



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

CAMPO DEL CONOCIMIENTO DE LAS CIENCIAS MÉDICAS

ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL EXÓN 1 DEL GEN MBL2 Y
ATEROSCLEROSIS TEMPRANA EN PACIENTES CON SÍNDROME DE
ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDO PRIMARIO.

TESIS DOCTORAL CON PRODUCCIÓN CIENTÍFICA
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

DR. ANTONIO BARRERA CRUZ

TUTO PRINCIPAL:

DR. LUIS JAVIER JARA QUEZADA
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MÉXICO, D.F. JULIO DE 2014



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.

Índice

Resumen	3
Abstract	5
Introducción	7
Marco Teórico.....	8
Justificación	21
Pregunta de Investigación	22
Objetivos	23
Hipótesis.....	23
Metodología	23
Análisis estadístico	39
Resultados	40
Discusión.....	44
Conclusiones	46
Bibliografía	47
Anexos.....	53

Resumen

Antecedentes: El síndrome de anticuerpos antifosfolípido primario (SAAFP) es una enfermedad sistémica autoinmune, que se caracteriza por trombosis arterial o venosa y/o pérdida fetal recurrente, en asociación con la persistencia de anticuerpos antifosfolípido circulantes. El SAAFP representa la causa más frecuente de trombosis arterial o venosa en población joven sin factores de riesgo cardiovascular. Existe evidencia de que factores inflamatorios, genéticos y de la respuesta inmune innata, llamados factores de riesgo cardiovascular no tradicionales, están involucrados en la patogénesis de trombosis y aterosclerosis acelerada en este grupo de pacientes. La lectina de unión a manosa (MBL) es una proteína involucrada en la defensa inmune innata que se une a los azúcares en la superficie de microorganismos patógenos y activa el complemento. El gen MBL2 se ha localizado en el cromosoma 10q11.2-21, y contiene 4 exones. El exón 1 tiene 3 polimorfismos de nucleótido sencillo (SNPs) funcionales: codón 54 (alelo B), 57 (alelo C), y 52 (alelo D). Estas variantes alélicas producen cambios estructurales de la MBL y producen disminución de los niveles séricos de MBL, incremento en el riesgo de enfermedades autoinmunes, de trombosis arterial y de la prevalencia de la enfermedad cardiovascular en pacientes con enfermedad autoinmune.

Objetivos: 1) Investigar las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes del exón 1 del gen MBL2 en pacientes mestizos mexicanos no relacionados con SAAFP y sujetos sanos y, 2) Determinar la magnitud de la asociación entre los polimorfismos del gen de lectina de unión a manosa con engrosamiento de la arteria carótida íntima-media en mestizos pacientes mexicanos con SAAFP.

Pacientes y métodos: Se analizaron los polimorfismos funcionales del exón 1 (codón 54, 52 y 57) y la región promotora del gen MBL2 en 53 pacientes con SAAFP y 113 controles sanos pareados por edad y género. La genotipificación del exón 1 y la región promotora se realizó por RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción). El engrosamiento de íntima-media de la arteria carótida (ccIMT) se determinó por ecografía en modo B de alta resolución. Se

analizaron datos demográficos, clínicos e inmunológicos (edad, altura, peso, índice de masa corporal (IMC), ácido úrico, niveles séricos de homocisteína, los títulos de anticardiolipina IgG/IgM, y otros factores de riesgo cardiovascular tradicionales.

Resultados: De los 53 pacientes con SAAFP incluidos en el estudio, 45 (84,9%) eran mujeres y 8 (15,1%) eran varones con una edad media de $45,91 \pm 12,43$. No hubo una diferencia estadísticamente significativa entre la edad y el género en la población de estudio (53 casos y 113 controles). Se observó una mayor prevalencia del genotipo heterocigoto AB de la variante B (codón 54) en los pacientes con SAAFP en comparación al grupo control, 15.1% versus 0.9% ($p < 0.001$, OR 17.05, IC 95% 2.1 – 132.9), así como una mayor prevalencia de la variante LX/LY de la región promotora 22.6% versus 8.8% ($p = 0.006$, OR 2.77 (IC 95% 1.3 – 5.9) y de la variante LX/AA 18.9% versus 7.1%, $p = 0.02$, OR 2.6 (IC 95% 1.1 – 6.3). En el resto de las variantes alélicas no se observó diferencias estadísticamente significativas. Respecto a la asociación entre el engrosamiento de la íntima-media de la arteria carótida y el polimorfismo del exón 1 del gen MBL2 y de la región promotora, no se encontró asociación significativa con ninguna variante del exón 1 del gen MBL2. Se encontró asociación significativa entre el engrosamiento de la íntima-media de arteria carótida con mayor edad ($p < 0.001$), mayor tiempo de evolución de la enfermedad ($p = 0.01$) y en aquellos con elevación en los niveles séricos de colesterol total ($p = 0.009$) y triglicéridos ($p = 0.03$).

Conclusiones: Nuestros resultados confirman la presencia de polimorfismos en el exón 1 del gen MBL2 en pacientes con SAAF primario. Se observó una mayor prevalencia del genotipo heterocigoto AB de la variante B del exón 1 y de las variantes LX/LY y LX/AA de la región promotora del gen MBL2. No se demostró asociación significativa entre el engrosamiento de la íntima media de la arteria carótida y las variantes alélicas del exón 1 y de la región promotora del gen MBL. Los factores asociados con el engrosamiento de la íntima-media de arteria carótida son edad > 40 años, mayor tiempo de evolución de la enfermedad e hipercolesterolemia.

Abstract

Background: The primary antiphospholipid antibody syndrome (PAPS) is a systemic autoimmune disease characterized by arterial or venous thrombosis and/or recurrent fetal loss in association with the persistence of circulating antiphospholipid antibodies. The PAPS represents the most frequent cause of arterial or venous thrombosis in young people without cardiovascular risk factors. There is evidence that inflammatory, genetic and innate immune response, called factors nontraditional cardiovascular risk factors are involved in the pathogenesis of accelerated atherosclerosis and thrombosis in these patients. The mannose-binding lectin (MBL) is a protein involved in the innate immune defense, which binds to sugars on the surface of pathogens and microorganisms and activates the complement. The MBL2 gene has been localized to chromosome 10q11.2-21, and contains four exons. The exon 1 has 3 single nucleotide polymorphisms (SNPs) functional: codon 54 (allele B), codon 57 (allele C), and codon 52 (allele D). These allelic variants produce structural changes in the MLB and cause decreased serum levels of MBL, increased risk of autoimmune diseases, arterial thrombosis and the prevalence of cardiovascular disease in patients with autoimmune disease.

Objectives: 1) To investigate the allelic and genotypic frequencies of the variants of exon 1 of the MBL2 gene in Mexican Mestizo patients and unrelated healthy subjects PAPS and 2) determine the magnitude of the association between polymorphisms of binding lectin mannose with thickening of the carotid artery intima-media in patients with Mexican mestizos PAPS.

Patients and methods: Functional polymorphisms of exon 1 (codon 54, 52 and 57) and the promoter region of the MBL2 gene in 53 patients with PAPS and 113 healthy controls were analyzed matched by age and gender. Genotyping of exon 1 and the promoter region was performed by RFLP (polymorphisms of restriction fragment length). The intima-media thickening of the carotid artery (ccIMT) was determined by ultrasound high-resolution B-mode. Demographic, clinical and immunological data (age, height, weight, body mass index (BMI), uric acid, serum homocysteine, anticardiolipin titers IgG / IgM, and other traditional cardiovascular risk factors were analyzed.

Results: Of the 53 patients with PAPS included in the study, 45 (84.9%) were women and 8 (15.1%) were male with a mean age of 45.91 ± 12.43 . There was no statistically significant difference between age and gender in the study population (53 cases and 113 controls). A higher prevalence of heterozygous genotype AB variant B (codon 54) in patients with PAPS compared to the control group, 15.1% versus 0.9% ($p < 0.001$, OR 17.05, 95% CI 2.1 - 132.9) was observed as well a higher prevalence of the LX / LY variant of the promoter region 22.6% versus 8.8% ($p = 0.006$, OR 2.77 (95% CI 1.3 - 5.9) and the LX variant / AA 18.9% versus 7.1%, $p = 0.02$, OR 2.6 (95% CI 1.1 - 6.3). In the rest of the allelic variants no statistically significant difference was observed. Regarding the association between thickening of the intima-media of the carotid artery and polymorphism of exon 1 of the MBL2 gene and the promoter region, no significant association was found with any variant of exon 1 of the MBL2 gene. In contrast, significant association between thickening of the intima-media carotid artery with older age ($p < 0.001$) was found, a longer history of the disease ($p = 0.01$) and those with elevated serum levels of total cholesterol ($p = 0.009$) and triglycerides ($p = 0.03$).

Conclusions: Our results confirm the presence of polymorphisms in exon 1 of the MBL2 gene in patients with primary PAPS. A higher prevalence of heterozygous genotype AB variant B of exon 1 and the LX / LY and LX / AA variants of the promoter region of the MBL2 gene was observed. No significant association between intima-media thickening of the carotid artery and allelic variants of exon 1 and the promoter region of the MBL gene was demonstrated. Factors associated with thickening of the intima-media carotid artery are age > 40 years, longer history of the disease and hypercholesterolemia.

Introducción

La aterosclerosis (AT) es un proceso inmune, inflamatorio, sistémico y progresivo, caracterizado por un engrosamiento gradual de la pared de los vasos que reduce la elasticidad vascular, favorece la formación de trombos y lesiona las capas íntima-media en la bifurcación de arterias principales.⁽¹⁾ Involucra el sistema arterial, ocasionando disfunción del endotelio y alteración del metabolismo de lipoproteínas que permiten la activación del sistema inmune con la consecuente proliferación de células de músculo liso, estrechamiento de la luz vascular y formación de ateroma en la íntima de las arterias.⁽²⁻⁴⁾

Existe evidencia de que la AT constituye una enfermedad dinámica de la íntima arterial, de inicio en etapas tempranas de la vida y que presenta manifestaciones y consecuencias clínicas en etapas tardías, su evolución clínica muestra una **fase asintomática** (< 35 - 40 años) en la que se puede observar engrosamiento adaptativo de la capa íntima-media de las arterias, disfunción endotelial, acumulación progresiva de lípidos y proliferación de miocitos y, una **fase sintomática** (> 45 a 50 años) en la que se presenta fractura de la placa y formación de trombo.⁽⁵⁾

A pesar del creciente conocimiento sobre la patogénesis de la AT, su mecanismo exacto de desarrollo es desconocido. De hecho, múltiples factores de riesgo cardiovascular tradicionales (diabetes mellitus, hipercolesterolemia, sedentarismo, hipertensión arterial, tabaquismo, obesidad, post menopausia e historia familiar de enfermedad cardiovascular) si bien predisponen al desarrollo de AT, no explican totalmente la prevalencia de la enfermedad coronaria, ya que hasta 25% de los pacientes no tiene ninguno de estos factores. Hasta el momento, se ha reconocido que la prevalencia de AT incrementa con la edad y, la incidencia de enfermedad cardiovascular es hasta dos veces mayor en hombres con relación a las mujeres con edad inferior a los 60 años, debido probablemente al papel protector de las hormonas.^(1,6-7) Asociado a estos factores de riesgo cardiovascular, existe evidencia de que la respuesta inmune, factores genéticos, metabólicos, infecciosos e inflamatorios, denominados factores de riesgo no tradicional, están involucrados en la patogénesis de AT.⁽⁸⁻⁹⁾

La aterosclerosis temprana, es un problema clínico bien establecido en pacientes con enfermedad autoinmune, observándose incremento en la prevalencia de engrosamiento de la íntima-media carotídea, formación de placa desde los 40 años de edad, enfermedad cardiovascular y muerte prematura. ^(3,10-11) En la actualidad, estudios de investigación básica y clínica, destacan como elementos prioritarios en el inicio y progresión de lesiones aterosclerosas, mecanismos inmunológicos y genéticos, al identificar: a) anticuerpos en la íntima de arterias aterogénicas humanas (antifosfolípidos, anti-lipoproteínas de baja densidad oxidadas, anti-choque térmico y anti- β_2 glicoproteína 1) y, b) polimorfismos del exón 1 del gen MBL2 en pacientes con enfermedad cardiovascular, aterosclerosis generalizada y enfermedad autoinmune, principalmente, lupus eritematoso sistémico, síndrome de anticuerpos antifosfolípido y artritis reumatoide. ⁽¹²⁻¹⁹⁾

Marco Teórico

El sistema del complemento juega un papel esencial en la defensa innata. El reconocimiento de los microorganismos por el complemento y, por tanto, la activación de éste, tiene lugar de tres formas distintas (Figura1) ⁽²⁰⁾: la vía clásica (VC), la cual emplea la proteína C1q para detectar inmunoglobulinas unidas a microorganismos u otras estructuras; la vía alternativa (VA), que se activa por el reconocimiento directo de la superficie de los microorganismos; y la vía de las lectinas (VL), la cual se activa por la unión de la lectina de unión a manosa (MBL), o ciertas ficolinas, a moléculas de carbohidratos presentes en la superficie de los microorganismos invasores, de manera independiente de anticuerpos. ^(21,22)

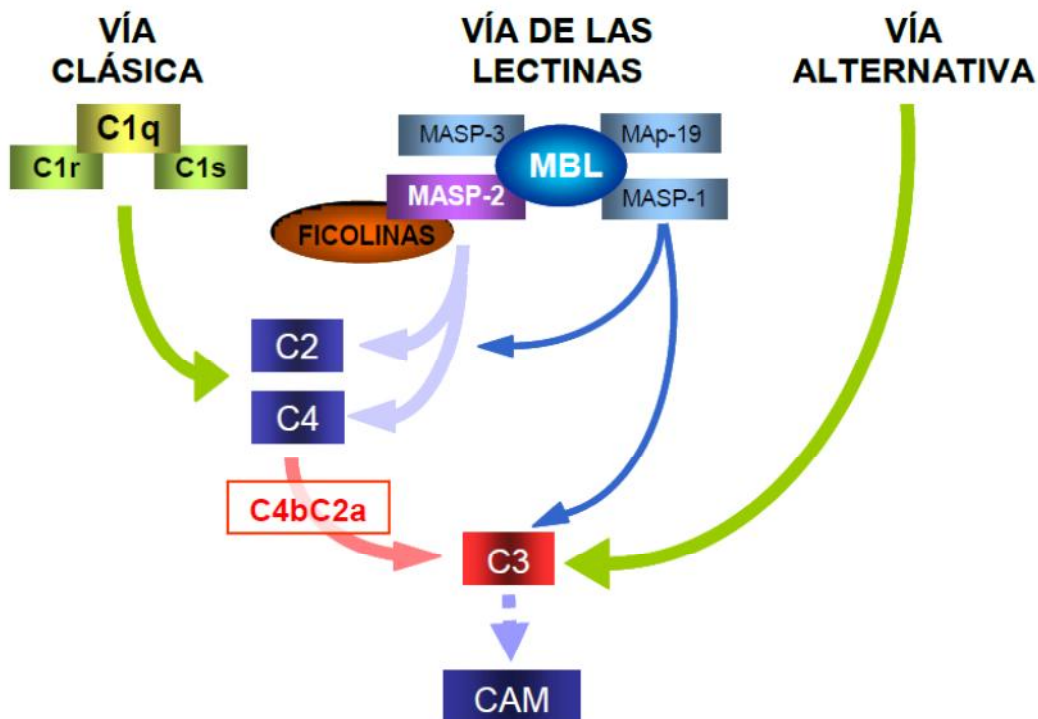


Figura 1. Esquema de las vías de activación del sistema del complemento. CAM: complejo de ataque a membrana.

ESTRUCTURA DE LA MBL HUMANA

La MBL es una proteína de la familia de las colectinas, que posee en la circulación una estructura oligomérica de dos a seis subunidades. Está formada por unidades estructurales de 96 KDa, que a su vez están compuestas por tres subunidades primarias idénticas de 32 KDa. Cada subunidad comprende 4 regiones distintas, codificadas por distintos exones del gen MBL2: un dominio C-terminal de reconocimiento calcio-dependiente de carbohidratos (CRD), una región bisagra hidrofóbica de α -hélice, un dominio de tipo colágeno y una región N-terminal (Figura 2) ⁽²³⁾. La MBL circulante se encuentra formando estructuras oligoméricas, incluyendo dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros y hexámeros de la unidad estructural homotrimérica.

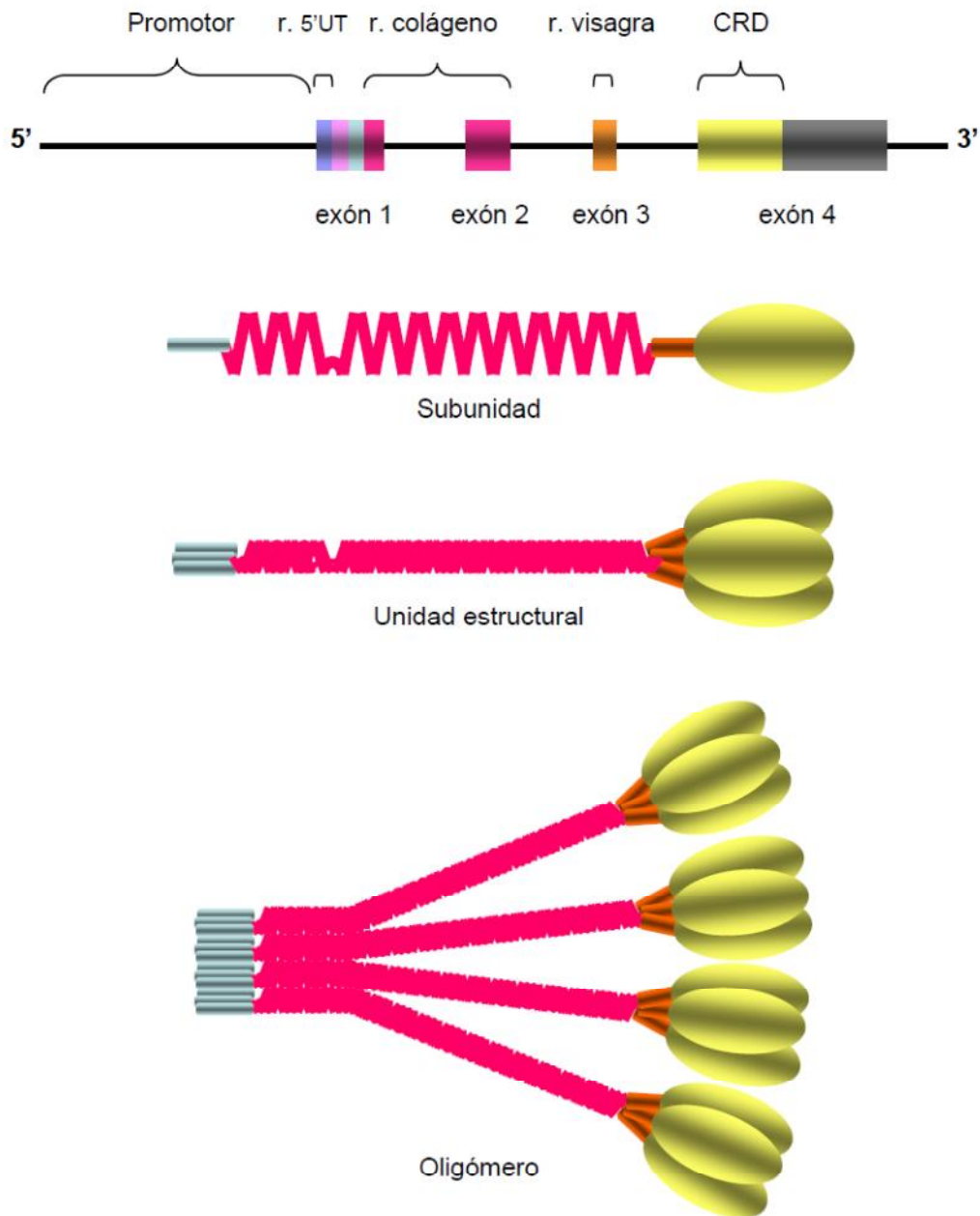


Figura 2. Estructura del gen MBL2 y de su producto proteico, la lectina de unión a manosa (MBL). En el esquema superior se representa la estructura del gen, señalándose los exones que codifican las diferentes regiones del polipéptido (subunidad). Tres subunidades iguales dan lugar a una unidad estructural, cuya oligomerización resulta en moléculas de MBL de distinto tamaño (el esquema inferior muestra una forma tetramérica). r.: región; CRD: dominio de reconocimiento de carbohidratos.

La lectina de unión manosa (MBL) es una glicoproteína dependiente de calcio, que actúa como una molécula de patrón de reconocimiento específico, que identifica y se une a carbohidratos presentes en la superficie de microorganismos patógenos, ácidos nucleicos, proteínas no glicosiladas y fosfolípidos, donde forma un complejo con proteínasas (MASP 1 y 2) que participan en la opsonización y lisis de bacterias (Figura 3). Esta conformación le permite a la MBL tener múltiples CRDs. Cada CRD es estructuralmente idéntico y es capaz de unirse a una variedad de motivos repetitivos de oligosacáridos, incluyendo N-acetilglucosamina, D-manosa, N-acetilmanosamina y L-fucosa, que se encuentran expuestos en elevada densidad en la superficie de bacterias, virus, hongos y protozoos, pero que están ausentes en la superficie de las células de los mamíferos. ⁽²³⁾

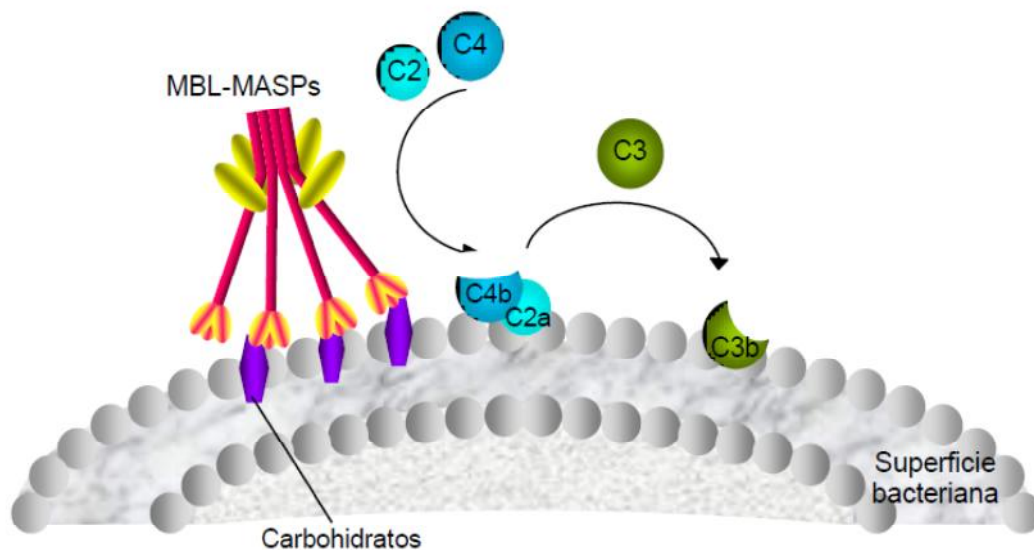


Figura 3. Unión del complejo MBL-MASPs a varios carbohidratos sobre la superficie bacteriana, lo cual activa la vía de las lectinas del sistema del complemento.

GENÉTICA Y NIVELES SÉRICOS DE LA MBL HUMANA

En humanos existen 2 genes MBL, el gen MBL1 es un pseudogén y el gen MBL2 codifica proteína. El gen MBL2 se localiza en el cromosoma 10 (10q11.2-q21). Este gen comprende 4 exones, de los cuales el exón 1 codifica el péptido señal (una región N-terminal de 20-21 aminoácidos rica en cisteína esencial para oligomerización y parte de la región de colágeno); el exón 2 la parte restante de la región de colágeno (formada por la repetición de 18-20 unidades o-glucosiladas); el exón 3 codifica la región bisagra (región corta flexible con estructura de alfa-hélice); y el exón 4 (región C terminal, que constituye el dominio globular de reconocimiento de carbohidratos, CRD). La región promotora codifica elementos reguladores, que afectan a la transcripción de la proteína.

El polimorfismo genético hace referencia a una variación en la secuencia de un lugar determinado del DNA entre los individuos de una población. Un polimorfismo de nucleótido sencillo o SNP (Single Nucleotide Polymorphism) es una variación en la secuencia de DNA que afecta a un solo nucleótido del genoma, este tipo de polimorfismos constituyen hasta el 90% de todas las variaciones genómicas humanas y aparecen cada 100 a 300 bases en promedio, a lo largo del genoma humano. Los SNP son de gran utilidad para la investigación médica debido a que no cambian mucho de una generación a otra y es sencillo seguir su evolución en estudios poblacionales.

Se han caracterizado varios polimorfismos en el gen MBL2, seis de los cuales determinan una considerable variación de la cantidad o funcionalidad de la proteína producida. En el exón 1, se han encontrado tres mutaciones puntuales que dan lugar a sustituciones de aminoácido en la región de colágeno. (Figura 4)

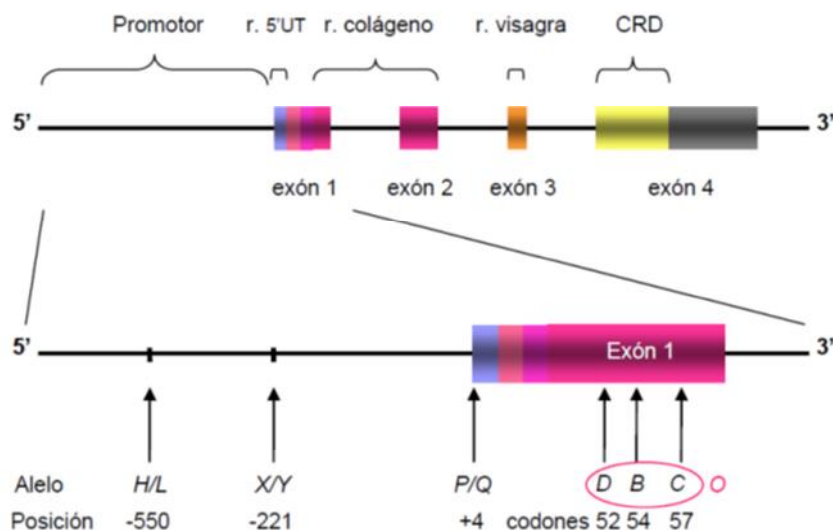


Figura 4. Variantes alélicas del gen MBL2. El esquema superior representa la estructura del gen MBL2. En el esquema inferior se representan la región promotora, la región 5'UT y el exón 1, señalándose los sitios polimórficos en el gen. r.: región; CRD: dominio de reconocimiento de carbohidratos

Estas mutaciones (SNP) (ver Tabla 1) originan los alelos variantes denominados D, B y C respectivamente, que se denominan de forma conjunta alelos O y, son los que se han asociado con baja producción de la proteína MBL y con la alteración de su capacidad funcional para activar el complemento. Por otra parte, el alelo salvaje "silvestre" se designa como alelo A (21,24)

Tabla 1. Polimorfismos del exón 1 del gen MBL2

Exón 1 Gen MBL2	Polimorfismo	Sustitución	Posición Nucleótido	Enzima
Variante B	Codón 54 (rs1800450)	glicina por ácido aspártico	230	Ban I
Variante C	Codón 57 (rs1800451)	glicina por ácido glutámico	239	Mbo II
Variante D	Codón 52 (rs5020737)	arginina por cisteína	223	Mwo I

De esta forma, los individuos portadores del alelo salvaje homocigotos se denominan A/A, los heterocigotos portadores de un alelo mutado, A/O, y los homocigotos mutados, O/O. Las sustituciones aminoacídicas resultantes dificultan el ensamblaje y/o la estabilidad de la unidad estructural homotrimérica de la proteína, de manera que interfieren en la formación de oligómeros de elevado orden, y resultan en una disminución de los niveles séricos de MBL funcional. La frecuencia de estos alelos variantes difiere entre las poblaciones humanas (Figura 5). Así, el alelo mutado B es relativamente común (12-25%) en poblaciones euroasiáticas, mientras que el alelo C es muy raro en euroasiáticos, pero muy común en poblaciones africanas subsaharianas (29%). Por su parte, el alelo D tiene una frecuencia aproximada del 5% en población caucásica, y está ausente en asiáticos y en la mayoría de las poblaciones africanas. Cabe destacar que la presencia del alelo D, si bien también disminuye los niveles séricos de proteína, tiene un efecto menos drástico en el descenso de la concentración que los alelos B y C. ^(25,26,27)

La deficiencia de MBL varía con relación a la etnia y haplotipo heredado, el cual es mayor en el caso de haplotipos homocigotos O/O (5% de las poblaciones europeas y norteamericanas) y menor en el caso de haplotipos heterocigotos A/O (36% de las poblaciones europeas y norteamericanas). ^(24,28)

En la región promotora y la región 5'UT del gen se han encontrado otros tres dimorfismos alélicos, los cuales afectan a la expresión de la proteína: en la posición -550 (G>C, alelos H/L, rs11003125), en la posición -221 (G>C, alelos Y/X, rs7096206) y en la posición +4 (C>T, alelos P/Q, rs7095891) (28,29) Como resultado de la combinación de las variantes de estas tres posiciones, se han observados cuatro haplotipos distintos: HYP, LYQ, LYP y LXP, los cuales se encuentran en fuerte desequilibrio de ligamiento con las mutaciones del exón 1, observándose así siete haplotipos comunes, denominados HYPA, LYQA, LYPA, LXPA, HYPD, LYPB y LYQC. Dado que cada individuo posee dos de estos haplotipos, existen 28 genotipos diferentes. De entre los haplotipos portadores del

alelo salvaje A, el HYPA es el que conlleva una mayor producción de MBL, mientras que el LXPA se asocia con una producción bastante reducida. La frecuencia de los siete haplotipos varía de forma considerable entre las distintas poblaciones humanas (25,27), lo cual refleja las respectivas edades de las mutaciones originales (fundadoras), la historia de las migraciones humanas, y las presiones selectivas ambientales que han actuado en el genoma humano (30)

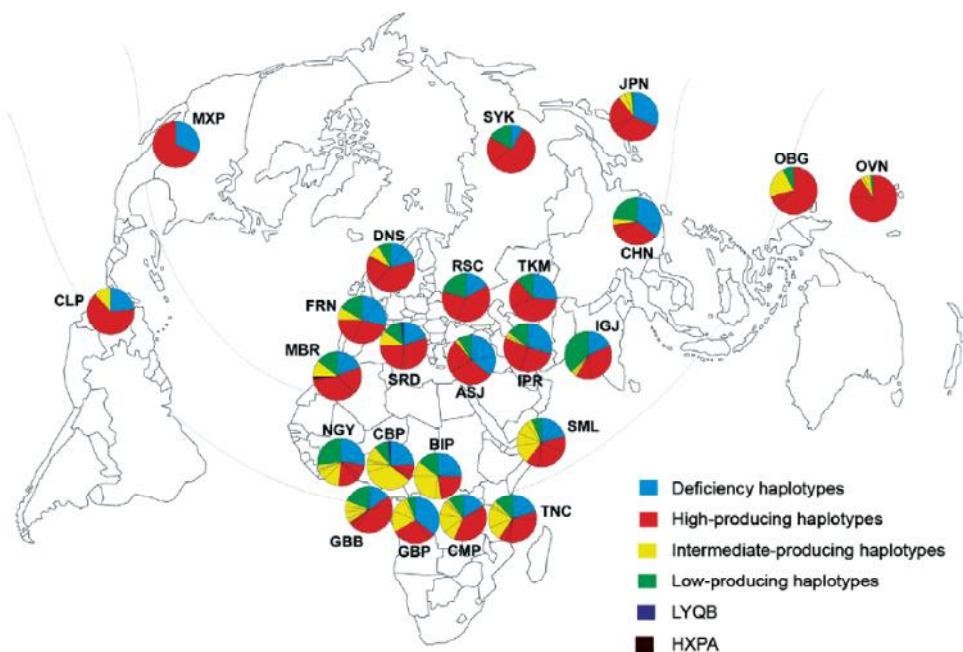


Figura 5. Distribución mundial de haplotipos de MBL

El hecho es que los humanos, debido mayoritariamente a estas variaciones genéticas, muestran notables variaciones en los niveles séricos de MBL, que oscilan entre 0 y 10,000 ng/ml. Diversas publicaciones muestran que los individuos homocigotos A/A presentan niveles séricos de proteína elevados (>1.000 ng/ml), mientras que los heterocigotos A/O tienen niveles más reducidos (300-1.000 ng/ml) y los homocigotos O/O niveles muy bajos o nulos de MBL (<100 ng/ml). También se ha observado que la presencia del alelo X en lugar del Y tiene un efecto importante de disminución de la producción de MBL. Una repercusión similar se ha observado con respecto a la presencia del alelo L en lugar del alelo H, e incluso del alelo P en lugar del Q, si bien en estos casos el efecto es mucho

menos marcado ^(28,31,32). Así, individuos portadores de alelos XA en ambos cromosomas tienen niveles séricos mucho menores de lo esperado en individuos A/A, e individuos portadores de alelos XA en un cromosoma y O en el otro (XA/O) tienen niveles muy bajos de MBL en suero. Es por ello que, en base a la correspondencia observada entre los alelos y los genotipos y los niveles séricos de MBL, los genotipos XA/O y O/O, se consideran genotipos de producción baja o nula de MBL. Aunque los resultados que asocian los genotipos con determinados niveles de proteína varían entre las poblaciones estudiadas, no hay consenso sobre el rango de concentración de MBL que constituye un valor sérico normal. Existen otros factores que afectan también a la producción de la MBL. De hecho, la MBL es una proteína de fase aguda que muestra un incremento moderado (de hasta tres veces) como consecuencia de infección o trauma. Del mismo modo, otros factores, como ciertas hormonas y citocinas, pueden influir en la síntesis de MBL. ^(23,33)

SIGNIFICADO CLÍNICO DE LA MBL

Actualmente se sabe que la MBL juega un papel importante en la respuesta inmune innata, destacando dentro de sus funciones: 1) activación del complemento por la vía de las lectinas, 2) promoción de la opsonofagocitosis independiente de complemento, 3) modulación de la inflamación, mediante la liberación de citoquinas proinflamatorias y 4) reconocimiento de estructuras propias alteradas y la eliminación de células apoptóticas (limitando la sobreexpresión de autoantígenos) ^(34,35,36) La fagocitosis es un paso crucial en la defensa para la eliminación de los patógenos. También es necesaria para la remodelación tisular durante el desarrollo y tras una lesión, y es un mecanismo de mantenimiento de la homeostasis mediante un aclaramiento rápido de las células apoptóticas. La MBL es un ligando de activación para la fagocitosis. En este sentido se ha observado que, in vitro, facilita directamente la eliminación rápida de células dañadas e impide la liberación de componentes intracelulares potencialmente dañinos. Al igual que otras colectinas, se une a determinadas

estructuras de carbohidratos sobre las superficies microbianas y facilita la eliminación de los patógenos. Además, se ha visto que la MBL influye en la producción de citocinas por los monocitos y los macrófagos. Estudios in vitro han mostrado que, junto con C1q, contribuye a la señalización a los monocitos de sangre periférica, modulando la expresión de las citocinas proinflamatorias. Esta modulación sería de utilidad durante el aclaramiento de las células apoptóticas, así como de otros restos celulares, disminuyendo una posible respuesta inmunológica aberrante contra las proteínas propias. Cabe señalar que el defecto en el aclaramiento de las células apoptóticas se ha implicado en la patogénesis de ciertas patologías autoinmunes. Diversos estudios apuntan a un papel complejo de la MBL en la inflamación; de hecho, parece ser que el efecto de la MBL sobre la producción de citocinas es dependiente de su concentración ⁽³⁷⁾

La elevada frecuencia de las variantes alélicas del gen MBL2, así como el hecho de la aparición de éstas en distintos grupos étnicos en diferentes áreas geográficas, sugiere que el defecto de MBL debe tener algún tipo de ventaja evolutiva. Actualmente hay dos hipótesis, no necesariamente excluyentes, para explicar la posible presión positiva que habría seleccionado a los alelos variantes de MBL2: la hipótesis principal sugiere que la MBL favorece la internalización de los microorganismos parásitos intracelulares, de modo que el defecto de MBL resultaría protector frente a la infección por dichos microorganismos; la otra hipótesis plantea que una activación excesiva de complemento puede ser perjudicial, de modo que el defecto de MBL y, por tanto, una reducción en la activación del complemento, resultaría benéfico en algunas circunstancias. Más recientemente otros autores han propuesto, como alternativa, la neutralidad evolutiva ⁽²⁴⁾

MBL y enfermedades no infecciosas.

El defecto de MBL se ha relacionado con diversos trastornos autoinmunes. Existen evidencias de que el sistema inmunológico innato puede conducir a fenómenos de autoinmunidad al promover una respuesta inmunológica excesiva, o mediante un

aclaramiento defectuoso de las células apoptóticas. Diversos estudios han asociado las variantes del gen MBL2 con: a) bajos niveles séricos de MBL (principalmente haplotipos A/O y O/O) ^(38,39), b) susceptibilidad y gravedad de enfermedades infecciosas ⁽³⁶⁾ c) aterosclerosis grave y placa de ateroma en las arterias carótidas (p=0.009) ^(13,36), d) susceptibilidad de enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjogren, artritis reumatoide, vasculitis, entre otros ^(35,40) y, e) abortos espontáneos recurrentes.

Las manifestaciones clínicas secundarias a la deficiencia de MBL han sido estudiadas de forma extensa, mientras que el papel del polimorfismo del exón 1 del gen MBL2 sobre el desarrollo de aterosclerosis temprana en población general y en pacientes con enfermedades inflamatorias y autoinmunes, es un tema en estudio. ^(33,35)

Respecto a la asociación con enfermedades autoinmunes, un meta análisis demostró que la presencia de variantes alélicas del gen MBL2 confiere un riesgo (OR) de 1.6 (IC 95%, 1.221-1.608; p< 0.001) para el desarrollo de LES ⁽⁴²⁾. Por otra parte, un estudio prospectivo con seguimiento de 9 años, demostró que los pacientes con LES y variantes alélicas homocigotos (O/O) de MBL se asociaron con incremento en la prevalencia de placa aterosclerosa carotídea y de riesgo de trombosis arterial, principalmente cardiovascular (razón de riesgo 7.0 (IC 95%, 1.9-25.4; p= 0.003) ⁽⁴³⁾ y cerebro vascular con importantes diferencias con relación a la etnia de las poblaciones estudiadas ⁽⁴⁴⁾ Font J y cols., encontraron una mayor prevalencia de enfermedad cardiovascular, en pacientes con LES que presentan genotipos deficientes de MBL (OR 4.54, IC 95% (1.20-16.46), como hallazgo interesante, observaron que los pacientes con genotipos deficientes de MBL presentaron una alta prevalencia de enfermedad trombotica venosa (OR 6.04, IC95% 1.15-32.91) así como, una mayor proporción de placa ateromatosa carotídea y síndrome de anticuerpos antifosfolípido asociado (64% vs 11%, p=<0.001) ⁽¹⁴⁾

Hasta el momento, las líneas de investigación han explorado la prevalencia y asociación de polimorfismos del exón 1 del gen MBL2 (variantes alélicas deficientes) y aterosclerosis temprana en pacientes LES, una población con

características particulares, tales como: incremento en la susceptibilidad de alteraciones en los lípidos, procesos infecciosos, vasculitis, daño orgánico crónico, hipocomplementemia y uso prolongado de esteroides, los cuales por sí solos, pueden contribuir al desarrollo de AT temprana, considerándose como potenciales confusoras, aspecto que ha limitado definir el riesgo que confiere un factor genético para el desarrollo de aterosclerosis.

Estudios clínicos recientes, han sugerido una asociación entre la deficiencia de MBL, aterosclerosis coronaria y presencia de anticuerpos antifosfolípido, al observarse un incremento en el riesgo de oclusión de puente coronario y trombosis arterial en pacientes con LES, quienes presentaban variantes alélicas de MBL y anticuerpos anticardiolipina de isotipo IgG e IgM (SAAF secundario); el sustento teórico para esta relación, se basa en dos aspectos: 1) evidencia reconocida de unión entre MBL y fosfolípidos y, 2) la deficiencia de MBL ocasiona una reducción en la capacidad de eliminación de material apoptótico, el cual constituye un autoantígeno permanente contra el que se producen autoanticuerpos. (23, 43,45-47)

El síndrome de anticuerpos antifosfolípido (SAAF) constituye una enfermedad sistémica autoinmune, de etiología desconocida, que se presenta habitualmente entre la tercera y cuarta década de la vida. Se caracteriza por la combinación de trombosis (arterial y venosa), abortos recurrentes, títulos elevados de anticuerpos antifosfolípido circulantes (anti- β 2GP1, anticuerpos anticardiolipina (aCL), anticoagulante lúpico) y trombocitopenia. La trombosis, es el proceso patológico más crítico, que produce la mayoría de las manifestaciones clínicas en diversos órganos y sistemas (corazón, cerebro, pulmón, riñón, placenta, sistema endocrino, coagulación, entre otros) lo que limita la sobrevida de estos pacientes. El tratamiento de elección en esta enfermedad es el empleo de anticoagulantes orales de forma crónica y en la mayoría de los casos indefinida. El SAAF se denomina primario cuando no existe evidencia de otra enfermedad reumática subyacente, mientras que la denominación de SAAF secundario, hace referencia a la asociación de SAAF con otra enfermedad reumática, ejemplo SAAF y LES. El diagnóstico correcto de SAAF en un paciente implica la presencia de al menos 1

criterio clínico y 1 criterio de laboratorio de los Criterios de Clasificación de Sapporo, así como la exclusión de resistencia a la proteína C activada, deficiencia de antitrombina, proteína C, S y protrombina, incremento de los niveles de factor VIII, trastornos mieloproliferativos y disfibrinogenemia. ⁽⁴⁸⁻⁵⁵⁾

Los pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípido primario (SAAFP) tienen un incremento en la incidencia de eventos cardiovasculares, así como en la prevalencia de aterosclerosis temprana evaluada mediante estudios de imagen no invasivos ⁽⁵⁶⁻⁵⁹⁾. El impacto clínico de la trombosis en pacientes con enfermedad autoinmune, ha conducido al desarrollo de métodos que permitan la detección y evaluación temprana de aterosclerosis, mediante la medición del engrosamiento de la íntima-media de la arteria carótida e identificación de placas de ateroma vulnerables a través de estudios de imagen. ⁽⁶⁰⁻⁶¹⁾

Los métodos para evaluar AT, idealmente deben ser seguros, no invasivos, sensibles, específicos y reproducibles ⁽⁶²⁾, al respecto el ultrasonido modo B de alta resolución, es un método de imagen no invasivo, estandarizado y altamente disponible, que permite evaluar la presencia, progresión y gravedad de la AT, mediante la detección del engrosamiento de la íntima-media de la arteria carótida, medición de la extensión de placas de ateroma y reducción de la luz arterial (sensibilidad 91.3%, especificidad 92.7%). La reproducibilidad de la medición del engrosamiento de la íntima-media, ha sido reportada como buena, con una variabilidad intraobservador menor de 5% e interobservador menor 10% ^(63,64). Diversos estudios clínicos han demostrado que el ultrasonido modo B es una herramienta útil para evaluar los cambios del engrosamiento íntima y media de la arteria a través del tiempo, al respecto, una serie de estudios epidemiológicos prospectivos, demuestran que el engrosamiento de la íntima-media es predictor de riesgo independiente de infarto del miocardio y enfermedad vascular cerebral ⁽⁶⁷⁻⁷⁰⁾

Ante la variabilidad de las regiones anatómicas vasculares exploradas y los puntos de cortes para definir engrosamiento y presencia de placa, se han desarrollado consensos para estandarizar donde realizar la medición, con que instrumento, como y que desenlaces investigar ⁽⁶⁵⁾ Recientemente el engrosamiento de la

íntima y media de la arteria carótida, es aceptada por la American Heart Association, como un factor de riesgo cardiovascular. Este engrosamiento puede constituir un marcador sensible para etapas tempranas de aterosclerosis y representa un marcador de aterosclerosis generalizada ⁽⁶⁶⁾

Justificación

La aterosclerosis (AT) y sus consecuencias clínicas, constituyen un grave problema de salud pública a nivel mundial. En México, la aterosclerosis representa la primera causa de muerte, su incidencia e impacto negativo en salud, incrementa debido a la concurrencia de factores de riesgo cardiovascular tradicionales y no tradicionales. Estudios recientes, proporcionan evidencia sobre la participación de factores genéticos, inflamatorios e inmunes en la génesis de la AT, enfermedad cardiovascular y enfermedades autoinmunes.

El presente estudio tiene como propósito investigar la probable asociación de un factor genético (polimorfismo del exón 1 del gen MBL2) con la presencia de aterosclerosis temprana en pacientes mexicanos no relacionados con SAAFP, una enfermedad autoinmune, sistémica y protrombótica por excelencia. Esta enfermedad autoinmune afecta de forma predominante a población joven, económicamente activa y en la que los desenlaces de la aterosclerosis, principalmente trombóticos, limitan su sobrevida y calidad de vida.

Aunado a lo anterior, consideramos que el presente estudio de investigación, ofrece la oportunidad de definir en una segunda instancia, una cohorte de pacientes con características particulares que permita evaluar a través de un seguimiento a largo plazo sí los pacientes con SAAFP que presentan el polimorfismo del exón 1 del gen MBL2 presentan mayor engrosamiento e incluso un mayor número de eventos de trombosis, permitiendo con ello el desarrollo de líneas de investigación acerca de la relación que existiría entre una intervención (administración de MBL) obtenidos de derivados del plasma o como material recombinante por ingeniería genética y la probable reducción de eventos de trombosis arterial, placa de ateroma y actividad de la enfermedad, en pacientes

con enfermedad reumática y genotipos deficientes de MBL, lo cual podría modificar la evolución clínica y desenlace de estos pacientes.

Pregunta de Investigación

En pacientes con enfermedades autoinmunes, los factores de riesgo cardiovascular tradicionales de Framingham, no explican de manera convincente el desarrollo de AT temprana ⁽⁷¹⁾. Se ha descrito un incremento en la prevalencia de aterosclerosis temprana, enfermedad cardiovascular y trombosis, en pacientes con enfermedad autoinmune, principalmente lupus eritematoso sistémico, que tienen anticuerpos antifosfolípido circulantes, en quienes se identifica la presencia de polimorfismos del exón 1 del gen MBL2, sugiriendo un papel proaterogénico del factor genético para el desarrollo de enfermedad cardiovascular y aterosclerosis

Hasta el momento, no se tiene suficiente evidencia sobre la existencia ni la magnitud de la asociación entre el polimorfismo del exón 1 del gen MBL2 y aterosclerosis temprana en pacientes con SAAFP, una población con alta prevalencia de aterosclerosis, trombosis arterial/venosa y que se caracteriza por la presencia de anticuerpos antifosfolípido circulantes, Con base en lo anterior, el grupo de investigación se plantean las siguientes preguntas de investigación:

¿Cuál es la frecuencia alélica y genotípica del polimorfismo del exón 1 del gen MBL2 en pacientes mexicanos no relacionados con síndrome de anticuerpos antifosfolípido primario (SAAFP) y en sujetos sanos?

¿Cuál es la magnitud de la asociación del polimorfismo del exón 1 del gen MBL2 y aterosclerosis temprana en pacientes mexicanos no relacionados con SAAFP?

Objetivos

Establecer las frecuencias alélicas y genotípicas de las variantes del exón 1 del gen MBL2 en pacientes mexicanos no relacionados con síndrome de anticuerpos antifosfolípido primario y sujetos sanos.

Determinar la magnitud de la asociación entre el polimorfismo del exón 1 del gen MBL2 y aterosclerosis temprana en pacientes mexicanos no relacionados con SAAFP.

Hipótesis

Las frecuencias alélicas y genotípicas del exón 1 del gen MBL2 es diferente entre los pacientes mexicanos no relacionados con SAAFP y los controles sanos.

Existirá al menos 2 veces más posibilidad de tener aterosclerosis temprana en pacientes mexicanos con SAAFP que presentan el polimorfismo del exón 1 del gen MBL2 en comparación con aquellos pacientes con SAAFP sin la presencia del polimorfismo (genotipo normal)

Metodología

Lugar del estudio

UMAE Hospital de Especialidades “Dr. Antonio Fraga Mouret” Centro Médico Nacional “La Raza”

Caso

Pacientes mexicanos no relacionados con SAAFP que reciben atención médica en la UMAE Centro Médico Nacional “La Raza” Departamento de Reumatología y Medicina Interna.

Población sana (testigo)

Para el propósito del estudio de frecuencias alélicas y genotípicas se denominará control sano a aquel individuo mexicano no relacionado que no tiene diagnóstico de SAAFP. Los controles sanos serán pareados por edad y sexo y serán seleccionados cuando acudan a donación sanguínea en Banco de Sangre, la muestra sanguínea se tomará cuando el control sano acepte participar en el estudio y previa firma de la carta de consentimiento informado.

Criterios de selección de la población de estudio (Diseño transversal)

Criterios de Inclusión de caso

- a) Diagnóstico de SAAFP según criterios de Sapporo (anexo 1)
- b) Adscritos a Departamento de Reumatología y/o Medicina Interna de la UMAE CMN “La Raza”
- c) Género femenino o masculino
- d) Mayores de 16 años
- e) Que acepten participar en el estudio y firmen consentimiento informado

Tamaño de la muestra

Es importante señalar que no existen estudios previos que proporcionen información sobre la prevalencia del polimorfismos del exón 1 del gen MBL2 en pacientes con SAAFP, por lo que con base en analogía con otra enfermedad reumática, autoinmune y sistémica, en la que se presentan eventos de trombosis y aterosclerosis temprana, se realizaron una serie de cálculos de tamaño de muestra, con relación a la prevalencia de polimorfismo de las variantes alélicas “O” (variantes B, C y D), descritos por Garred P y Font J ^(14,47) Empleando una fórmula para estudios cuyo objetivo es la estimación de una proporción:

Parámetros:

$$p_1 = .39$$

$$p_2 = .12$$

$$\delta = 0.27$$

Nivel de confianza = 95%

valor de alfa= 0.05

poder= 80% (beta .20)

Como resultado de los cálculos realizados, se requieren 39 pacientes por grupo para hipótesis de una cola o 47 pacientes por grupo para hipótesis de dos colas.

Criterios de selección de la población de estudio (Diseño casos y controles)

Definición de Caso

Paciente con SAAFP con engrosamiento de la íntima y media de arteria carótida.

Definición de Control

Paciente con SAAFP sin engrosamiento de la íntima y media de arteria carótida.

Criterios de selección

Criterios de Inclusión Casos

- a) Diagnóstico de SAAF primario según criterios de Sapporo (anexo 1)
- b) Adscritos a Departamento de Reumatología y/o Medicina Interna de la UMAE CMN “La Raza”
- c) Sexo femenino no menopaúsicas o masculino
- d) Edad 16 a 60 años
- e) Presencia de engrosamiento de la íntima y media de arteria carótida.
- f) Con período < 15 años de tiempo de evolución de la enfermedad
- g) Que acepten participar en el estudio y firmen consentimiento informado

Criterios de Inclusión Grupo control

- a) Pacientes con SAAF primario según criterios de Sapporo (anexo 1)
- b) Adscritos a Departamento de Reumatología y/o Medicina Interna de la UMAE CMN “La Raza”
- c) Sexo femenino no menopaúsicas o masculino
- d) Edad 18 a 60 años
- e) Ausencia de engrosamiento de la íntima y media de arteria carótida
- f) Con período < 15 años de tiempo de evolución de la enfermedad
- g) Que acepten participar en el estudio y firmen consentimiento informado

Criterios de no-inclusión Casos y Grupo testigo

Antecedente o presencia de neoplasia, infección reciente aguda y embarazo

Criterios de Eliminación Casos y Grupo testigo

- a) Aquellos que no deseen continuar en el estudio
- b) Que desarrollen Lupus eritematoso sistémico durante el estudio
- c) Que se embaracen durante el estudio

Tipo de Muestreo

No probabilístico: Casos prevalentes

Definición de Variables

Dependiente

1. Aterosclerosis temprana

Definición conceptual: Distancia en milímetros entre la interfase de la íntima-luz arterial y la interfase de la media-adventicia, medida en la pared posterior de la arteria carótida común mayor de .9 mm

Definición operacional: Presencia de engrosamiento de la íntima-media de la arteria carótida común > .9 mm identificado por ultrasonido doppler carotídeo

Tipo de variable y escala de medición: cualitativa, nominal dicotómica (sí/no)

Independiente

1. Polimorfismo del exón 1 del gen MBL2

Definición conceptual: Variación en la secuencia del DNA que ocurre en el exón 1 del gen MBL2.

Definición operacional: Presencia del polimorfismo del exón 1 (variante B)

Tipo de variable y escala de medición: cualitativa, nominal, dicotómica.

Variables Potencialmente Confusoras

Sobrepeso, obesidad, dislipidemia, hiperuricemia, hiperhomocisteinemia, empleo de estatinas, tabaquismo y tiempo de evolución de la enfermedad.

1. Sobrepeso

Definición conceptual: Aumento del tamaño del cuerpo con aumento de la masa corporal magra y sin acumulación excesiva de grasa corporal.

Definición operacional: Definida de acuerdo con el índice de masa corporal (IMC) obtenido de la división del peso en kilogramos, entre la talla en metros al cuadrado; considerando sobrepeso cuando el IMC se encuentra entre 25 y 30.

Tipo de variable y escala de medición: cualitativa, nominal dicotómica (sí/no).

2. Obesidad

Definición conceptual: Aumento del peso corporal debido a la acumulación de grasa, 10 a 20% por encima del límite normal para una edad, sexo y altura en particular.

Definición operacional: Definida de acuerdo con el índice de masa corporal (IMC) obtenido de la división del peso en kilogramos, entre la talla en metros al cuadrado; considerando obesidad cuando el IMC es ≥ 30 .

Tipo de variable y escala de medición: cualitativa, nominal dicotómica /sí/no).

Tipo de variable y escala de medición: cuantitativa, continua.

3. Dislipidemia

Definición conceptual: Trastorno del metabolismo lipídico plasmático.

Definición operacional: elevación de colesterol sérico total mayor de 200 mg/dl o de triglicéridos mayor de 140 mg/dl, lipoproteína de baja densidad (LDL) mayor de 140 mg/dl o lipoproteínas de alta densidad (HDL) menor de 45 mg/dl en hombres y 40 mg/dl en mujeres

Tipo de variable y escala de medición: cualitativa, nominal dicotómica (sí/no).

4. Hiperuricemia.

Definición conceptual: Trastorno metabólico primario o secundario del metabolismo de las purinas.

Definición operacional: Elevación sérica de ácido úrica mayor de 7 mg/dL en el varón y mayor de 6.5 mg/dL para la mujer.

Tipo de variable y escala de medición: cualitativa, nominal dicotómica (sí/no).

5. Hiperhomocistinemia

Definición conceptual: trastorno metabólico consistente en la elevación en sangre de la concentración de homocisteína, un aminoácido capaz de producir daño endotelial, así como favorecer un incremento de la actividad de determinados factores procoagulantes y protrombóticos (agregación de plaquetas, factores de coagulación) y de reducir la actividad de factores anticoagulantes o antitrombóticos naturales.

Definición operacional: Elevación en suero o plasma mayor de 15M/L

Tipo de variable y escala de medición: cualitativa nominal dicotómica (sí/no)

6. Tiempo de evolución de la enfermedad

Definición conceptual: Período de tiempo transcurrido a partir que se establece el diagnóstico de SAAFP con base en los Criterios de Clasificación de Sapporo

Definición operacional: Años de diagnóstico de la enfermedad

Tipo de variable y escala de medición: cualitativa, ordinal

Descripción del estudio

El estudio se realizará en el Departamento de Reumatología de la UMAE C.M.N “La Raza”, el cual constituye un centro de referencia nacional de pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípido primario. En una primera fase del estudio (transversal) se investigará la frecuencia del polimorfismo del exón 1 del gen MBL2, en una población 53 pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípido primario (casos) y 113 sujetos sanos (testigo), los cuales serán pareados por edad y género, reclutados en la unidad hospitalaria y Banco de sangre respectivamente, a quienes se les explicara el estudio y posterior a la resolución de sus dudas y firma de consentimiento informado se les tomará la muestra de sangre.

El propósito de esta primera fase es demostrar que la frecuencia del polimorfismo en estudio será significativamente mayor en los pacientes con enfermedad autoinmune. Para este propósito se clasificará a la población de estudio de acuerdo a la variante B (codón 54), variante C (codón 57) y la variante D (codón 52) como se muestra en la siguiente tabla 2:

Tabla 2. Variantes alélicas del exón 1 del gen MBL2.

Variantes	Homocigotos (wildtype)	Homocigotos (mutantes)	Heterocigotos (wt + mutante)
	A/A	O/O	A/O
Codon 52	A/A	D/D	A/D
Codon 54	A/A	B/B	A/B
Codon 57	A/A	C/C	A/C

En la fase analítica del estudio (casos y controles), se pretende investigar la existencia y la magnitud de la asociación entre aterosclerosis temprana (subrogado de aterosclerosis generalizada) y el polimorfismo del exón 1 del gen MBL2 en un grupo de casos (SAAFP con engrosamiento íntima-media) y en el grupo control (SAAFP sin engrosamiento íntima-media). La evaluación del engrosamiento íntima-media de la arteria carótida (aterosclerosis temprana) se realizará mediante ultrasonido doppler carotídeo de alta resolución.

Estrategias para control de sesgos

Limitación de sesgo de mala clasificación: para el diagnóstico de SAAF primario se emplearán los Criterios de Sapporo ⁽⁵³⁾ reconocidos como los criterios con mayor sensibilidad y especificidad empleados a nivel internacional. Se reclutará una población homogénea, respecto al tiempo de evolución de la enfermedad (tiempo de evolución promedio de la enfermedad < 15 años)

La procedencia del grupo de casos y del grupo testigo será de la misma base hospitalaria. Se registrarán factores demográficos, inmunológicos y de riesgo cardiovascular tradicional: edad, sexo, índice de masa corporal, nivel sérico de ácido úrico, homocisteína, colesterol total, LDL, HDL y triglicéridos, así como información relacionada a fecha de diagnóstico de la enfermedad, fecha de primer evento de trombosis y sitio anatómico del primer evento de trombosis (arterial o venoso) por un médico reumatólogo (anexo 1). Para evaluar las variables de interés e investigar una probable asociación se requerirá de estudios de imagen no invasivos (anexo 2) y técnicas de biología molecular

Se tomará una muestra de sangre venosa a la población de estudio y se almacenará para realizar los estudios de biología molecular. En el momento de la toma de muestra sanguínea, tanto los pacientes como el médico Reumatólogo encargado de la recolección de los datos demográficos y revisión de expedientes clínicos, desconocerán la condición de caso o control, limitando la posibilidad de sesgo de recuerdo, del entrevistador y de vigilancia. La evaluación de los estudios bioquímicos e inmunológicos será realizada por un Químico cegado a la condición de caso y/o control. Se determinará en un solo momento el nivel de colesterol total, HDL, LDL, triglicéridos, ácido úrico y homocisteína en los casos y controles. Dentro de los métodos para controlar confusión se empleará la restricción con relación al antecedente de diabetes mellitus, hipertensión arterial sistémica y tabaquismo (factores de riesgo tradicional) debido a que en nuestra población con SAAFP solo hay un paciente con diabetes mellitus y dos con hipertensión arterial sistémica.

Estudio ultrasonográfico vascular

Con relación a la variable de desenlace o efecto en la población de pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípido primario, se realizará ultrasonido doppler modo B para investigar el engrosamiento de la íntima-media de la arteria carótida expresada en milímetros y presencia de placa de ateroma (Anexo 3) Las arterias carótidas serán evaluadas en los pacientes del grupo de estudio y grupo control con ultrasonografía de alta resolución modo B (SIEMENS SONOLINE ELEGRA) usando un transductor de 7-10 MHz en múltiples proyecciones para optimizar la detección del engrosamiento íntima y media de la arteria carótida común así como la presencia de placas de ateroma. El rastreo ultrasonográfico será efectuado con el sujeto en posición decúbito supina, de acuerdo al siguiente orden: arteria carótida común (ACC), bulbo y arteria carótida interna (ACI) de forma bilateral. La exploración vascular carotídea se realizará en proyecciones longitudinal (anterior, lateral, posterior) y transversal. El examen ultrasonográfico será realizado por un radiólogo experto cegado a las características clínicas del grupo de estudio. La variabilidad intraobservador se determinará al repetir en 2 ocasiones las

mediciones del engrosamiento íntima-media en la mitad de la población de estudio, elegidos de forma aleatoria, con un tiempo de diferencia entre la primera y segunda inferior a 6 meses, debido a que posterior a este período se puede observar un cambio real en el engrosamiento de la íntima-media. El engrosamiento íntima-media (EIM), se definirá como la distancia entre la interfase de la íntima-luz arterial y la interfase de la media-adventicia, medida en la pared posterior de la arteria carótida común $> .9$ mm. En aquellos pacientes en los que se identifique la presencia de placa de ateroma (definida como aquella área distintiva asociada a mineralización (incremento de la ecogenicidad) o con protrusión focal hacia la luz arterial) se registrará la extensión (longitud cefalocaudal del vaso que está afectada por la placa) y severidad (grosor de la placa) empleando para éste último un eje transversal, así como la consecuente disminución del diámetro de la luz (DDL), Si no se detecta ninguna de estas lesiones el sujeto será considerado como normal. La disminución del diámetro de la luz mayor de 50% será considerada como anormal.

Procedimiento de Laboratorio

Para el desarrollo de este proyecto se requerirá de técnicas de extracción de DNA, amplificación y replicación por PCR-RFLP. La unidad de análisis será el exón 1 del gen MBL2, en el que se investigará la presencia de 3 variantes alélicas con sustitución de un solo nucleótido (polimorfismos de un solo nucleótido), específicamente del codón 54 (variante B), codón 57 (variante C) y codón 52 (variante D), denominadas en forma general como variantes O, las cuales se asocian con bajos niveles séricos de MBL.

Muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron colectadas de pacientes y controles de acuerdo a los criterios de inclusión mencionados previamente. El estudio fue aprobado por el comité local del Hospital de Especialidades Dr. Antonio Fraga Mouret, CMN "La Raza", IMSS.

Extracción de DNA genómico

Se utilizó DNA genómico obtenido de leucocitos a partir de 10 ml. de sangre total anticoagulada con ácido etilendiamino tetra acético (EDTA) obtenida de la sangre venosa periférica de los pacientes, utilizando DNA Isolation Kit (ROCHE®, 11 667 327 001), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la muestra de sangre periférica se centrifugó (Beckman Coulter, Allegra X22R) a 2500 rpm durante 15 minutos, se separó el plasma. La placa leucoplaquetaria fue colocada en un tubo de centrifugación y fue tratada con amortiguador de lisis de eritrocitos durante 10 minutos a 65°C, se resuspendió por inversión. Se centrifugó a 2500 rpm, durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante. El botón fue re suspendido por inversión con 5 mL de amortiguador de lisis de células blancas. Se le adicionó 2.6 mL de solución de precipitación de proteína. Se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue colocado en un tubo de centrifugación, se descartó el botón. Se adicionaron 10 mL de etanol absoluto grado biología molecular, se mezcló por inversión. Se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante. Se adicionaron 3 mL de etanol al 70%. Se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante. Se resuspendió en 100 uL de agua grado biología molecular y fueron almacenadas a -80°C hasta su uso. La cuantificación del DNA obtenido se realizó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000C, ThermoScientific.

PCR-RFLP

La genotipificación del exón 1 y las mutaciones en la región del promotor del gen MBL-2 fueron realizadas de acuerdo a Tin S.K., et al. ⁽⁷²⁾ Brevemente, a partir de 50 ng de DNA genómico, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un termociclador Select Bioproducts. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C, durante 10 s, alineamiento a 62° C durante 30 s y extensión de 72°C durante 30 s. La extensión final se realizó a 72°C durante 10 minutos. 0.2 uM de cada par de oligos sentido y antisentido (Tabla 3), 10.0 ul de mezcla de HotStartTaq, (QIAGEN), 2.0 ul de dNTP (10 mM), 0.5 ul de DNA HotStarTaq DNA, 25 mM d MgCl₂, ajustado con agua grado biología molecular a

un volumen final de 25 uL. 4 ul de los productos de PCR del exón MBL, fueron incubados a 37°C con las enzimas MbolI, (0.1 unidades), Ban I (0.3 unidades). Por otro lado, 4 ul de los productos de PCR de la región del promotor fueron incubados con Drd I (0.3 unidades) y Btg (0.5 unidades), toda la noche a 37°C. Los productos fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida usando tinción de plata, las imágenes de los geles fueron capturadas utilizando el equipo Chemidoc XRS, Biorad, y analizadas utilizando el Software Image Lab, Software, Biorad.

Tabla 3. Oligos utilizados en el ensayo de genotipificación PCR-RFLP. Número de acceso en GenBank de MBL2: X15422.

Nombre del oligo	Oligo sentido	Oligo antisentido	Tamaño del fragmento (pb)
MBL-PRO	5'-GAA ATG CTT ACC CAG GCA AGC CTG T -3'	5'-TCA TCT GTG CCT AGA CAC CTG GC -3'	410
MBL-E1	5'-CAT CAA CGG CTT CCC AGG GCA AGA TGG G -3'	5'- GTC TCC TCA TAT CCC CAG GC -3'	134

Para el promotor del gen MBL2 se identificaron los sitios de reconocimiento sobre la secuencia del amplicón de 410 pb (Figura 6), en color amarillo se identifican los oligos Forward y Reverse. En color rojo los sitios de corte para las enzimas y en los recuadros las secuencias de corte teóricas

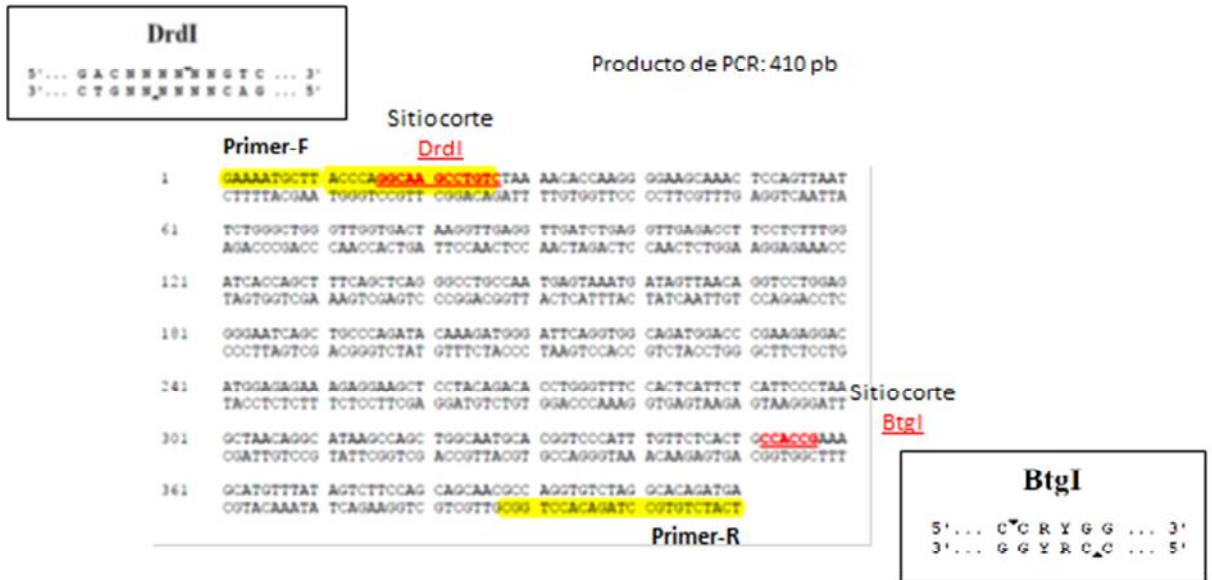


Figura 6. Análisis de la secuencia del promotor y sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas en el estudio.

A continuación se presenta el análisis “in silico” y la imagen de un gel obtenido en el estudio, que muestra los productos a visualizar en los geles de acrilamida revelados con tinción de plata, de acuerdo a la tabla 4.

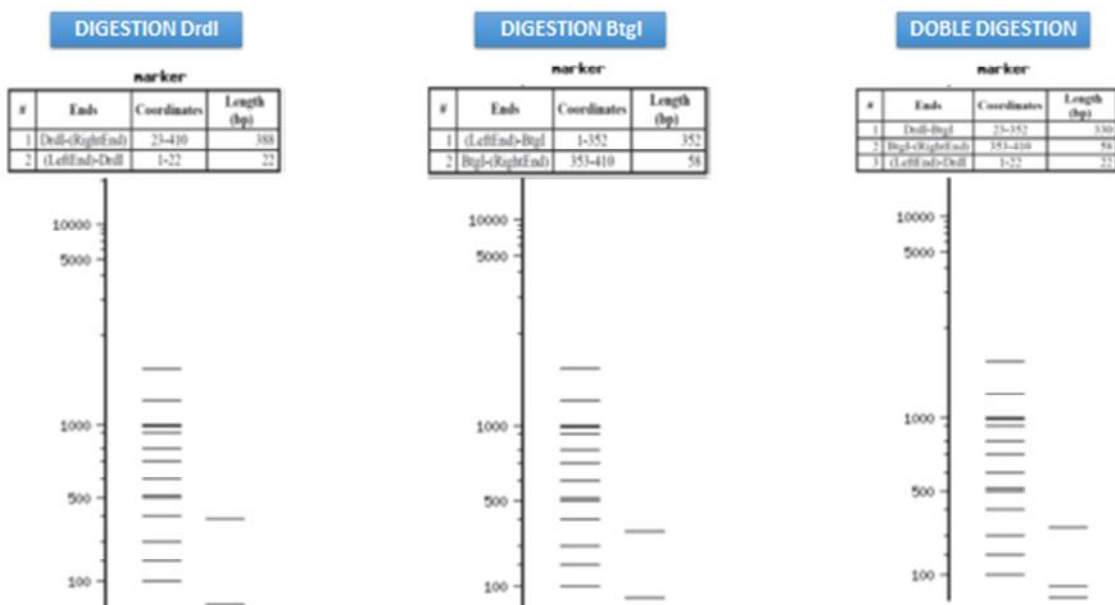


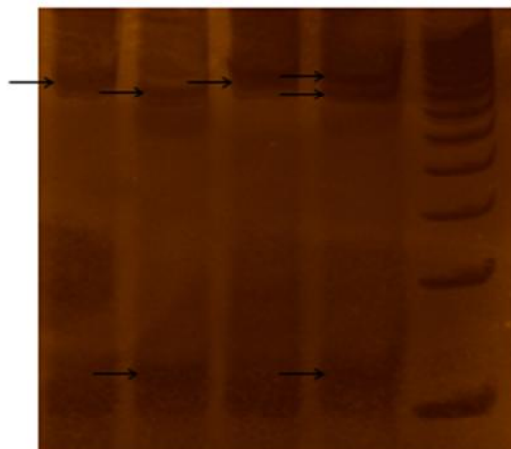
Tabla 4. Productos esperados de los sitios de reconocimiento después de la digestión con las enzimas de restricción en el promotor del gen MBL2

HAPLOTIPO	PRODUCTOS DE RESTRICCIÓN (DNA PCR)
HH_XX	410 pb
HH_XY	410 pb, 352 pb, 58 pb
HH_YY	352 pb, 58 pb
HL_XX	410 pb, 388 pb, 22 pb
HL_XY	410 pb, 330 pb, 58 pb, 22 pb
HL_YY	352 pb, 330 pb, 58 pb, 22 pb
LL_XX	388 pb, 22 pb
LL_XY	388 pb, 330 pb, 58 pb, 22 pb
LL_YY	330 pb, 58 pb

Genotipo	Mutación promotor	
	-550	-221
Silvestre	HH	XX
Heterocigoto	HL	XY
Mutante	LL	YY

Asociación del polimorfismo del exón 1 del gen MBL2 y aterosclerosis temprana en pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípido primario.

Revelado con nitrato de plata					
Carril	1	2	3	4	5
Sitios polimórficos	Producto del promotor sin cortar	HH_YY	Producto del promotor 1 sin cortar	HH_XY	PM 50 pb (PROMEGA)
Fragmentos observados (pb)	410	352, 58	410	410, 352,58	



Para la determinación del exón se muestran en la tabla 5 la identificación de los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción en el amplicón de MBL2.

Tabla 5. Análisis de los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción en los codones 52, 54 y 57 de la proteína MBL2

Exón Gen MBL2	1 Polimorfismo	Sustitución de:	Posición del nucleótido en el exón 1	Enzima	Secuencia de reconocimiento
Variante B	Codón (rs1800450)	54 G por A	230	Ban I	G GYRCC CCRYG G
Variante C	Codón (rs1800451)	57 G por A	239	Mbo II	GATC CTAG
Variante D	Codón (rs5030737)	52 C por T	223	Mwo I	GCNNNNN NNG C CGNN NNNNNC G

En la tabla 6 y 7 se presentan los alelos, genotipos, variantes y mutaciones por codones a determinar en el presente estudio, así como los productos esperados de los sitios de reconocimiento después de la digestión con las enzimas de restricción en los exones 52, 54 y 57 del gen MBL2.

Tabla 6. Alelos, genotipos, variantes y mutaciones del exón 1

SNP Codón 52	ALELOS	GENOTIPOS	VARIANTE	MUTACIÓN (a.a)
rs3030737	SILVESTRE (C)	CC	AA	SILVESTRE arginina
		CT	AD	
	MUTANTE (T)	TT	DD	MUTANTE cisteína

SNP Codón 54	ALELOS	GENOTIPOS	VARIANTE	MUTACIÓN (a.a)
rs1800430	SILVESTRE (G)	GG	AA	SILVESTRE glicina
		GA	AB	
	MUTANTE (A)	AA	BB	MUTANTE A. aspártico

SNP Codón 57	ALELOS	GENOTIPOS	VARIANTE	MUTACIÓN (a.a)
rs1800431	SILVESTRE (G)	GG	AA	SILVESTRE glicina
		GA	AC	
	MUTANTE (A)	AA	CC	MUTANTE A. glutámico

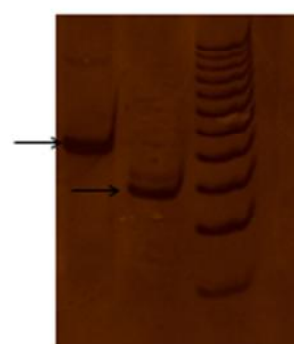
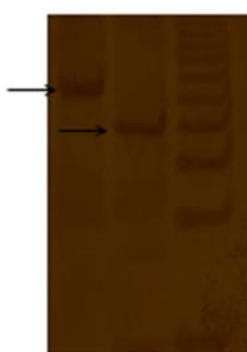
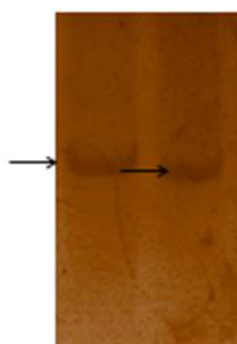
Tabla 7. Productos esperados de los sitios de reconocimiento después de la digestión con las enzimas de restricción en los exones 52, 54 y 57 del gen MBL2

Codón	Sitios polimórficos	PRODUCTOS DE RESTRICCIÓN (DNA PCR, pb)
52	AA	109
	AD	134, 104
	DD	134
54	AA	95
	AB	134, 95
	BB	134
57	AA	134
	AC	134, 78
	CC	78

Carril	Revelado con nitrato de plata	
	1	2
Sitios polimórficos	Producto del exón 52 sin cortar	Corte exón 52
Fragmentos observados (pb)	134	109
Interpretación		AA

Carril	Revelado con nitrato de plata		
	1	2	3
Sitios polimórficos	Producto del exón 54 sin cortar	Corte exón 54	
Fragmentos observados (pb)	134	95	95 134 22 pb (PROBES)
Interpretación		BB	

Carril	Revelado con nitrato de plata		
	1	2	3
Sitios polimórficos	Producto del exón 57 sin cortar	Corte exón 57	
Fragmentos observados (pb)	134	78	78 134 22 pb (PROBES)
Interpretación		CC	



Análisis estadístico

Las variables categóricas se describieron mediante su distribución de frecuencias. Las variables continuas se describieron mediante medidas de tendencia central (media, mediana) y de dispersión (desviación estándar). Para probar la hipótesis nula para la distribución de las variables categóricas entre los pacientes y los controles, así como las frecuencias alélicas y genotípicas de los genes a estudio para dos grupos, se empleó la prueba de Chi-cuadrado con corrección de Yates, o la prueba exacta de Fisher cuando fue necesario. El riesgo de enfermedad asociado con los genotipos del gen MBL2 como factor genético y la fuerza de la asociación de los genotipos con la frecuencia de las características clínicas se estimó usando el cálculo de los odds ratio (OR) con un intervalo de confianza (IC) del 95%. El equilibrio de Hardy-Weinberg para las frecuencias genotípicas se probó mediante el análisis de la Chi-cuadrado. Se empleó el estadístico de Kolmogorov-Smirnov para analizar si las variables continuas seguían o no una distribución normal. La comparación de variables continuas que seguían una distribución normal se realizó mediante pruebas paramétricas: la prueba de t de Student para dos muestras independientes, o el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) para la comparación de más de dos categorías. La comparación de variables continuas que no seguían una distribución normal se realizó mediante pruebas no paramétricas: la prueba de Mann-Whitney para dos muestras independientes, o la prueba de Kruskal-Wallis para más de dos categorías. La correlación entre dos variables que no seguían una distribución normal se estimó mediante el coeficiente el coeficiente Rho de Spearman. Para el análisis multivariado, en los casos en que la variable dependiente era cualitativa, con dos categorías, se realizó un análisis de regresión logística binario. Todas las pruebas empleadas fueron de dos colas. La significancia estadística se tomó como un valor de $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó empleando el paquete estadístico SPSS (versión 19.0 para Windows).

Resultados

Prevalencia de los genotipos

De los 53 pacientes con SAAFP incluidos en el estudio, 45 (84.9%) fueron mujeres y 8 (15.1%) fueron hombres, con un promedio de edad de 45.91 ± 12.43 . No hubo diferencia estadísticamente significativa entre la edad y el género en la población de estudio (53 casos y 113 controles). El porcentaje de distribución de las variantes alélicas B (codón 54), variante C (codón 57), variante D (codón 52) y de la región promotora de la población de estudio se muestra en la Cuadro 1. Se observó una mayor prevalencia del genotipo heterocigoto AB de la variante B (codón 54) en los pacientes con SAAFP en comparación al grupo control, 15.1% versus 0.9% ($p < 0.001$, OR 17.05, IC 95% 2.1 – 132.9), así como una mayor prevalencia de la variante LX/LY de la región promotora 22.6% versus 8.8% ($p = 0.006$, OR 2.77 (IC 95% 1.3 – 5.9) y de la variante LX/AA 18.9% versus 7.1%, $p = 0.02$, OR 2.6 (IC 95% 1.1 – 6.3). En el resto de las variantes alélicas no se observó diferencias estadísticamente significativas.

Cuadro 1. Características demográficas y frecuencias genotípicas de la población de estudio

	Casos n = 53	Controles n = 113	p	OR IC 95%
Edad	45.91 \pm 12.43	43.08 \pm 9.81	0.18	
Género				
Femenino n (%)	45 (84.9)	93 (82.3)	0.67	0.85 (0.40 – 1.80)
Masculino n (%)	8 (15.1)	20 (17.7)		
Exón 1				
Codón C54 n (%)				
AA	45 (84.9)	112 (99.1)	0.005	0.84 (0.73 – 0.97)
AB	8 (15.1)	1 (0.9)	< 0.001 *	17.05 (2.1 – 132.9)
BB	0	0	-	-
Codón C52 n (%)				
AA	47 (88.7)	110 (97.3)	0.20	0.91 (0.82 - 1.00)
AD	4 (7.5)	3 (2.7)	0.21	2.95 (0.68 – 12.7)
DD	2 (3.8)	0 (0)	0.10	0.96 (0.91 – 1.01)

Codón C57 n (%)				
AA	45 (84.9)	96 (85)	0.99	0.99 (0.87 – 1.14)
AC	6 (11.3)	10 (8.8)	0.56	1.42 (0.53 – 3.789)
CC	2 (3.8)	7 (6.2)	0.72	0.60 (0.13 – 2.83)
Promotor n (%)				
LY/LY	41 (77.4)	103 (91.2)	0.006	0.82 (0.70 – 0.97)
LX/LY	12 (22.6)	10 (8.8)	0.006 *	2.77 (1.3 – 5.9)
LY/AA	45 (84.9)	96 (85)	0.07	0.77 (0.57 – 1.04)
LX/AA	10 (18.9)	8 (7.1)	0.02 *	2.6 (1.1 – 6.3)
LY/AD	3 (5.7)	1 (0.9)	0.09	6.3 (0.6 – 60)
LY/AC	1 (1.9)	2 (1.8)	1.0	1.06 (0.9 – 11.4)
LY/AD	12 (22.6)	28 (24.8)	0.76	0.91 (0.50 – 1.6)

*p<0.05

Respecto a la asociación entre el engrosamiento de la íntima-media de la arteria carótida y el polimorfismo del exón 1 del gen MBL2 y de la región promotora, no se encontró asociación significativa con ninguna variante del exón 1 del gen MBL2. (Cuadro 2).

Cuadro 2. Asociación entre polimorfismo del exón 1 del gen MBL2 y de la región promotora con el engrosamiento de la íntima-media de la arteria carótida.

	Casos n =25 Con engrosamiento	Controles n= 19 Sin engrosamiento	p	OR IC 95%
Exón 1 gen MBL2				
Variante B (codón 54)				
AA	22 (88%)	15(79%)	0.34	1.9 (0.38 – 10.0)
AB	3 (12%)	4 (21.1)	0.44	0.51 (0.10 – 2.6)
BB	0 (0%)	1 (5.3%)	0.43	-
Variante D (codón 52)				
AA	23 (92%)	16 (84.2%)	0.63	2.15 (0.33-14.41)
AD	2 (8%)	2 (10.5%)	.80	(0.73 (0.09 -5.7)
DD	0 (0%)	1 (5.3%)	0.43	-
Variante C (codón 57)				
AA	25 (100%)	19 (100%)	1	-
AC	0 (0%)	0 (0%)	-	-
CC	0 (0%)	0 (0%)	-	-

Promotor				
LY/AA	14 (56%)	12 (63.2%)	0.63	0.74 (0.21 – 2.51)
LX/AA	6 (24%)	2 (10.5%)	0.43	2.6 (0.47 – 15.12)
LX/AD	1 (4%)	0 (0%)	1	-
LY/AC	25 (100%)	19 (100%)	1	-
LY/AD	4 (16%)	5 (26.3%)	0.46	0.53 (0.12 – 2.33)

Con relación a la asociación del engrosamiento de la íntima-media de la arteria carótida con variables demográficas y clínicas en los pacientes con SAAFP, esta estuvo presente y fue significativa en los pacientes con mayor edad ($p < 0.001$), que tienen mayor tiempo de evolución de la enfermedad ($p = 0.01$) y en aquellos con elevación en los niveles séricos de colesterol total ($p = 0.009$) y triglicéridos ($p = 0.03$). (Cuadro 3) No se analizó la asociación entre diabetes mellitus, hipertensión arterial y antecedente de tabaquismo (factores de riesgo tradicional de aterosclerosis) ya que fueron criterios de exclusión en la población de estudio.

Cuadro 3. Asociación entre el engrosamiento de la íntima-media de la arteria carótida con variables demográficas, clínicas y de laboratorio.

	Casos n=25 Con engrosamiento	Controles n= 19 Sin engrosamiento	p
Edad (mediana, rango)	53 (45 – 62.5)	38 (30 – 41)	0.001 *
Años de evolución (mediana, rango)	16 (11.5 – 21)	10 (7 – 16)	0.01 *
Género			
Femenino	22 (88%)	15 (79%)	0.44
Masculino	3 (12%)	4 (21%)	0.44
Colesterol total	182 (167 – 194)	156 (133 – 177)	0.009 *
HDL	38 (30.4 – 45)	39 (32 – 51)	0.26
LDL	100 (88.8 – 115.5)	88 (68.4 – 110)	0.20
Triglicéridos	216 (141 – 243)	162 (79 – 200)	0.03 *
Sobrepeso	15 (60%)	13 (68.4%)	0.56
Obesidad	5 (20%)	1 (5.3%)	0.16
Trombosis venosa	15 (60%)	12 (63.2%)	0.83

profunda			
Tromboembolia pulmonar	6 (24%)	2 (10.5%)	0.43
Trombosis mesentérica	2 (8%)	0 (0%)	0.49
Enfermedad vascular cerebral	5 (20%)	5 (26%)	0.72
Abortos	5 (20%)	1 (5.3%)	0.21
Homocisteína	31.1 (25.4 – 41.3)	45.9 (29.8 – 60.6)	0.16
Ácido úrico	5 (4.1 – 5.6)	5.4 (3.2 – 6.2)	0.70
Anticardiolipina IgG	8 (3.5 – 45.5)	31 (0 – 75)	0.30
Anticardiolipina IgM	8 (0 – 23.5)	14 (4 – 26)	0.30

*p<0.05

No se encontró correlación significativa entre el engrosamiento de la íntima-media de arteria carótida y las variantes de la región promotora del gen MBL2. (Cuadro 4)

Cuadro 4. Correlación entre el engrosamiento íntima media de la arteria carótida y las variantes de la región promotora en pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípido primario

Promotor	ACC derecha p 2-colas)	Coefficiente de correlación	ACC izquierda p Sig. (2-colas)	Coefficiente de correlación
LYA/A	.056	.277	.977	.004
LXA/A	.326	-.145	.957	-.008
LXA/D	.671	-.063	.357	.134
LYA/D	.264	-.164	.674	-.061

Discusión

Diversos estudios clínicos han investigado la relación entre los polimorfismos del gen MBL2 y la susceptibilidad al LES, así como su asociación con el riesgo de trombosis, las características clínicas e incluso con la evolución de la enfermedad (14, 42, 74,75). De acuerdo con un reciente meta-análisis, las variantes alélicas del exón 1 del gen MBL2 (codón 54, variante B) y de la región promotora en la posición -550 L y -221 X son factores de riesgo para LES. Los hallazgos del presente estudio, muestran que el genotipo heterocigoto AB de la variante B (codón 54) del exón 1 del gen MBL2 es altamente prevalente en pacientes mestizos mexicanos no relacionados con SAAP en comparación con el grupo control, así como también de las variantes LX/LY y LX/AA de la región promotora. Estos hallazgos abren una importante línea de investigación para explorar el papel del polimorfismo del exón y la región promotora del gen MBL2 en la susceptibilidad para el síndrome de anticuerpos antifosfolípido primario.

Existe evidencia de un incremento en la frecuencia de infecciones y de la tendencia trombótica en pacientes con LES que son portadores de genotipos deficientes de MBL (O/O) (76). Recientemente, Øhlenschläger T y cols. (43) reportaron una asociación entre estas variantes alélicas (O/O) y un incremento en la incidencia de trombosis arterial en pacientes con LES. En esta misma línea de investigación, Font J y cols. (14), reportaron una prevalencia "tres veces mayor de enfermedad cardiovascular, trombosis venosa y síndrome de anticuerpos antifosfolípido asociado, en pacientes con LES que tienen genotipos deficientes de MBL. Otros autores han sugerido una asociación entre la ocurrencia de polimorfismo del gen MBL2 con trombosis y anticuerpos antifosfolípido.

Si bien existe evidencia, de una asociación significativa entre la presencia de variantes alélicas del gen MBL2 y el incremento de la placa aterosclerosa a nivel de arteria carótida, tal como lo describe Hegele R y cols (59), no encontramos una asociación significativa entre las variantes alélicas del exón 1 y la región promotora del gen MBL2 con aterosclerosis temprana identificada mediante el engrosamiento de la íntima-media de arteria carótida. Consistente con nuestros resultados, Troelsen L y cols. (77) no encontraron asociación significativa entre los

genotipos de MBL2 con engrosamiento de la íntima-media en pacientes con enfermedad autoinmune. Sin embargo, similar a lo descrito en otros estudios ⁽⁷⁸⁾, nosotros encontramos una asociación significativa entre el engrosamiento de la íntima media de la arteria carótida de pacientes con SAAFP, con otros factores de riesgo tradicional, tales como: edad (principalmente mayor de 40 años), un mayor tiempo de evolución de la enfermedad (> 11 años) e hipercolesterolemia. De hecho, existe evidencia de una elevada prevalencia de síndrome metabólico y aterosclerosis acelerada en pacientes con SAAFP ^(79,80), lo que pone de manifiesto la importancia en investigar el papel de distintos factores de riesgo tradicional y no tradicional, realizar la detección oportuna de aterosclerosis, así como la necesidad de implementar intervenciones de prevención eficaces y efectivas en la atención de este grupo de pacientes, que permitan mejorar su desenlace clínico. ^(81,82)

Font J y cols. ⁽¹⁴⁾, señalan que el SAAF se asoció de forma independiente con los genotipos del gen MBL2. En su población de estudio observaron una prevalencia de SAAF tres veces mayor en los pacientes con LES portadores de los genotipos deficientes de MBL en comparación con el grupo control. Lo que destaca el interés en investigar no sólo la prevalencia de estas variantes alélicas en pacientes con SAAF primario, sino también la fuerza de asociación con trombosis arterial o venosa en cohortes prospectivas.

Entre las limitaciones metodológicas de nuestro estudio destaca un diseño observacional, no prospectivo, que limita el seguimiento de los pacientes, la realización de un mayor número de mediciones del engrosamiento de la íntima-media de la arteria carótida, así como del registrar la presencia de eventos de trombosis arterial o venosa en función de la variante alélica presente. Otra limitación del estudio, incluye el pobre tamaño de muestra en los grupos de estudio.

Conclusiones

Este es el primer estudio que describe la prevalencia y asociación de polimorfismos del exón 1 y la región promotora del gen MBL2 en pacientes mestizo mexicanos no relacionados con SAAFP. Nuestros resultados confirman la presencia de polimorfismos en el exón 1 del gen MBL2 en pacientes con SAAF primario. Se observó una mayor prevalencia del genotipo heterocigoto AB de la variante B del exón 1 y de las variantes LX/LY y LX/AA de la región promotora del gen MBL2. No se demostró asociación significativa entre el engrosamiento de la íntima media de la arteria carótida y las variantes alélicas del exón 1 y de la región promotora del gen MBL. Los factores asociados con el engrosamiento de la íntima-media de la arteria carótida fueron: edad > 40 años, mayor tiempo de evolución de la enfermedad e hipercolesterolemia. Se observó una correlación positiva débil entre la variante alélica LYA/A y el engrosamiento de la arteria carótida común derecha. Los genotipos deficientes del gen MBL2 podrían estar relacionados con la susceptibilidad a SAAFP y ser un factor de riesgo que interactúa con factores ambientales e inmunológicos en el desarrollo de AT. Se requieren estudios prospectivos para confirmar estos resultados.

Bibliografía

1. Ross R. Atherosclerosis An inflammatory disease. *N Engl J Med*,1999;340:115-26
2. Matsuura E, Kobayashi K, Yasuda T, et al. Antiphospholipid antibodies and atherosclerosis. *Lupus* 1998;17:S135-S139
3. Jara LJ, Medina G, Olga-Vera L, et al.. Atherosclerosis and antiphospholipid syndrome. *Clin Rev Allergy Immunol* 2003;25:79-87
4. Leeuw K, Kallenberg C, Bijl M. Accelerated atherosclerosis in patients with systemic autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1051:362-371
5. Vaquero M. La aterosclerosis: una enfermedad dinámica de la íntima arterial, con una evolución crónica en una fase predecible y otra impredecible. *Med Clin* 1997;109:229-235
6. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-1695
7. Tegos T, Kalodiki E, Sabetal M, et al. The genesis of atherosclerosis and risk factors: A Review. *Angiology* 2001;52:89-98
8. Matadamas Z, Perez C, Hernández J. Nuevos factores de riesgo cardiovascular: hiperhomocisteinemia. *Rev Med IMSS* 2003;41:235-249
9. Glass C, Witztum J. Atherosclerosis: The road ahead. *Cell* 2001;104:503-516
10. Roman M, Shanker B, Davis A, Lockshin M, Samaritano L, Simantov R, et al. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003;349:2399-2406
11. Manzi S, Meilahn E, Rairie J, et al. A incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus : comparison with the Framingham Study. *Am J Epidemiol* 1997;145:408-415
12. Sherer Y, Shoenfeld Y. Atherosclerosis. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:97-9
13. Madsen H, Videm V, Svejgaard A, et al. Association of mannose-binding-lectin deficiency with severe atherosclerosis. *The Lancet* 1998;352:959-60
14. Font J, Ramos C, Brito Z. et al. Association of mannose-binding lectin gene polymorphisms with antiphospholipid syndrome, cardiovascular disease and chronic damage in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2007;46:76-80
15. Matsuura E, Koike T. Accelerated atheroma and anti-b₂-glycoprotein 1 antibodies. *Lupus* 2000;9:210-216
16. Kobayashi K, Kishi M, Atsumi T, et al. Circulating oxidized LDL forms complexes with b₂-glycoprotein 1: implication as an atherogenic autoantigen. *J Lipid Res* 2003;44:716-726

17. López D, García V, Palafox S, et al. Oxidized low density lipoprotein/ α_2 -glycoprotein 1 complexes an autoantibodies to oxlig-1/ α_2 -glycoprotein 1 in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Am J Clin Pathol* 2004;121:426-436
18. Lopez D, Kobayashi K, Merrill J, et al. IgG autoantibodies against α_2 -glycoprotein I complexed with a lipid ligand derived from oxidized low-density lipoprotein are associated with arterial thrombosis in antiphospholipid syndrome. *Clin Dev Immunol* 2003;10:203-211
19. Vaarala O, Manttari M, Manninen V, et al. Anti-cardiolipin antibodies and a risk of myocardial infarction in a prospective cohort of middle-aged men. *Circulation* 1995;91:23-27
20. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344: 1058-66.
21. Turner M, Hamvas R. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Rev Immunogenet* 2000;2:305-22
22. Petersen S, Thiel S, Jensenius J. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: Biology and disease association. *Mol Immunol* 2001;38:133-49
23. Dommert R, Klein N and Turner M. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens* 2006;68:192-209.
24. Verdu P, Barreiro L, Patin E, et al. Evolutionary insights into the high worldwide prevalence of MBL2 deficiency alleles. *Hum Mol Genet* 2006;15:2650-2658
25. Lipscombe RJ, Beatty DW, Ganczakowski M, Goddard EA, Jenkins T, Lau YL, Spurdle AB, Sumiya M, Summerfield JA, Turner MW. Mutations in the human mannan-binding protein gene: frequencies in several population groups. *Eur J Hum Genet* 1996; 4: 13-19.
26. Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Thiel S, Svejgaard A. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* 1994; 40:37-44.
27. Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO. Mannose-binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun* 2006; 7:85-94.
28. Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Svejgaard A. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum levels of Mannan-binding protein. *J Immunol* 1995; 155: 3013-3020.
29. Madsen HO, Satz ML, Hogh B, Svejgaard, A, Garred P. Different molecular events result in low protein levels of Mannan-binding lectin in populations from Southeast Africa and South America. *J Immunol* 1998; 161:3169-3175.
30. Casanova JL, Abel L. Human mannanose-binding lectin in immunity: friend, foe or both? *J Exp Med* 2004; 199:1295–1299.
31. Steffensen R, Thiel S, Varming K, Jersild C, Jensenius JC. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by

polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *J Immunol Methods* 2000; 241: 33-42.

32. Minchinton RM, Dean MM, Clark TR, Heathley S, Mullighan CG. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scand J Immunol* 2002; 56:630-641.

33. Thiel S, Frederiksen P and Jesenius J. Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency. *Mol Immunol* 2006;43:86-96.

34. Garred P, Larsen F, Madsen O, et al. Mannose-binding lectin deficiency-revisited. *Mol Immunol* 2003;40:73-84.

35. Guardia A and Lozano F. Mannose-binding lectin deficiency in infectious and inflammatory disorders. *Rev Med Microbiol* 2003;14:41-52

36. Bouwman L, Roep B and Roos A. Mannose-binding lectin: Clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. *Hum Immunol* 2006;67:247-256

37. Klein NJ. Mannose-binding lectin: do we need it? *Mol Immunol* 2005; 42 (8): 919-924.

38. Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* 2003;40:423-429

39. Jack D, Bidwell J, Turner M, et al. Simultaneous genotyping for all three known structural mutations in the human-binding lectin gene. *Human Mutat* 1997;9:41-46

40. Tsutsumi A, Sasaki K, Ichikawa K, et al. Mannose-binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome. *Genes Immun* 2001;2:99-104

42. Lee Y, Witte T, Momot T, et al. The mannose-binding lectin gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus. Two case-control studies and a meta-analysis. *Arthritis Rheum* 2005;52:3966-3974

43. Øhlenschlaeger T, Garred P, Madsen H, et al. Mannose-binding lectin variant alleles and the risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2004;351:260-267

44. Calvo-Alén J, Alarcón G, Tew M, et al. Systemic Lupus Erythematosus in a Multiethnic US Cohort. Deficient Mannose-binding lectin exon 1 polymorphisms are associated with cerebrovascular but not with other arterial thrombotic events. *Arthritis Rheum* 2006;54:1940-1945

45. Seelen M, van der Bijl E, Trouw L, et al. A role for mannose-binding lectin dysfunction in generation of autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2005;44:111-119

46. Limnell V, Aittoniemi J, Vaarala O, et al. Association of mannose-binding lectin deficiency with venous bypass graft occlusions in patients with coronary heart disease. *Cardiology* 2002;98:123-126

47. Garred P, Voss A, Madsen H, et al. Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Genes Immun* 2001;2:442-50
48. Montero P, Franco V, Strauss Y, et al. The antiphospholipid syndrome. *Medicrit* 2008;5 :27-40
49. Wendell A.W. Antiphospholipid syndrome. *Rheum Dis Clin North* 2001,3:1-27
50. Shoenfeld Y. Systemic antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2003;12:497-498
51. Erkan D and Lockshin M. Antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18:242-248
52. Wilson W, Gharavi A, Koike T, et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* 1999;42:1309-1311
53. Miyakis S, Lockshin M, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006 ;4 :295-306
54. Mejía-Romero R, García-Carrasco M, Galarza-Maldonado C, et al. Primary antiphospholipid syndrome in Latin American mestizo patients: clinical and immunologic characteristics and comparison with European patients. *Clin Rheumatol* 2008;27:891-897
55. Finazzi G. The epidemiology of the antiphospholipid syndrome: Who is at risk?. *Curr Rheumatol Rep* 2001; 3:271-276
56. Belizna C, Richard V, Primard E, et al. Early atheroma in primary and secondary antiphospholipid syndrome: an intrinsic finding. *Semin Arthritis Rheum* 2008;37:373-380
57. Gordon P, George J, Khamashta M. et al. Atherosclerosis and autoimmunity. *Lupus* 2001;10:249-252
58. Medina G, Cassaos D, Jara L, et al. Increased carotid artery intima-media thickness may be associated with stroke in primary antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2003;62:607-610
59. Hegele R, ban M, Anderson C, et al. Infection-susceptibility alleles of mannose-binding lectin are associated with increased carotid plaque area. *J Invest Med* 2000;48:198-202
60. Ames PR, Delgado Alves J, López LR, et al. Antibodies against beta2-glycoprotein I complexed with an oxidized lipoprotein relate to intima thickening of carotid arteries in primary antiphospholipid syndrome. *Clin Dev Immunol* 2006;13:1-9
61. López LR, Dier KJ, López D, et al. Anti-beta 2-glycoprotein I and antiphosphatidylserine antibodies are predictors of arterial thrombosis in patents with antiphospholipid syndrome. *Am J Clin Pathol* 2004;121:142-149

62. Rauch U, Osende J, Fuster V, et al. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med* 2001;134:224-238
63. Ter Avest E, Stalenhoef A, Graaf J. What is the role of non-invasive measurements of atherosclerosis in individual cardiovascular risk prediction?. *Clin Sci* 2007, 112:507-516
64. Grotta JC. Clinical practice. Carotid stenosis. *N Engl J Med* 2013;369:1143-1150.
65. Touboul P, Hennerici M, Meairs S, et al. Mannheim carotid intima-media thickness consensus (2004-2006). *Cerebrovasc Dis* 2007,23 :75-80
66. Smith S, Greenland P, Grundy S. Prevention conference V: beyond secondary prevention: identifying the high-risk patient for primary prevention. *Circulation* 2000;101:111-116
67. O'leary D, Polak J. Intima-media thickness: a tool for atherosclerosis imaging and event prediction. *Am J Cardiol* 2002;90:18-21
68. Burke G, Evans G, Riley W, et al. Arterial wall thickness is associated with prevalent cardiovascular disease in middle-aged adults. The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Stroke* 1995;26:386-391
69. Cantú BC, Rodriguez SJ, Reynoso M, et al. Cardiovascular risk factors and carotid atherosclerosis detected by ultrasonography. *Salud Pública Mex* 1999;41:452-459
70. Lekakis JP, Papamichael C, Papaioannou TG, Stamatelopoulos KS, Cimponeriu A, Protogerou AD, Kanakakis J, Stamatelopoulos SF. Intima-media thickness score from carotid and femoral arteries predicts the extent of coronary artery disease: intima-media thickness and CAD. *Int J Cardiovasc Imaging* 2005;21:495-501.
71. Esdaile JM, Abrahamowicz T, Grodzicky T, et al. Traditional Framingham risk factors fail to fully account for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001;44:2331-2337
72. Tin SK, Lee LY, Thumboo J, Koh DR, Fong KY. PCR-RFLP genotyping for exon 1 and promoter region mutations of the human mannose binding lectin (MBL-2) gene. *J Immunol Methods* 2005;303:148-151.
73. Gomi K, Tokue Y, Kobayashi T, et al . Mannose-Binding Lectin Gene Polymorphism Is a Modulating Factor in Repeated Respiratory Infections. *Chest* 2004;126:95-99
74. Jakab L, Laki J, Sallai K, Temesszentandrás G, Pozsonyi T, Kalabay L, Varga L, Gombos T, Blaskó B, Bíró A, Madsen HO, Radics J, Gergely P, Füst G, Czirják L, Garred P, Fekete B. Association between early onset and organ manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE) and a down-regulating promoter polymorphism in the MBL2 gene. *Clin Immunol* 2007;125(3):230-236.
75. Sandrin-Garcia P, Brandão LA, Coelho AV, Guimarães RL, Pancoto JA, Segat L, Donadi EA, de Lima-Filho JL, Crovella S. Mannose binding lectin gene (MBL2) functional polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in southern Brazilians. *Hum Immunol* 2011;72(6):516-521.

76. Garred P, Madsen HO, Halberg P, Petersen J, Kronborg G, Svejgaard A, Andersen V, Jacobsen S. Mannose-binding lectin polymorphisms and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999;42:2145-2152.
77. Troelsen LN, Garred P, Christiansen B, Torp-Pedersen C, Christensen IJ, Narvestad E, Jacobsen S. Double role of mannose-binding lectin in relation to carotid intima-media thickness in patients with rheumatoid arthritis. *Mol Immunol* 2010;47(4):713-718.
78. Ames PR, Antinolfi I, Scenna G, Gaeta G, Margaglione M, Margarita A. Atherosclerosis in thrombotic primary antiphospholipid syndrome. *J Thromb Haemost* 2009;7:537-542.
79. Medina G, Gutiérrez-Moreno AL, Vera-Lastra O, Saavedra MA, Jara LJ. Prevalence of metabolic syndrome in primary antiphospholipid syndrome patients. *Autoimmun Rev* 2011;10:214-217.
80. Jara LJ, Medina G, Vera-Lastra O, Amigo MC. Accelerated atherosclerosis, immune response and autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 2006;5:195-201.
81. Ames PR, Margarita A, Alves JD. Antiphospholipid antibodies and atherosclerosis: insights from systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Clin Rev Allergy Immuno*. 2009;37:29-35.
82. Jara LJ, Medina G, Vera-Lastra O. Systemic antiphospholipid syndrome and atherosclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007;32:172-177.

Anexos

Anexo 1

Datos Demográficos

Título del proyecto:

Asociación de polimorfismo del exón 1 del gen MBL2 y aterosclerosis temprana en pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípido primario

Folio: _____

Fecha: ____/____/____

Nombre del paciente y/o caso: _____

Ocupación: _____ Escolaridad: _____

Edad (años): _____ Género: M F Estado civil: _____

Peso (Kg): _____ Talla: _____ IMC: _____

Tiempo de evolución de la enfermedad (años): _____

Tiempo de diagnóstico de la enfermedad (años): _____

Órgano afectado al momento del diagnóstico: _____

Antecedentes Personales:

Hipertensión Arterial Sistémica: Sí No Neoplasias: Sí No

Tuberculosis: Sí No Infecciones severas: Sí No

Empleo de esteroides: Sí No Fármacos empleados: Sí No

Cuáles? _____

Comentarios:

Anexo 2

Ultrasonido doppler carotídeo bilateral

Título del proyecto:

Asociación de polimorfismo del exón 1 del gen MBL2 y aterosclerosis temprana en pacientes con síndrome de anticuerpos antifosfolípido primario

Nombre del paciente: _____

Número de Filiación: _____ Edad: _____

Folio: _____ Fecha de Nac.: ____/____/____ Fecha de estudio: ____/____/____

Tipo de sujeto de estudio: Caso _____ Control _____

Engrosamiento íntima y media carótida común: Sí No
LONG / TRANSV
Derecha _____ Izquierda _____

Engrosamiento íntima y media bulbo: Sí No
LONG / TRANSV
Derecha _____ Izquierda _____

Engrosamiento íntima y media carótida interna: Sí No
Derecha _____ Izquierda _____

Identificación de placa ateromatosa: Sí No

Localización y descripción:

Disminución del diámetro de la luz del vaso: Sí No

Hallazgos y porcentaje de oclusión de la luz del vaso:

Nombre y Firma del Médico Radiólogo
