15**:308-18.
 53. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; **25**:1271-7.
 54. Guzman J, Cardiel MH, Arce-Salinas A, Sanchez-Guerrero J, Alarcon-Segovia D. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices. *J Rheumatol* 1992; **19**:1551-8.
 55. Schwartz RH. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* 1996; **184**:1-8.
 56. Crispin J, Vargas-Rojas M, Alcocer-Varela J. Cell Proliferation Index. A reliable and validated method that quantifies cell proliferation according to CFSE dilution. *Clin Immunol* 2005; **115 (suppl 1)**:S267.
 57. Wang B, Chen J, Santiago FS, Janes M, Kavurma MM, Chong BH, Pimanda JE, Khachigian LM. Phosphorylation and acetylation of histone H3 and autoregulation by early growth response 1 mediate interleukin 1beta induction of early growth response 1 transcription. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; **30**:536-45.
 58. Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, Bernstein BE, Jaenisch R, Lander ES, Meissner A. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 2008; **454**:49-55.
 59. Arany ZP. High-throughput quantitative real-time PCR. *Curr Protoc Hum Genet* 2008; **Chapter 11**:Unit 11 0.
 60. Sigurdsson S, Nordmark G, Goring HH, Lindroos K, Wiman AC, Sturfelt G. Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 2005; **76**:528-37
 61. Graham RR, Kozyrev SV, Baechler EC, Reddy MV, Plenge RM, Bauer JW. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2006; **38**:550-5
 62. Shin HD, Sung YK, Choi CB, Lee SO, Lee HW, Bae SC. Replication of the genetic effects of IFN regulatory factor 5 (IRF5) on systemic lupus erythematosus in a Korean population. *Arthritis Res Ther* 2007; **9**:R32
 63. Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, Miyashita R, Hikami K, Kusaoi M. Association of IRF5 polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis Rheum* 2008; **58**:826-34
 64. Boule MW, Broughton C, Mackay F, Akira S, Marshak-Rothstein A, Rifkin IR. Toll like receptor 9-dependent and independent dendritic cell³⁰

- activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *J Exp Med* 2004;199: 1631-40
65. Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest* 2005;115:407-17
 66. Ledbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Schlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and toll like receptors. *Nature* 2002;416:603-7
 67. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, Shark KB, Grande WJ, Hughes KM, Kapur V. Interferon inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2610-15
 68. Crow MK, Kirou KA, Wohlgemuth J. Microarray analysis of interferon - regulated genes in SLE. *Autoimmunity* 2003;36:481-90

Anexo 1.

Carta de Consentimiento Informado

Análisis de la Expresión y Funcionalidad de IRF-5 en Células Dendríticas de Pacientes con Lupus Eritematoso Generalizado.

Dra. Karina Santana de Anda; Dra. Diana Gómez-Martín; Dra. Adriana Monsivías, Dr. Jorge Alcocer Varela. Departamento de Inmunología y Reumatología. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

Se me ha explicado, ampliamente y por escrito sobre la naturaleza y objetivos de este estudio. Se han atendido en el momento pertinente las dudas que tenía y han sido resueltas. Conozco los beneficios y responsabilidades derivadas de participar en este estudio.

Otorgo mi consentimiento para proporcionar ____ muestra (s) de sangre. De ella (s) se obtendrán monocitos y posteriormente células dendríticas, con el fin de estudiar la expresión (RNA y proteína) y función de la molécula IRF-5 (Factor Regulador de Interferón 5). Asimismo, se medirán niveles séricos de IFN tipo I. Las muestras sólo se emplearán para el propósito mencionado.

Acepto participar de manera voluntaria, seguro (a) de que se garantiza la confidencialidad de la información. Estoy enterado (a) de que podré retirarme del estudio en el momento en el que yo desee, sin perder ninguno de mis derechos de paciente del INCMNSZ o ser penalizado al hacerlo.

Fecha: _____

Nombre y firma del paciente: _____

Nombre y firma de un testigo: _____

Nombre y firma de un testigo: _____

Nombre y firma del investigador: _____