



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD
BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**PARTICIPACIÓN DEL POLIMORFISMO rs12979860 DE IL28 EN
LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

YANELI JUÁREZ VICUÑA

**TUTOR: DR. FAUSTO SÁNCHEZ MUÑOZ
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

MEXICO, D.F. MARZO DE 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

PARTICIPACIÓN DEL POLIMORFISMO rs12979860 DE IL28 EN LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

El presente trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez en el departamento de Inmunología, bajo la tutoría del Dr. Fausto Sánchez Muñoz.

Jurado asignado:

Presidente: Dr. Julio Granados Arriola	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición.
Vocal: Dr. Fausto Sánchez Muñoz	Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.
Vocal: Dr. José Manuel Rodríguez Pérez	Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.
Vocal: Dra. Laura Virginia Adalid Peralta	Instituto Nacional de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Secretario: Adrián Ochoa Leyva	Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Este proyecto fue apoyado por:

- Beca CONACYT con el número de CVU 481471.
- Beca tesis de posgrado otorgada por el Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología, COMECYT con número de folio 14BTM014.

Agradecimientos

Al Dr. Fausto Sánchez Muñoz por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar este trabajo, gracias por su apoyo y amistad, gracias por ayudarme, escucharme, aconsejarme y guiarme.

Al Dr. Luis M. Amezcua Guerra y a la Dra. Jacqueline Villaseñor Jasso por ser parte fundamental en la realización de este trabajo.

Al Dr. Rafael Bojalil Parra por haberme permitido trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Ricardo Márquez Velasco por su objetividad y apoyo durante mi estancia en el departamento de Inmunología.

A la M.C. Martha A. Ballinas Verdugo y al QF.B. Valentín Jiménez Rojas por sus comentarios y apoyo en el laboratorio.

Paty y Edgar muchas gracias por ser mis mejores amigos.

Adrián y Javier muchas gracias por su comprensión y apoyo incondicional.

Dedicatoria

A mi familia...

Papá y mamá muchas gracias por confiar en mí y apoyarme a realizar este sueño, gracias por no dejarme sola, ustedes son mi razón de vivir.

A mis hermanos Isaura y Antonio mis compañeros de cien batallas, gracias por formar parte de mis sueños, porque siempre han estado ahí para mí.

A mis hermanos Anselmo y Juan más que mis hermanos son mis amigos, gracias por tener su apoyo constante.

A Dios por no dejarme sola en ningún momento, sé que siempre has estado junto a mí.

Índice	
<u>Abreviaturas</u>	<u>1</u>
<u>Resumen</u>	<u>2</u>
<u>Antecedentes</u>	<u>4</u>
Lupus eritematoso sistémico	4
Citocinas y las diferentes familias de Interferones	7
Familia de Interferones tipo I	7
Familia de Interferones tipo III	9
Participación de diferentes citocinas e Interferones en LES	10
LY6E	12
ISG15	14
Quimiocina IP-10 (CXCL10)	15
Polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs12979860	17
Asociación de diferentes SNP en pacientes con LES	20
<u>Justificación</u>	<u>21</u>
<u>Hipótesis</u>	<u>22</u>
<u>Objetivos</u>	<u>22</u>
Objetivo General	22
Objetivos específicos	22
<u>Materiales y métodos</u>	<u>23</u>
<u>Metodología de laboratorio</u>	<u>25</u>
Obtención de sangre periférica	25
Extracción de DNA y genotipificación de las variantes del SNP rs12979860 de IL28B	25
Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	26
Cultivo de PBMC estimuladas con IFN-α recombinante	26
Extracción del RNA	27
Síntesis de DNA complementario	27
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)	27
Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	28
Análisis estadístico	29
<u>Resultados</u>	<u>30</u>

Características demográficas del grupo control y de pacientes con LES (primera y segunda etapa de muestreo) incluidos en estudio	30
Análisis del SNP rs12979860 de IL28B en el grupo control y en el grupo de pacientes con LES	31
Análisis de asociación del SNP rs12979860 de IL28B con las características clínicas de los pacientes con LES	31
Niveles de la proteína IP-10 en suero de pacientes con LES comparado con los controles	34
Niveles de expresión relativa del mRNA de IP-10 en grupo control y pacientes con LES	36
Niveles de secreción de la proteína IP-10 en PBMC del grupo control y pacientes con LES	38
Niveles de expresión relativa del mRNA de los genes de la firma de Interferón	40
<u>Discusión</u>	<u>43</u>
Asociación de las características clínicas de los pacientes con LES con las variantes genéticas del SNP rs12979860 de IL28B	43
Asociación del genotipo TT del SNP rs12979860 de IL28B con autoanticuerpos	43
Asociación del genotipo TT del SNP rs12979860 de IL28B con Hipertensión arterial sistémica	45
Concentración de IP-10 en suero de pacientes con LES y correlación con el valor de SLEDAI	46
Concentración de IP-10 en suero de pacientes con LES con base a los genotipos del SNP rs12979860 de IL28B	47
Secreción de IP-10 en cultivo celular de PBMC estimuladas con IFN-α	47
Firma de Interferón y asociación con los genotipos de SNP rs12979860 de IL28B	48
<u>Conclusiones</u>	<u>51</u>
<u>Perspectivas</u>	<u>52</u>
<u>Bibliografía</u>	<u>53</u>
<u>Anexos</u>	<u>62</u>

Índice de figuras

Figura 1. Visión general de la patogénesis de Lupus eritematoso sistémico	4
Figura 2. Modelo de señalización de los IFN tipo I e IFN- λ	10
Figura 3. Visión general del cromosoma 19 y ubicación del SNP rs12979860	17
Figura 4. Frecuencias alélicas del SNP rs12979860 de IL28B.....	18
Figura 5. Niveles de IP-10 en suero de grupo control y pacientes con LES.....	34
Figura 6. Niveles de la proteína IP-10 en suero de grupo control y pacientes con LES estratificados de acuerdo los genotipos del SNP rs12979860 de IL28B.....	35
Figura 7. Niveles de inducción de la expresión de IP-10 en grupo control y pacientes con LES ...	36
Figura 8. Niveles de inducción de la expresión de IP-10 en grupo control y pacientes con LES en el tratamiento de 1000 U de IFN- α estratificados de acuerdo a los genotipos del SNP rs12979860 de IL28B.....	37
Figura 9. Secreción de IP-10 en PBMC en grupo control y pacientes estimuladas con IFN- α	38
Figura 10. Niveles de secreción de la proteína IP-10 en PBMC de pacientes con LES y controles estratificados con base a los genotipos de SNP rs12979860 de IL28B.....	39
Figura 11. Visión general de los resultados obtenidos en el estudio de participación del SNP rs12979860 de IL28B.....	42

Índice de tablas

Tabla 1. Criterios del Colegio Americano de Reumatología para el diagnóstico de LES.....	5
Tabla 2. Frecuencias alélicas y frecuencia de los diferentes genotipos del SNP rs12979860 de IL28B en población mexicana	19
Tabla 3. Primer y sondas utilizados en RT-PCR	28
Tabla 4. Distribución de los genotipos del SNP rs12979860 de IL28B en pacientes con LES	31
Tabla 5. Características basales de los pacientes con LES estratificadas de acuerdo al genotipo del SNP rs12979860 de IL28B	32
Tabla 6. Asociación de los genotipos del SNP rs12979860 de IL28B con características clínicas de los pacientes con LES	33
Tabla 7. Comparación de los niveles de inducción del mRNA de los genes de la firma de Interferón en el tratamiento de 1000 U en grupo control y pacientes LES	40
Tabla 8. Comparación de los niveles de inducción del mRNA de la firma de Interferón tratamiento de 1000 U de IFN- α en grupo control y pacientes con LES	41

Abreviaturas

ANA	Anticuerpos anti-nucleares
anti-dsDNA	Anticuerpos anti-DNA de doble cadena
cDNA	ADN complementario
ds-DNA	DNA de doble cadena
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
GWAS	Estudio de asociación del genoma completo
IFN	Interferón
IFN- α R	Receptor de IFN- α
IFN- γ	Interferón gamma
IFN- λ	Interferón lambda
IP-10/CXCL10	Proteína inducida por Interferón gamma, quimiocina CXCL10
IRF	Factor regulador de Interferón
ISGs	Genes inducidos por Interferón
ISREs	Elementos de respuesta a Interferón
LES	Lupus eritematoso sistémico
LPS	Lipopolisacárido
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NK	Células Natural Killer
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer fosfato salino
pDCs	Células dendríticas plasmacitoides
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SLEDAI	Índice numérico con parámetros clínicos y bioquímicos que establece una correlación índice/daño (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index)
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
snRNP	Ribonucleoproteínas nucleares pequeñas
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TLR	Receptor tipo Toll
VHC	Virus de Hepatitis C

Resumen

Introducción. El Lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune multisistémica, en la cual se presentan una amplia variedad de manifestaciones clínicas y múltiples anormalidades celulares. La etiología clínica de LES no es comprendida por completo, sin embargo, se sabe que el Interferón alfa (IFN- α) está involucrado en múltiples aspectos de la etiología y patogénesis de LES. Por otra parte, existe el polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs12979860, este SNP es un importante biomarcador de la respuesta a la terapia con IFN- α en pacientes con Hepatitis C, este SNP se encuentra cerca del gen de IL28B (IFN- λ 3). **Objetivo.** Explorar el papel del SNP rs12979860 de IL28B en LES: asociación con variables clínicas y respuesta a IFN- α . **Metodología.** Se recolectaron 92 muestras de pacientes con LES (56 muestras en la primera etapa y 36 muestras en la segunda etapa de muestreo) y 22 muestras de donadores sanos (grupo control), en estas muestras se determinaron las variantes genotípicas del SPN rs12979860 de IL28B. Además de esto las células mononucleares de sangre periférica (PBMC; 36 muestras de pacientes con LES y 22 muestras del grupo control), fueron cultivadas y estimuladas con 1000 U de IFN- α recombinante, la expresión del mRNA de IP-10, ISG15 y LY6E fue determinada mediante RT-PCR. Por otra parte la concentración en de IP-10 secretada por las PBMC estimuladas por IFN- α y la concentración en suero de IP-10 en pacientes con LES y donadores sanos fueron determinadas mediante el ensayo de ELISA. **Resultados.** El genotipo TT se asoció con una menor frecuencia de positividad de anticuerpos anti-DNA ($p= 0.038$) y con una mayor frecuencia de Hipertensión arterial sistémica (HAS; $p= 0.016$). Por otro lado, Los niveles en suero de IP-10 fueron mayores en los pacientes con LES comparado con el grupo control ($p < 0.0001$). Los niveles de IP-10 en suero correlacionaron positivamente con el SLEDAI ($p= 0.004$). Los niveles en suero de IP-10 en el grupo control fueron mayores en los individuos con presencia de los genotipos CC, CT comparado con los individuos TT ($p= 0.0054$), en los pacientes con LES los niveles en suero de IP-10 fueron mayores en los pacientes con el genotipo TT comparado con los pacientes CC, CT ($p= 0.015$). Los niveles de secreción de IP-

10 fueron mayores en el tratamiento de 1000 U de IFN- α comparado con el tratamiento de RPMI tanto en el grupo control como en los pacientes con LES ($p < 0.0001$ respectivamente). La secreción de IP-10 fue mayor en tanto en el grupo control como en los pacientes con LES con presencia del alelo C comparado con el alelo T ($p = 0.032$ y $p = 0.037$, respectivamente). Los niveles de expresión del mRNA de IP-10 fueron mayores en el tratamiento de 1000 U de IFN- α comparado con el tratamiento de RPMI tanto en el grupo control como en los pacientes con LES ($p < 0.0001$). Por otra parte, los niveles expresión del mRNA de los ISGs (IP-10, ISG15 y LY6E) fueron mayores en el tratamiento de 1000 U de IFN- α comparado con el tratamiento de RPMI ($p = 0.048$, $p = 0.019$ y $p = 0.010$ respectivamente), sin embargo parte no se encontró diferencia significativa en los niveles de expresión de los ISGs de acuerdo a las variantes genéticas del SNP rs12979860. **Conclusiones.** El genotipo TT del SNP rs12979860 se asocia con una mayor frecuencia del Hipertensión arterial sistémica (HAS) y con una menor presencia de anticuerpos anti-DNA. El genotipo TT se asocia con mayores niveles de IP-10 en suero de pacientes con LES, y este genotipo también se asocia con los producción de IP-10 en cultivo de PBMC tanto en el grupo control como en los pacientes con LES.

Palabras clave: Lupus, SNP rs12979860, IFN- α .

Antecedentes

Lupus eritematoso sistémico

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad caracterizada por una respuesta inmunológica anormal que afecta a diferentes órganos y sistemas. Esta patología presenta una amplia variedad de manifestaciones clínicas y múltiples anomalías celulares. El LES afecta diversos órganos incluyendo la piel, riñones, corazón, articulaciones y sistema nervioso central como se puede ver en la figura 1 (Tsokos GC, 2011).

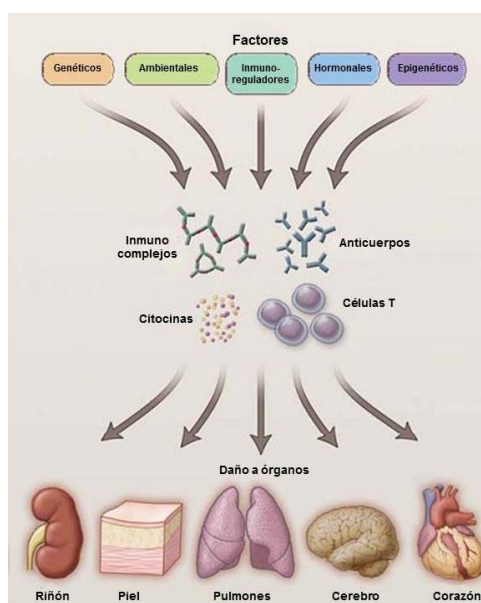


Figura 1. Visión general de la patogénesis de Lupus eritematoso sistémico. Factores genéticos, ambientales, hormonales, inmunoreguladores y epigenéticos actúan de forma adversa en el sistema inmune. La acción de estos factores lleva a la generación de autoanticuerpos, complejos inmunes y citocinas inflamatorias, que pueden dar inicio o exacerbar el daño en órganos blanco. Modificado de Tsokos, 2011.

La heterogeneidad clínica de LES llevo a establecer 11 criterios citados en la Tabla 1 los cuales son la base para el diagnóstico de la enfermedad, de esos criterios es necesario presentar al menos 4 para diagnosticar a una persona con LES (Tan EM et al. 1982).

Tabla 1. Criterios del Colegio Americano de Reumatología para el diagnóstico de LES.

Criterio	Definición
Rash Malar	Eritema fijo plano o elevado sobre la eminencia malar con tendencia a respetar los pliegues nasonabiales.
Rash Discoide	Placas eritematosas elevadas con escamas queratósicas, adherentes y tapones foliculares levantadas.
Fotosensibilidad	Reacción a la luz solar produciendo un aumento del eritema en la piel.
Ulceras Orales	Ulceras en la nariz o boca, habitualmente indoloras.
Artritis	Artritis no erosiva que afecta dos o más articulaciones periféricas (artritis en donde el hueso cercano a la articulación no llega a destruirse).
Serositis	Pleuritis o pericarditis (inflamación de la tela que envuelve el corazón o pulmón).
Afección renal	Exceso de proteínas en la orina y/o cilindros celulares.
Afección Neurológica	Convulsiones y/o psicosis en ausencia de medicamentos o trastornos neurológicos.
Afección Hematológica	Anemia, leucopenia, linfopenia o trombocitopenia.
Anticuerpos Antinucleares	Prueba positiva para los anticuerpos antinucleares (ANA).
Afección Inmunológica	Examen de laboratorio positivo para anti DNA de doble cadena, anti Sm positivo, o anticuerpos antifosfolípidos.

La incidencia de LES a nivel mundial varía de 1 a 10 casos por cada 100,000 personas al año y la prevalencia de 20 a 70 por cada 100,000 al año (Pons-Estel GJ et al, 2010). En México la incidencia de LES es desconocida, pero la prevalencia puntual es de 0.07% (Álvarez-Nemegyei J et al, 2011).

La etiología exacta de LES aún no es comprendida por completo, sin embargo se sabe que factores genéticos, ambientales, inmunoregulatorios y epigenéticos están involucrados en el desarrollo y progresión de LES. La acción de todos estos factores conlleva a la generación de autoanticuerpos, complejos inmunes y citocinas inflamatorias, que pueden iniciar y/o exacerbar la inflamación y el daño en varios órganos (Tsokos GC. 2011). Tanto factores de riesgo ambientales como genéticos son importantes en el desarrollo de LES. Además se sabe que la enfermedad afecta principalmente a mujeres en una relación mujer: hombre de 9:1, lo cual sugiere que las hormonas podrían ser importantes en el

desarrollo de esta patología. En cuanto a los factores ambientales se ha encontrado que la exposición a la luz UV desencadena LES. Por otro lado, diferentes infecciones virales y bacterianas también han sido implicadas en la patogénesis y desarrollo de la enfermedad (Elkon KB et al, 2011).

Múltiples anomalías contribuyen a la patogénesis de LES, entre las anomalías inmunológicas se encuentra la eliminación anormal de las células apoptóticas así como también de formación de complejos inmunes, y un bajo umbral de activación de los linfocitos T y B. Esto conduce a la pérdida de la auto-tolerancia y producción de autoanticuerpos. Los complejos inmunes son característicos de LES y están formados por autoanticuerpos que contienen DNA o RNA (Salloum R et al, 2011).

La producción de autoanticuerpos es una de las principales anomalías inmunológicas en los pacientes con LES. Los autoanticuerpos reconocen uno o más antígenos propios encontrados en el núcleo, citoplasma y superficie celular (Mok CC et al, 2003). En los pacientes con LES se observa una aberrante producción de un amplio grupo de autoanticuerpos. Los autoanticuerpos son dirigidos contra el citoplasma y antígenos de la membrana celular (Cozzani E et al, 2014).

Otro tipo de autoanticuerpos que se encuentran en los pacientes con LES son los anticuerpos anti-nucleares (ANA), dirigidos contra antígenos específicos, que incluyen al DNA de cadena sencilla (ss) y de doble cadena (ds), histonas, nucleosomas (complejo de DNA-histonas), antígeno Smith (Sm), Ro, La, ribonucleoproteína (RNP; Cozzani E et al, 2014). Los anticuerpos ANA son característicos de LES y están presentes en más del 95% de los pacientes (Mok CC et al, 2003), y son utilizados como criterio de diagnóstico de LES. Además estos autoanticuerpos también son utilizados para monitorear el curso clínico del paciente, especialmente cuando los pacientes reciben tratamiento con inmunosupresores debido a que estos medicamentos reducen la producción de autoanticuerpos. Además se sabe que los anticuerpos ANA correlacionan con el daño renal y el daño en el sistema nervioso central (Cozzani E et al, 2014).

Por otra parte, se sabe que los autoanticuerpos anti-Sm son altamente específicos de LES y los anticuerpos anti-nucleosoma son un marcador para LES. Los anticuerpos anti-histona son característicos de Lupus inducido por fármacos, mientras que los anticuerpos anti-SSA y anti-SSB/La están asociados con Lupus eritematoso neonatal y la fotosensibilidad (Cozzani E et al, 2014). El papel patogénico de los autoanticuerpos en LES ha sido estudiado tanto en humanos como en modelos animales, y se ha observado que los autoanticuerpos participan en el daño en diferentes órganos. La participación de los autoanticuerpos en la patogénesis de LES se ha observado en Nefritis Lúpica y disfunción neuropsiquiátrica. (Rekvig OP et al, 2012).

Citocinas y las diferentes familias de Interferones

Recientemente diferentes estudios han revelado la participación de diversas citocinas en la patología de LES (Mikita N et al, 2011) y se sabe que las citocinas tienen un papel importante tanto en la etiología y en la patogénesis de LES (Niewold TB et al, 2010). Las citocinas son pequeños mediadores solubles producidos por células del sistema inmune y tejidos. Las citocinas median respuestas biológicas, incluyendo la respuesta inmune innata y adaptativa, y tienen un papel importante en la diferenciación, maduración y activación de varias células inmunes (Mikita N et al, 2011).

Familia de Interferones tipo I

Un ejemplo de una importante citocina involucrada en la etiología y patogénesis en LES es el Interferón alfa (IFN- α) (Niewold TB et al, 2010). El IFN- α es miembro de la familia de Interferones tipo I. Hasta el momento se conocen tres familias de Interferones (IFNs): Interferones tipo I (IFN- α el cual incluye 13 subespecies, IFN- β , IFN- ω y otros subtipos menos comunes), tipo II (IFN- γ) y los tipo III: IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 3, también referidos como interleucina IL-29, IL-28A e IL-28B respectivamente (Obermoser G et al, 2010; Donnelly RP et al, 2010; Rönnblom L et al, 2011).

La familia de los IFNs de tipo I comprende a los productos proteicos de múltiples genes codificados en el brazo corto del cromosoma 9.8 (Crow MK 2010). La clasificación de los IFNs se basa en las características estructurales, en el receptor que usan y en su actividad biológica (Donnelly RP et al, 2010).

Los IFNs de tipo I tiene un papel importante en la inmunidad innata así como también en la respuesta contra las infecciones virales (Onoguchi K et al, 2007). El IFN- α es una molécula clave en la regulación inmune, es producido por múltiples células en respuesta a las infecciones virales. Se ha demostrado que diferentes células pueden producir pequeñas cantidades de IFN- α cuando son estimuladas con ciertos virus RNA (Rönnblom L et al, 2011). Sin embargo, las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) tienen un papel especial en la producción de IFN- α . Las pDCs son la principal fuente de IFN en suero y representan al principal tipo de célula capaz de producir niveles elevados de IFN- α (Obermoser G et al, 2010; Crow MK 2010; Rönnblom L et al, 2011).

Uno de los principales mecanismos a través del cual IFN- α es producido es a través de la señalización de los receptores tipo Toll (TLR). Las pDCs expresan en la membrana endosomal principalmente los TLR7/9 y estas células pueden ser activadas por los patógenos que invaden las pDC a través de endocitosis mediada por receptores. Además, las pDC expresan el factor regulador de Interferón (IRF5 e IRF7) lo cual facilita su mayor capacidad de producir IFN- α y otras citocinas inflamatorias (Rönnblom L et al, 2011).

El IFN- α ejerce su actividad biológica a través de su receptor heterodimérico, este receptor está formado por la cadena IFN- α R1 (IFNAR1) y la cadena IFN- α R2 (IFNAR2) (Donnelly et al, 2010). La unión de IFN- α con su receptor activa la vía de señalización de JAK-STAT, lo cual conlleva a la expresión de los genes inducidos por IFN (ISGs). Después de la unión de IFN- α con la cadena IFN- α R1 se activa la vía JAK-STAT. Las quinasas activadas reclutan y fosforilan los factores de transcripción STAT1 y STAT2, generando la unión con el factor regulador de IFN 9 (IRF-9). El complejo formado por STAT1/ STAT2/ IRF-9 se trasnloca la núcleo donde se une a los elementos de respuesta estimulados

por IFN (ISREs) y activa la transcripción de los ISGs (Figura 2) (Rönnblom L et al, 2011).

Familia de Interferones tipo III

Los Interferones de tipo III también llamados IFN- λ s son un nuevo tipo de citocinas que fue inicialmente reportados por dos grupos independientes (Donnelly RP et al, 2010; Zheng YW et al, 2013). Los genes de los IFN- λ están agrupados en el cromosoma 19 (región 19q13.13). El gen de IFN- λ 3 (IL28B) es transcrito en dirección opuesta de los genes de IFN- λ 1 (IL29) e IFN- λ 2 (IL28A). Además la región codificante de cada uno de estos genes está dividido en 5 exones. El IFN- λ 2 e IFN- λ 3 son codificados por dos genes diferentes los cuales están estrechamente agrupados. Los genes de IFN- λ 2 e IFN- λ 3 comparten alrededor del 96% de homología en la secuencia de la proteína (Donnelly RP et al, 2010).

La expresión de IFN- λ s pueden ser inducida por un amplio espectro de estímulos, tales como diferentes virus y agonistas de los receptores TLR (Zheng YW et al, 2013; Witte K et al, 2010). Las principales células productoras de IFN- λ s son los monocitos, mastocitos y células epiteliales (Zheng YW et al, 2013). Además los IFN- λ son secretados por las PBMC así como también por las células dendríticas que son estimuladas con lipopolisacárido (Wu Q et al, 2011).

Los IFN- λ se unen y señalizan a través de un receptor heterodimérico (IFN- λ R). El receptor de IFN- λ está formado por la cadena IFN- λ R1 la cual es específica de IFN- λ y la cadena IFN- λ R2 la cual es compartida con IL-10, IL-22 y IL-26 (Zheng YW et al, 2013).

La unión inicial de IFN- λ a la cadena de IFN- λ R1, causa un cambio conformacional, que facilita el reclutamiento de la segunda cadena (IFN- λ R2) al complejo. Una vez ensamblado del complejo del receptor, las tirosina-quinasas Jak1 y Tyk2 asociadas al receptor median la trans-fosforilación de las cadenas del receptor, generando motivos peptídicos conteniendo fosfotirosina en el dominio intracelular de la cadena IFN- λ R1. Estos motivos se anclan de manera transitoria a las proteínas STAT citosólicas, específicamente STAT1 y STAT2 (Donnelly RP et al, 2010).

La señalización a través del receptor para IFN- λ resulta en el acoplamiento del factor de transcripción ISGF3. El ISGF3 está formado por STAT1, STAT2 e IRF-9 (Factor regulador de Interferón- 9); una vez ensamblado, ISGF3 se trasloca al núcleo donde se une a los diferentes elementos génicos de respuesta a interferones (Figura 2) (Donnelly RP et al, 2010).

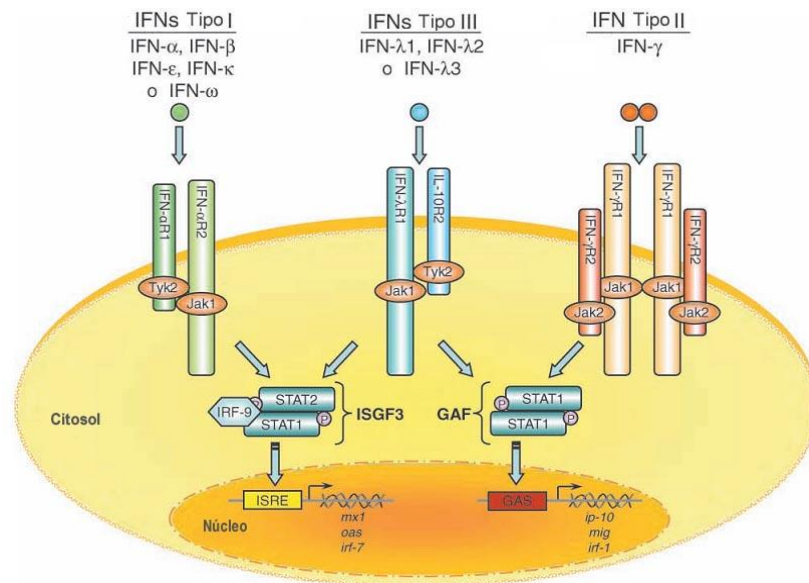


Figura 2. Modelo de señalización de los IFN tipo I e IFN- λ . Los Interferones tipo I, tipo II y tipo III se unen a complejos de receptores distintos en la membrana celular. La transducción de señales activada por la unión de los IFNs a su receptor induce la expresión de los genes estimulados por Interferón. Modificado de Donnelly RP et al, 2010.

Participación de diferentes citocinas e Interferones en LES

La familia de IFNs tipo I y especialmente los subtipos de IFN- α están implicados en la patogénesis de LES (Petri M et al, 2013). Uno de los principales mecanismos a través de los cual se produce IFN- α es a través de la señalización de los receptores tipo Toll. En los pacientes con LES los complejos inmunes pueden estimular la producción de IFN- α , debido a que el RNA que se encuentra en los complejos inmunes puede promover la producción de IFN- α a través de la estimulación de TLR7 (Barrat FJ et al, 2005).

Actualmente se han identificado casos en los que los pacientes con LES tiene elevados niveles de IFN- α en suero, además los niveles de IFN correlacionaron positivamente con la actividad de la enfermedad y con los títulos

de los anticuerpos anti-dsDNA (Dall'Era MC et al, 2005). Por otra parte se ha observado que los niveles elevados de IFN de tipo I y de las quimiocinas inducidas por IFN de tipo I se asocian con una mayor actividad de la enfermedad (Bauer JW et al, 2009). Interesantemente, se ha observado los transcritos de los ISGs se encuentran significativamente sobre-expresados en las células de sangre periférica de pacientes pediátricos y adultos con LES (Obermoser G et al, 2010).

Adicionalmente existe la evidencia de que IFN- α puede tener un papel patogénico en el desarrollo de LES, ya que en algunos pacientes con infecciones crónicas, Melanoma o Hepatitis C tratados con IFN- α , desarrollan síndrome similar al LES (Obermoser G et al, 2010; Elkon KB et al, 2011). Además el tratamiento con IFN- α ha sido asociado con el desarrollo de auto-anticuerpos (Petri M et al, 2013).

Por otra parte los estudios de asociación genética (GWAS) en pacientes con LES han identificado diferentes genes que son componentes de la vía de señalización de los IFNs tipo I. Particularmente se incluye el factor de transcripción denominado transductor de señales y activador de la transcripción 4 (STAT4) y al factor regulador de Interferón 5 (IRF5) (Obermoser G et al, 2010). Además de esto los primeros estudios de expresión genética con microarreglos en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con LES demostraron la sobreexpresión de la firma del Interferón (Baechler EC et al, 2003).

La participación de IFN- α en LES ha sido estudiada en ratones NZB congénicos que carecen de cadena IFNAR1 del receptor de IFN- α/β , el receptor común para las múltiples especies de IFN- α/β . Los ratones NZB deficientes del receptor IFN- α/β muestran atenuación de las manifestaciones de la enfermedad, incluyendo glomerulonefritis, mortalidad, niveles de anticuerpos IgG anti-dsDNA (Santiago-Raber et al, 2003). Por otra parte, la administración exógena de IFN- α/β a los ratones NZB y NZB/W acelera la progresión y severidad de la enfermedad (Adam C et al, 1980). Adicionalmente, cuando los agentes que inducen la producción de IFN tipo I se inyectan en ratones propensos a Lupus, se observa la enfermedad más severa (Hasegawa K et al, 2003). Por lo tanto, los diferentes

subtipos de IFN- α han sido identificados como un objetivo potencial para el desarrollo de fármacos en LES (Yao Y et al, 2009).

Sifalimumab es un anticuerpo monoclonal anti-IFN α , el anticuerpo se une y neutraliza a los diferentes subtipos de IFN- α , previniendo de esta manera la señalización a través del receptor de IFN de tipo I. En un estudio controlado de fase I en pacientes con LES, se evaluó la utilidad clínica y la seguridad de Sifalimumab. Este estudio sugiere que el bloqueo terapéutico de la vía de IFN- α se asocia con una disminución de los índices de actividad Lúpica así como también con la frecuencia de brotes de actividad y requerimiento de inmunosupresores. Este hallazgo muestra el papel patogénico de la vía de IFN tipo I en LES (Merril JT et al, 2011).

El papel patogénico de IFN de tipo I en LES está mediado en parte por su capacidad para inducir activación inmune, incluyendo un bucle positivo de retroalimentación que induce la maduración de las células plasmáticas y aumenta la formación de autoanticuerpos. Por otra parte, el papel patogénico de los IFNs de tipo I en LES también podría deberse a su capacidad para inducir directamente efectos patógenos a nivel de los tejidos. Por ejemplo el IFN de tipo I induce directamente vasculogénesis y también puede ser responsable de la aterosclerosis prematura encontrada en los pacientes con LES (Trinchieri G 2010).

LY6E

Los genes inducidos por IFN- α (firma de IFN) han sido ampliamente estudiados en LES debido a que se ha observado un aumento en la expresión de estos genes en las células y tejidos de pacientes con LES (Rönnblom L et al, 2013). LY6E es un miembro de la familia de proteína Ly-6 cuyos genes se encuentran agrupados en el cromosoma 8. El gen de LY6E es uno de los genes inducidos por IFN- α . LY6E (timo antígeno compartido 1 [TSA-1]) es una pequeña proteína de superficie y es expresado en las células madre hematopoyéticas, en los diferentes grupos de linfocitos (T, B y células NK) y en los tejidos no linfoides incluyendo las células del hígado y de los riñones (Feng X et al, 2006).

La función de LY6E (gene inducido por Interferón) en el sistema inmune no es completamente clara, aunque se piensa que tiene funciones en la señalización celular y/o en el proceso de adhesión celular (Feng X et al, 2006). Por otra parte, se sabe que la expresión de LY6E en los túbulos proximales esta elevada en respuesta a la proteinuria, lo cual sugiere la participación de LY6E en la fisiopatología de la enfermedad renal (Nakajima, H et al, 2002).

En el estudio realizado por Feng y colaboradores cuantificaron los niveles de expresión de 5 genes inducidos por Interferón tipo I, en estos genes se incluyó a LY6E. La expresión de LY6E fue cuantificada en leucocitos de pacientes con LES, AR, Granulomatosis de Weneger y controles. Interesantemente se observó que la expresión de LY6E fue significativamente mayor en los pacientes con LES respecto a los controles. Además la expresión de LY6E fue significativamente mayor en los pacientes con LES que en los pacientes con las otras enfermedades reumáticas (Feng X et al, 2006).

Por otro lado en este estudio los niveles de expresión de LY6E se estratificaron de acuerdo al grado de actividad de la enfermedad en LES tomando en cuenta los valores del SELENA-SLEDAI: enfermedad inactiva (0-4), enfermedad activa (5-12) y enfermedad severa (>12). La expresión de LY6E fue significativamente mayor en los pacientes con enfermedad severa y activa comparado con los pacientes con la enfermedad inactiva (Feng X et al, 2006). En el estudio de Feng X y colaboradores la expresión de LY6E fue estratificada considerando el grado de actividad de Nefritis Lúpica. Los resultados mostraron que la expresión de LY6E fue significativamente mayor en los pacientes con enfermedad renal activa comparado con los pacientes con enfermedad renal inactiva. Por otra parte la expresión de LY6E fue estratificada con base a los niveles de proteína en orina (0 o trazas, 1+ o 2+, y 3+ o 4+). La expresión de LY6E fue diferente entre los tres grupos. Los niveles de expresión de LY6E fueron significativamente mayores en el grupo de 3+ o 4+ de proteinuria comparado con los pacientes que presentaban 0 o trazas (Feng X et al, 2006).

Por otra parte en el estudio por Komatsuda A y colaboradores evaluaron niveles de expresión del mRNA de LY6E en PBMC de pacientes con LES e

individuos sanos. Los resultados mostraron que la expresión relativa del mRNA de LY6E fue mayor en los pacientes con LES comparado con los individuos sanos (Komatsuda A et al, 2008).

Cabe mencionar que en el estudio realizado por Laska MJ y colaboradores midieron la expresión de LY6E en PBMC de pacientes con LES y controles sanos. En este estudio se observó que la expresión relativa del mRNA de LY6E fue significativamente mayor en los pacientes con LES. Además la expresión del mRNA de LY6E correlaciona significativamente con la expresión del mRNA de TLR7. Este hecho sugiere que el papel del TLR7 en la patogénesis de LES puede ser a través de la producción de IFN tipo I (Laska MJ et al, 2014).

ISG15

ISG15 (gen 15 KDa estimulado por IFN) es una proteína inducida por IFN tipo I. ISG15 es un modificador de tipo ubiquitina del cual no se conoce por completo su función. Sin embargo, se sabe que fue la primera proteína de tipo ubiquitina identificada. ISG15 es sintetizado por diferentes tipos celulares y secretado por los monocitos y linfocitos. ISG15 en su forma nativa y recombinante induce la síntesis y secreción de IFN- γ (Jeon JY et al, 2010).

En diferentes estudios se ha evaluado la participación de los genes estimulados por Interferón en pacientes con LES. Por ejemplo en el estudio realizado por Huang J y colaboradores se evaluó la expresión de ISG15 en PBMC de pacientes con LES, pacientes con AR y controles. Los resultados mostraron que la expresión de ISG15 fue significativamente mayor en los pacientes con LES comparado con los controles y los pacientes con AR (Huang J et al, 2010).

En el estudio realizado por Feng X y colaboradores se evaluó la expresión de los genes inducidos por IFN incluyendo ISG15. La expresión de ISG15 se encontró elevada en los pacientes con LES comparado con el grupo control. Del mismo modo la expresión de ISG15 fue significativamente mayor en los pacientes con LES comparado con los con pacientes AR y Granulomatosis de Weneger (Feng X et., al 2006).

Quimiocina IP-10 (CXCL10)

Las quimiocinas constituyen un grupo de citocinas de pequeño tamaño (8-12 KDa) con propiedades quimiotácticas (Yu SL et al, 2012). Las quimiocinas se agrupan en función de su estructura y el arreglo de sus residuos de cisteína (Lee EY et al, 2009). Los cuatro grupos de quimiocinas son CC, C, CXC y CX₃C, donde C es una cisteína y X es el residuo de otro aminoácido (Lee EY et al, 2009).

Las quimiocinas tiene la capacidad de dirigir los movimientos celulares necesarios para iniciar la respuesta inmune de las células T, reclutar leucocitos a los sitios de inflamación y regular la polarización de los linfocitos Th1 y Th2 (Yu SL et al, 2012). Recientemente algunos estudios muestran que las quimiocinas y sus receptores están involucrados en la regulación del tráfico de leucocitos a los órganos y el sitio de inflamación. Algunos de los receptores de quimiocinas que han mostrado participar en el tráfico de leucocitos son: CXCR3, CXCR4, CXCR5, CCR5, CCR6, CCR7 y CCR9. En pacientes con LES y AR la inflamación crónica conduce a la modulación de la expresión de los receptores de las quimiocinas en las células B (Henneken M et al, 2005). Lo que sugiere el papel de las quimiocinas y sus receptores en la fisiopatología de enfermedades autoinmunes como Artritis Reumatoide, esclerosis múltiple y LES (Yu SL et al, 2012).

En un estudio realizado con pacientes con LES, se identificaron varias citocinas quimiotácticas reguladas por IFN, las cuales estaban en concentraciones elevadas en el suero de pacientes con LES. Los niveles de estas quimiocinas correlacionaron significativamente con la actividad de la enfermedad y algunos parámetros de pruebas de laboratorio (VSG elevada, bajos niveles de complemento, presencia de anticuerpos anti-dsDNA) (Bauer JW et al, 2009).

La quimiocina IP-10 (CXCL10) también conocida como proteína inducida por Interferón gamma, es miembro de la familia de quimiocinas CXC. IP-10 es secretada por PBMC, fibroblastos, células endoteliales (Yu SL et al, 2012), monocitos, neutrófilos, queratinocitos, células dendríticas y astrocitos (Lee EY et al, 2009). IP-10 tiene actividad quimiotáctica principalmente en las células Th1 activadas, participa en la perpetuación de la respuesta inflamatoria crónica

promoviendo la migración de los monocitos, linfocitos T y células Natural Killer (NK) a los órganos y tejidos blanco (Wu Q et al, 2011).

La quimiocina IP-10 es una citocina de respuesta a IFN y su producción es inducida en la células dendríticas por IFN- α 2 (Padovan E et al, 2002). IP-10 se une a su receptor CXCR3 y actúa a través de la activación de la vía de señalización Jak/STAT. El receptor de IP-10 se encuentra principalmente en células endoteliales y fibroblastos (Dominguez-Gutierrez PR et al, 2014). La quimiocina IP-10 tiene un papel importante en la inducción y perpetuación de la respuesta inflamatoria crónica (Padovan E et al, 2002).

Recientemente se reportó un estudio realizado en pacientes con LES en el cual se evaluaron los niveles de expresión de IP-10 en donadores sanos, pacientes con LES activo (SLEDAI > 4) e inactivo (SLEDAI \leq 4). Los resultados mostraron que los niveles de IP-10 fueron significativamente elevados en los grupos con LES activo y con LES inactivo comparado con los donadores sanos. Sin embargo, en este estudio no se observó diferencia significativa en los niveles de expresión de IP-10 entre los grupos de LES activo e inactivo (Dominguez-Gutierrez PR et al, 2014). Por otra parte en esta cohorte de pacientes se evaluó la correlación de los niveles de IP-10 con los anticuerpos anti-dsDNA. El grupo de pacientes con LES fue dividido en anti-dsDNA (+) y anti-dsDNA (-). Se observó que la quimiocina IP-10 estuvo significativamente elevada en el grupo de pacientes con LES anti-dsDNA (+) y en el grupo de anti-dsDNA (-) respecto con los donadores sanos (Dominguez- Gutierrez PR et al, 2014).

En el estudio realizado por Kong KO y colaboradores evaluaron los niveles de IP-10 en suero de pacientes con LES y donadores sanos. En esta cohorte de pacientes con LES se cuantificó el grado de actividad de la enfermedad tomando en cuenta el valor de SLAM-R (The revised SLE Activity Measure). El grupo de pacientes con LES fue dividido en cuatro grupos (inactivo, leve, moderada, enfermedad severa) considerando el valor de SLAM-R. En este estudio se observó que los niveles de IP-10 fueron significativamente mayores en los grupos de LES. Además la concentración de IP-10 en pacientes con LES se cuantifico en un

periodo de 4- 21 meses. Se observó una correlación entre la concentración de IP-10 en suero con el cambio de la actividad de la enfermedad (Kong KO et al, 2009).

Polimorfismo de nucleótido único (SNP) rs12979860

Un polimorfismo de nucleótido único (SNP) es una variación genética que está presente en al menos 1% de la población. Es decir es una variación en la secuencia de DNA que afecta una sola base de una secuencia del genoma, se sabe que en el genoma humano hay alrededor de 2 millones de SNPs.

Recientes estudios de asociación de genoma completo (GWAS) identificaron el polimorfismo de nucleótido único rs12979860 cerca del gen de IL28B (*IFN-λ3*). El SNP rs12979860 se encuentra a 3 Kb río arriba del gen que codifica a IL28B en el cromosoma 19 en la posición 19q13.13 este SNP en una región no codificante. El SNP rs12979860 posee tres genotipos: TT, CT y CC (Figura 3) (Ge D et al, 2009).

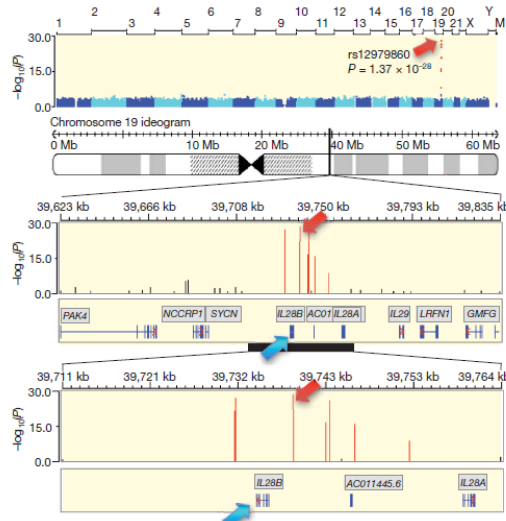


Figura 3. Visión general del cromosoma 19 y ubicación del SNP rs12979860. El panel superior muestra una vista de todo el genoma. Los paneles siguientes muestran todos los SNPs en la región de importancia y las estructuras de los genes circundantes. El SNP que se asocian con la respuesta viral sostenida se encuentra marcado en rojo. El polimorfismo rs12979860 (flecha roja) se encuentra 3 kb río arriba del gen que codifica IFN-λ3 (IL28B, flecha azul). Modificado de Ge D et al, 2009.

La frecuencia de los alélica del SNP rs12979860 de IL28B en la población fue reportada en el Proyecto de 1000 genomas. El proyecto de 1000 genomas reporto que la frecuencia del alelo fue de T y C fue de 34 % y 66 % respectivamente. En la población americana la frecuencia del alelo T y C fue de 44 % y 56 % respectivamente (Figura 4).

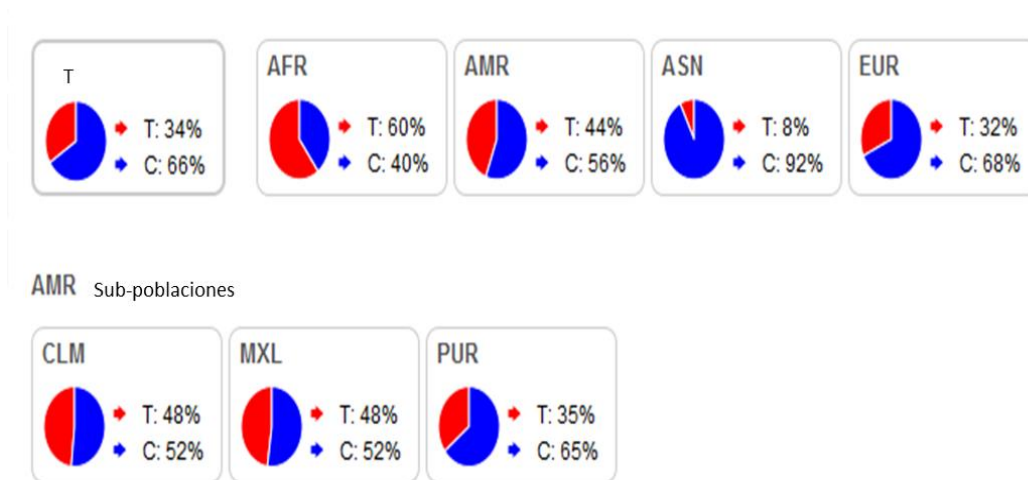


Figura 4. Frecuencias alélicas del SNP rs12979860 de IL28B. Frecuencias alélicas encontradas en la primera etapa del Proyecto 1000 genomas. T, todos los individuos de la primera etapa del proyecto; AFR, individuos africanos; AMR, individuos americanos; ASN, individuos del este de Asia; EUR; individuos europeos; CLM; individuos colombianos de Medellín Colombia; MXL, individuos de ascendencia mexicana de Los Ángeles EEUU; PUR, individuos puertorriqueños. Modificado del sitio Web: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=19:39247647-39248647;v=rs12979860;vdb=variation;vf=9236436.

En el proyecto de 1000 genomas se analizó la frecuencia de los alelos del SNP rs12979860 en población americana fue analizada en las sub-poblaciones: colombianos de Medellín, Colombia, individuos de ascendencia mexicana de los Ángeles EEUU y puertorriqueños (Figura 4), en la tabla 2 se muestran las frecuencia de los alelos y genotipos del SNP rs12979860 de IL28B.

Tabla 2. Frecuencias alélicas y frecuencia de los diferentes genotipos del SNP rs12979860 de IL28B en población mexicana.

Población	Alelo C	Alelo T	Genotipo C C	Genotipo C T	Genotipo T T
1000GENOMES: Población Total	0.661	0.339	0.471	0.380	0.149
1000GENOMES: Población CLM	0.517	0.483	0.267	0.500	0.233
1000GENOMES: Población MXL	0.523	0.477	0.258	0.530	0.212
1000GENOMES: Población PUR	0.645	0.355	0.400	0.491	0.109

AMR, individuos americanos; CLM; individuos colombianos de Medellín Colombia; MXL, individuos de ascendencia mexicana de Los Ángeles EEUU; PUR, individuos puertorriqueños. Modificado del sitio Web: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=19:39247647-39248647;v=rs12979860;vdb=variation;vf=9236436.

La prevalencia de los genotipos de las variantes genéticas del SNP rs12979860 de IL28B se determinó en una cohorte de pacientes mexicanos con infección crónica por virus de Hepatitis C (VHC). La distribución de los genotipos de las variantes del SNP rs12979860 en 350 pacientes con VHC fue: 18% (64) de portadores de TT, 60% (210) de CT y 22% (76) de CC. El genotipo CT del SNP rs12979860 es el de mayor prevalencia entre los pacientes con infección con crónica por VHC, el genotipo CC fue el de menor frecuencia en esta población de estudio (Ávalos MR et al, 2011).

Recientemente el estudio de Lalle E y colaboradores se reportó la posible relación de los genotipos del SNP rs12979860 y la expresión del receptor 1 de IFN- α (IFNAR-1) en pacientes infectados con el VHC, en este estudio también se explora la posible participación del IFN- λ (Lalle E et al, 2014). En el estudio de Lalle E y colaboradores cuantificaron los niveles de expresión del mRNA del IFNAR-1 en PBMC de pacientes infectados con VHC, siendo las PBMC estimuladas con IFN- α . Cabe mencionar que los pacientes portadores del genotipo CC mostraron significativamente mayores niveles de del mRNA del IFNAR-1 en las PBMC sin estímulo con IFN- α comparado con los pacientes portadores de los genotipos CT/TT. Los niveles de expresión del mRNA del IFNAR-1 en PBMC se encontraron significativamente mayores después de la exposición a IFN- α , la

principal diferencia en la expresión del mRNA del IFNAR-1 se observó en los pacientes portadores del genotipo CC y TT (Lalle E et al, 2014). En el estudio previamente mencionado también se evaluó el posible papel del IFN- λ en la expresión del mRNA de IFNAR-1 en PBMC de donadores sanos los cuales eran portadores de los diferentes genotipos del SNP rs12979860, en este experimento las PBMC fueron expuestas a 10 o 100 ng/ ml de IFN- λ 2 recombinante. La expresión basal del mRNA de IFNAR-1 en donadores sanos fue significativamente mayores que en los pacientes infectados con el VHC (Lalle E et al, 2014).

Asociación de diferentes SNP en pacientes con LES

Actualmente se sabe que los factores genéticos desempeñan un papel importante en el desarrollo de LES. La comprensión de las bases genéticas de LES ha avanzado debido a los estudios de asociación de genoma completo GWAS (Genome-wide association studies). Los estudios genéticos en pacientes con LES en varias poblaciones del mundo han identificado diferentes loci de susceptibilidad y se sabe que se asocian con LES (Kariuki SN et al 2015). La mayoría de los genes asociados a LES participan en vías implicadas en la patogénesis de LES, tales como el procesamiento de complejos inmunes, señalización de los receptores tipo Toll, producción de IFN tipo I. Además se ha demostrado que existen loci de susceptibilidad con funciones desconocidas en la patogenia de LES (Cui Y et al 2013). Por otra parte también se ha reportado que algunas variaciones genéticas que están asociadas con la susceptibilidad a LES, se asocian con el incremento de actividad de la vía de IFN- α en los pacientes con LES, lo cual sustenta la idea de que estos loci son de ganancia de función en los humanos (Kariuki SN et al 2015). Las variaciones genéticas que se asocian con el incremento de la actividad de la vía de IFN- α incluyen a variantes genéticas de IRF5, IRF7 (Kariuki SN et al 2010).

Justificación

La participación de los IFN de tipo I ha sido ampliamente estudiada en LES y diferentes estudios muestran que los IFN de tipo I especialmente el IFN- α y los genes inducidos por los mismos participan en la patogénesis de LES. También se sabe que la vía de IFN- α se encuentra elevada en los pacientes con LES. Se ha demostrado que el bloqueo terapéutico de la vía de IFN- α se asocia con una disminución tanto en los índices de actividad de la enfermedad como en la expresión de los ISGs. Por otra parte los estudios en pacientes con VHC muestran que el SNP rs12979860 de IL28B modula la respuesta al tratamiento con IFN- α . La participación del SNP rs12979860 no ha sido estudiada en LES, aún no se ha establecido si los genotipos de IL28B afectan la respuesta a IFN- α en LES. Considerando tanto que esté SNP se asocia con la respuesta a IFN- α y que en los pacientes con LES la vía de IFN- α está elevada, es posible que el SNP rs12979860 pueda modular la respuesta a IFN- α en LES. En este estudio nos enfocamos a evaluar la respuesta a IFN- α en pacientes con LES mediante la cuantificación de los niveles en suero, en sobrenadante y la expresión relativa de IP-10, debido a que esta quimiocina pertenece a ISGs, ya que el SNP rs12979860 regula la respuesta a IFN- α a pesar de estar localizado cerca del gen de IL28B.

Hipótesis

- El polimorfismo rs12979860 de IL28B modula la respuesta a IFN- α en Lupus eritematoso sistémico.

Objetivos

Objetivo General

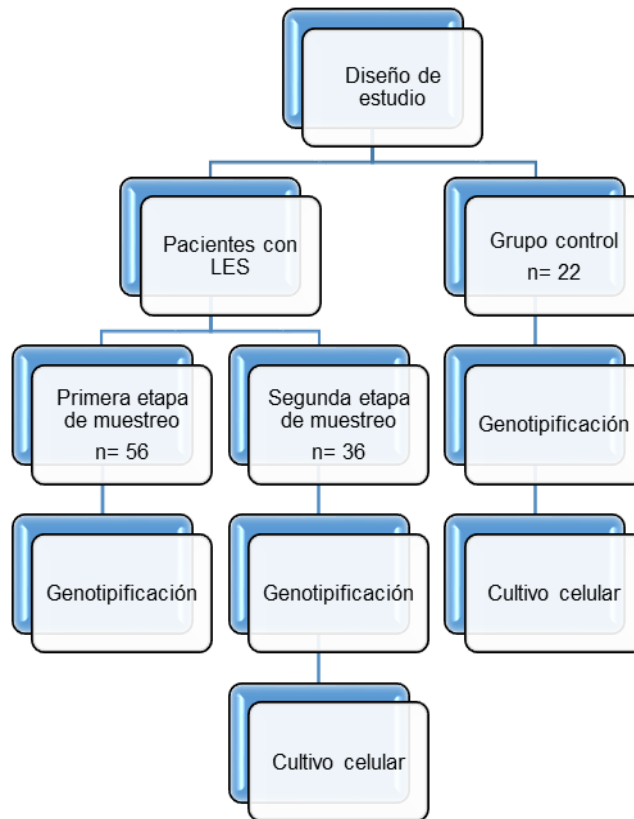
- Explorar el papel del polimorfismo rs12979860 de IL28B en Lupus eritematoso sistémico: asociación con variables clínicas y respuesta a interferón alfa.

Objetivos específicos

1. Determinar las frecuencias alélicas del polimorfismo rs12979860 de IL28B en pacientes mexicanos con LES.
2. Determinar la asociación del SNP rs12979860 de IL28B con las variables clínicas e índices de actividad clínica de LES.
3. Determinar la asociación del SNP rs12979860 de IL28B con la concentración sérica de IP-10 (CXCL10) en pacientes con LES.
4. Determinar la asociación del SNP rs12979860 de IL28B con la secreción de IP-10 (CXCL10) en cultivo de células mononucleares periféricas de pacientes con LES estimuladas con Interferón Alfa recombinante.
5. Determinar la asociación del SNP rs12979860 de IL28B con los niveles de expresión del mRNA de genes de la firma de interferón IP-10 (CXCL10), LY6E y ISG15 en cultivo de células mononucleares periféricas de pacientes con LES estimuladas con Interferón Alfa recombinante.

Materiales y métodos

Para el desarrollo de este trabajo se realizó un estudio observacional y experimental. Se colectaron muestras de sangre de pacientes con diagnóstico establecido de LES que asistieron al departamento de Reumatología y Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICh). Este trabajo se dividió en dos etapas de muestreo: el primer grupo de pacientes fue de 56 pacientes con LES, este grupo se reclutó en el departamento de Reumatología en el año 2012 y el segundo grupo de estudio consistió de 36 pacientes con LES del departamento de Nefrología (2013). Además se incluyeron 22 sujetos sanos como controles los cuales fueron reclutados en el año 2013.



Los criterios de inclusión y exclusión para la toma de muestra en los pacientes con LES y controles fueron los siguientes:

Criterios de inclusión para pacientes con LES

- Pacientes que acudieron a consulta al departamento de Reumatología y Nefrología del INCICH.
- Pacientes con diagnóstico confirmado de LES por los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología de 1982 (Hochberg MC et al, 1997).
- Pacientes que proporcionaron su consentimiento para la toma muestras de sangre.
- Pacientes de ambos géneros.

Criterios de exclusión para pacientes con LES

- Pacientes que no proporcionaron su consentimiento para la toma de muestra de sangre.

Criterios de inclusión para controles

- Donadores sanos sin antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes por el departamento de Inmunología del INCICH.
- Donadores sanos que dieron su consentimiento para la toma de muestras de sangre.
- Ambos sexos.

Criterios de exclusión para controles

- Donadores que no dieron su consentimiento para la toma de muestras de sangre.
- Pacientes que cursen con patología autoinmune diferente a LES.

Cada uno de los pacientes que participó en este protocolo se les informo sobre el estudio así como también de los beneficios e importancia del estudio. Una vez informados los pacientes recibieron el consentimiento informado en el cual se informó a los pacientes por escrito de los procedimientos, beneficios y riesgos que conllevaba a participar en este estudio de investigación. Después de la firma del

consentimiento informado a cada uno de los pacientes se les realizó una historia clínica, cuestionarios para evaluar el grado de actividad de LES y se tomó la muestra de sangre. El índice de actividad de la enfermedad fue evaluado mediante el instrumento clinimétrico *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000* (SLEDAI-2K; Gladman, 2002).

Metodología de laboratorio

Obtención de sangre periférica

A cada uno de los pacientes con LES y controles se les extrajo mediante punción venosa antecubital 6 mL de sangre periférica en tubo con EDTA K₂ y 3.5 mL de sangre en tubo con activador de coagulación y gel de polímeros separador de suero. Las muestras de suero fueron almacenadas a – 70 °C.

Extracción de DNA y genotipificación de las variantes del SNP rs12979860 de IL28B

En un total de 92 muestras de pacientes con LES (56 muestras recolectadas en la primera etapa de muestreo y 36 muestras recolectadas en la segunda etapa de muestreo) y 22 donadores sanos se realizó el aislamiento de DNA a partir de 200 µl de sangre empleando el kit UltraClean DNA BloodSpin (*MO BIO Laboratories, Inc*). Con este kit las células son lisadas y las proteínas son degradadas en presencia de Proteinasa K. El lisado es centrifugado y pasa a través de un filtro que tiene una membrana de sílica. EL DNA se une a la membrana del filtro debido a la presencia de una sal que se encuentra en el buffer de lisis. El filtro se lava varias veces y finalmente el DNA es recuperado en un buffer de libre de DNA.

Mediante espectrofotometría de NanoDrop 1000 a una longitud de onda de 260 y 280 nm se determinó la concentración y pureza del DNA. Las relaciones 260/280 y 260/230 se utilizaron para asegurar la pureza del DNA. Se consideró una relación 260/280 mayor a 1.7 y un valor mayor a 1.0 para la relación 260/230.

El análisis de las variantes del SNP rs12979860 fue determinado en 12.5 ng/ µl de DNA genómico por PCR-tiempo real y curvas de disociación. Para la PCR-tiempo real se usaron primers de oligonucleótidos específicos y sondas de

hibridación tipo Taq-Man de acuerdo al diseño de Tib MoLBIOL GmbH. Todos los pacientes con LES y los donadores sanos fueron genotipificados como CC, CT o TT de acuerdo a las temperaturas de disociación.

Las reacciones para el análisis de las variantes del SNP rs12979860 se realizaron en equipo de PCR en tiempo real LightCycler 2.0 utilizando el equipo programado de la siguiente manera: 1 un ciclo de 10 segundos a 95 °C (desnaturalización), 45 ciclos de 10, 10 y 15 segundos a 95 °C, 60 °C y 72 °C respectivamente (amplificación), 1 ciclo de 30, 120 y 0 segundos a 95 °C, 40 °C y 70 °C respectivamente (desnaturalización) y 1 ciclo de 30 segundos a 40°C (enfriamiento).

Separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Durante la segunda etapa de muestreo se obtuvieron muestras de sangre periférica de pacientes con LES y controles, con el fin de separar las PBMC y realizar el cultivo celular. El aislamiento de PBMC se realizó a partir de 5 ml de sangre periférica, los cuales fueron obtenidos mediante punción venosa antecubital en tubo con K₂ EDTA. Las muestras de sangre fueron diluidas 1:1 con PBS estéril y separadas por gradiente de densidad utilizando Histopaque-1077 (Sigma Aldrich). Las PBMC fueron lavadas dos veces con PBS estéril y se contaron usando el método de exclusión de Azul Tripano y posteriormente fueron resuspendidas en 1 ml de medio RPMI 1640.

Cultivo de PBMC estimuladas con IFN- α recombinante

Para el cultivo celular se utilizaron las PBMC obtenidas de la separación por gradiente de densidad. Las PBMC fueron cultivadas en el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mmol/ L de L-glutamina, 100 IU/ ml de penicilina y 100 ug/ ml de estreptomina (Sigma, Ronkonkoma, NY) respectivamente.

Las PBMC se cultivaron en placas de cultivo de 24 pozos, se colocaron 1X 10⁶ células en 1 ml de medio en cada pozo por 24 horas. En el cultivo celular de PBMC hubo dos grupos de cultivo: PBMC solas (RPMI) y PBMC estimuladas con 1000 unidades/ uL de IFN- α recombinante. Después de las 24 horas los sobrenadantes libres de células fueron recolectados mediante centrifugación y

almacenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriormente determinar la concentración de IP-10 por el método de ELISA. Las PBMC fueron cosechadas y almacenadas en TriPure (Roche) para posteriormente extraer el RNA total.

Extracción del RNA

La extracción de RNA total fue realizado a partir de las PBMC obtenidas del cultivo celular empleando el reactivo TriPure (Roche) que está fundamentado en el procedimiento de extracción que emplea Tioisocianato de guanidina.

Durante el procedimiento de homogenización/lisis de la muestra, el reactivo TriPure rompe la membrana de las células y desnaturaliza a las nucleasas endógenas. La adición de cloroformo y la centrifugación separa a la muestra en tres fases: acuosa (incolora), interface blanca, y fase orgánica de color rojo. La fase acuosa se utiliza para precipitar el RNA con isopropanol. La cantidad y pureza del RNA fue determinada por absorbancia en NanoDrop 1000 a una longitud de onda de 260 y 280 nm, considerando una relación 260/280 mayor a 1.6 y una relación 230/260 mayor a 1.0.

Síntesis de DNA complementario

El RNA total obtenido a partir de la PBMC del cultivo celular se utilizó para la síntesis de cDNA. La síntesis de cDNA se realizó con el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche) utilizando hexámeros random como iniciadores para la transcriptasa inversa.

La síntesis de cDNA se realizó en reacciones de 20 μl con 500 ng de RNA, conteniendo 1 μl de random hexámero primer, 4.0 μl de buffer de reacción 5x, 2.0 μl de mezcla de dNTP 10 nM, y 0.5 μl de enzima transcriptasa reversa (Transcriptor first strand, Roche). La reacción de transcriptasa reversa se realizó en termociclador con el siguiente programa: 10 minutos a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 minutos a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 5 minutos a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

La RT-PCR se realizó para cuantificar la expresión de IP-10, ISG15 y LY6E, y se utilizó ACTB como gen de referencia. Los primers y sondas fueron diseñados utilizando el programa Roche ProbeFinder. El programa Roche ProbeFinder genera diseños que combinan iniciadores (primers) de PCR con el sistema de

sondas Universales UPL (Universal Probe Library de Roche). Las secuencias para de cada gen de interés se muestran en la tabla 3.

La RT-PCR fue realizada con Mix LightCycler 480 Probes Master (Roche) y se utilizó el equipo para PCR LightCycler 480 Roche. Cada 15 µl de PCR incluían 7.5 µl de Master Mix LightCycler 480 (Roche), 0.4 µl de primers L y R (200 µM), 120 nM de sonda de la Biblioteca de Sondas Universales Roche UPL (Tabla 2) y 4 µl de cDNA (después de la reacción de síntesis de cDNA, estos fueron diluidos 1:2 con agua grado PCR libre de DNasa y RNasa).

Las condiciones de RT-PCR consistieron de 45 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, 1 segundo a 72°C y enfriamiento de 30 segundos a 40°C. Los niveles de expresión del mRNA de los genes de interés fueron determinados mediante cuantificación relativa.

Tabla 3. Primer y sondas utilizados en RT-PCR.

Gen	Gene Bank	Primer	Tm	Sonda UPL(#)
IP-10	NM_001565.3	L gaaagcagttagcaaggaaaggt	60	34
		R gacataactccatgtagggaagtga	59	
ISG15	NM_005101.3	L gcgaactcatctttgccagta	60	23
		R ccagcatcttcaccgtcaggtc	60	
LY6E	NM_002346.2	L gccatcctctccagaatgaa	60	71
		R gcaggagaagcacatcagc	59	
ACTB	NM_001101.3	L ccaaccgcgagaagatga	60	64
		R ccagaggcgtacaggatag	59	

IP-10: Quimiocina CXCL10, proteína 10 inducida por IFN- γ ; ISG15: gen 15 inducido por IFN; LY6E; timo antígeno compartido 1 [TSA-1], ACTB: beta actina.

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Los niveles de IP-10 en suero y sobrenadantes fueron determinados por el metodo de ELISA utilizando el Kit Quantikine de R & D para esta quimiocina. Las muestras de sobrenadantes del tratamiento de 1000 U de IFN- α fueron diluidas 1:5 con el reactivo diluyente proporcionado por el kit y los sobrenadantes del tratamiento de RPMI no fueron diluidos. Para la determinación de la concentración de esta quimiocina se utilizó una curva estándar y el límite de detección en fue de 0.41-4.46 pg/ mL.

Análisis estadístico

El estudio de asociación se realizó mediante la prueba de X^2 , análisis de regresión logística y regresión lineal múltiple, en el cual se probaron dos modelos genéticos (CC,CT y TT). Los datos mostraron una distribución no paramétrica, por lo cual se emplearon las pruebas no paramétricas de U de Mann-Whitney para la comparación entre dos grupos y la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación entre más de dos grupos, para determinar si había diferencia significativa en los niveles de expresión relativa entre los grupos. Los resultados son expresados como la media \pm error estándar. Para realizar el análisis estadístico se utilizó el software SPSS ver 17 y para la prueba de hipótesis se fijó un valor de significancia < 0.05 .

Resultados

Características demográficas del grupo control y de pacientes con LES (primera y segunda etapa de muestreo) incluidos en estudio

En este trabajo se realizaron dos etapas de muestreo, durante la primera etapa se colectaron 56 muestras de pacientes con LES, las muestras fueron recabadas en el departamento de Reumatología (2012) del INCICH. La segunda etapa fue realizada en el departamento de Nefrología (2013) del INCICH en la cual se recabaron 36 muestras de pacientes con LES. Todos los pacientes fueron revisados y diagnosticados con LES tomando en cuenta los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología 1982 (Hochberg MC 1997). El índice de actividad de la enfermedad fue medido con base al valor del SLEDAI-2K. Los datos clínicos de los pacientes con LES incluyen la presencia de otras enfermedades como Diabetes mellitus, Hipertensión arterial sistémica, edad, años de evolución de la enfermedad y género. Los datos clínicos fueron obtenidos a partir de cuestionarios estandarizados que permiten recabar la información necesaria. Los datos de laboratorio incluían niveles de complemento C4 y C3, anticuerpos anti-nucleares, anti-DNA, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anti-Sm, anti-RNP, proteína C reactiva (PCR) y velocidad de sedimentación globular (VSG) (Tabla 5).

Para establecer la metodología de cultivo celular se colectaron muestras de 22 donadores sanos sin antecedentes familiares de LES u otras enfermedades autoinmunes (Grupo Control). El grupo control estuvo formado por 20 mujeres y 2 hombres, la edad promedio del grupo fue de 25 años.

Análisis del SNP rs12979860 de IL28B en el grupo control y en el grupo de pacientes con LES

Las frecuencias de los genotipos de las variantes genéticas del SNP rs12979860 fueron determinadas en ambos grupos (Tabla 4). Las frecuencias genotípicas muestran que ambos grupos se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg. La distribución de los genotipos del SNP rs12979860 en 92 pacientes con LES fueron de: 36 (39.1%) pacientes homocigotos alelo C, 43 (46.7%) pacientes heterocigotos CT y 13 (14.1%) pacientes homocigotos alelo T (Tabla 4). En el caso del grupo control la distribución de los genotipos del SNP rs12979860 de IL28B fue de 6 (31.81%) individuos portadores del genotipo CC, 9 (40.40%) CT y 6 (27.3%) TT (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución de los genotipos del SNP rs12979860 de IL28B en pacientes con LES.

	CC	CT	TT
Pacientes LES (n= 92)	36 (39.1%)	43 (46.7%)	13 (14.1%)
Donadores sanos n (%) [*]	7 (31.81)	9 (40.90)	6 (27.3)

Los valores son expresados en porcentaje.

[#]De las 22 muestras de controles solo en 15 muestras se realizó el ensayo de RT-PCR, en todas las muestras se determinó la concentración en suero y sobrenadante de IP-10.

Análisis de asociación del SNP rs12979860 de IL28B con las características clínicas de los pacientes con LES

La asociación del SNP rs1279860 de IL28B con las variables clínicas e índices de actividad clínica en los pacientes con LES se realizó para determinar si los genotipos del SNP se asocian con las características clínicas de los pacientes con LES (Tabla 5).

Tabla 5. Características basales de los pacientes con LES estratificadas de acuerdo al genotipo del SNP rs12979860 de IL28B.

	n	CC	Genotipo	
			CT	TT
Pacientes con LES	92	36	43	13
Edad, media± DE (años)	37.58±12.75	39.28±12.18	35.09±13.11	41.08±12.45
Género (Femenino/Masculino)	83/9	32/4	39/4	13/1
Años de evolución, media± DE	7.65±6.78	7.06±7.74	7.61±5.17	10.62±8.36
Diabetes Mellitus n (%)	5 (5.4)	2 (2.1)	3 (3.2)	0
Hipertensión arterial sistémica n (%)	22 (23.9)	7 (7.6)	8 (8.7)	7 (7.6)
Anticuerpos anti-nucleares n (%)	82 (23.9)	32 (34.7)	38 (41.3)	12 (13.0)
Anti-DNA n (%)	46 (50.0)	20 (21.7)	23 (25.0)	3 (3.2)
Anti Ro/SSA n (%)	36 (39.1)	13 (14.1)	17 (18.4)	6 (6.5)
Anti La/SSB n (%)	12 (13.0)	3 (3.2)	5 (5.4)	4 (4.3)
Anti-Sm n (%)	20 (21.7)	7 (7.6)	11 (11.9)	2 (2.1)
Anti-RNP n (%)	27 (29.3)	10 (10.8)	16 (17.3)	1 (1.0)
Complemento C4, media ± DE (mg/Dl)	14.5±7.2	14.3±6.9	15.6±8.2	12.5±3.9
Complemento C3, media ± DE (mg/Dl)	90.3±26.8	83.9±23.1	92.2±30.0	102.4±20.9
PCR, media ± DE (mg/L)	16.1±45.5	12.68±22.7	17.5±60.4	20.9±37.3
VSG, media ± DE (mm/h)	30.9±37.6	38.7±54.8	27.4±18.5	30.0±20.5
SLEDAI-2K, media	5.79±4.86	6.63±4.41	5.53±4.86	4.85±3.65

Los valores son expresados como media ± desviación estándar (DE). Anti-DNA, anticuerpos anti DNA de doble cadena; PCR, proteína C reactiva; VSG, velocidad de sedimentación globular.

El análisis de asociación entre el genotipo TT del SNP rs12979860 y la presencia de anticuerpos anti-DNA en pacientes con LES, mostró una asociación significativa con una menor frecuencia de los anticuerpos anti-DNA ($p= 0.038$) con un valor de OR de 0.205 (IC 95% 0.046-0.91) (Tabla 6). Por otra parte el análisis de asociación entre los genotipos del SNP rs12979860 y las diferentes características clínicas de los pacientes con LES mostró una tendencia de asociación entre el genotipo TT y los anticuerpos anti-La y anti-RNP ($p= 0.059$). También se encontró asociación significativa de una mayor frecuencia de Hipertensión arterial sistémica con el genotipo TT del SNP rs12979860 ($p=0.016$) y un valor OR de 4.696 (IC 95% 1.339-16.46).

Tabla 6. Asociación de los genotipos del SNP rs12979860 de IL28B con características clínicas de los pacientes con LES.

	n	Genotipo			OR (IC 95%)	P
		CC	CT	TT		
Pacientes con LES	92	36	43	13	-	-
Hipertensión arterial sistémica n (%)	22 (23.9)	7 (7.6)	8 (8.7)	7 (7.6)	4.696 (1.339-16.46)	0.016
Anti-DNA n (%)	46 (50.0)	20 (21.7)	23 (25.0)	3 (3.2)	0.205 (0.046-0.91)	0.038
Anti La/SSB n (%)	12 (13.0)	3 (3.2)	5 (5.4)	4 (4.3)	3.867 (0.905-16.51)	0.059
Anti-RNP n (%)	27 (29.3)	10 (10.8)	16 (17.3)	1 (1.0)	0.136 (0.15-1.24)	0.059

Los valores son expresados como media \pm desviación estándar (DE).

* $p < 0.05$ CCCT vs TT ajustada por SLEDAI y años de evolución.

$p < 0.1$ CCCT vs TT ajustada por SLEDAI y años de evolución.

Niveles de la proteína IP-10 en suero de pacientes con LES comparado con los controles

Los niveles de la proteína IP-10 fueron cuantificados en el suero de pacientes con LES (n= 36) y en el grupo control (n=22). Los resultados mostraron que los niveles de IP-10 fueron significativamente mayores en los pacientes con LES (301 ± 30 pg/mL) comparado con los controles (117 ± 8 pg/mL; $p < 0.0001$) (Figura 5). Este hallazgo se correlaciona con estudios previos en pacientes con LES en los cuales se cuantificó los niveles de IP-10 en suero. Además se realizó el análisis de correlación de la concentración de IP-10 en suero de pacientes con LES y el grado de la actividad de la enfermedad evaluado por el SLEDAI. Los resultados mostraron correlación positiva y con significancia estadística ($r = 0.447$; $p = 0.004$).

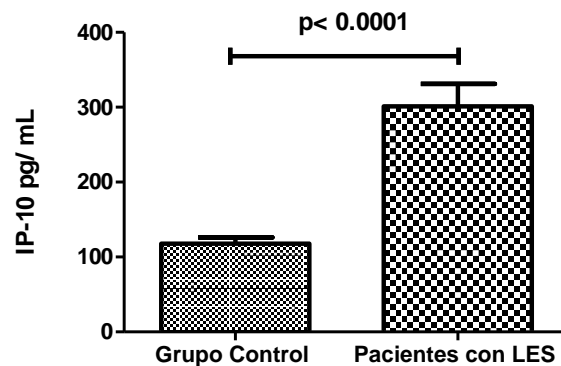


Figura 5. Niveles de IP-10 en suero de grupo control y pacientes con LES. La concentración en suero de IP-10 fue determinada en 75 μ L de suero mediante el método de ELISA utilizando una curva estándar. Los niveles de IP-10 en suero fueron determinados en 22 muestras de donadores sanos (grupo control) y en 36 muestras de pacientes con LES. Para el análisis de datos se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney, los datos muestran la media \pm error estándar.

Los niveles de IP-10 en ambos grupos fueron analizados con base a los genotipos del SNP rs12979860 de IL28B; esto para saber si los niveles de IP-10 son diferentes de acuerdo a las variantes del SNP rs12979860. Para realizar este análisis hubo dos grupos de comparación: presencia del alelo C (CC,CT) y el grupo de homocigotos del alelo T.

En el grupo control los niveles de IP-10 en suero fueron significativamente mayores en el grupo de individuos con los genotipos CC,CT (125±9 pg/mL) comparado con el grupo de individuos homocigotos del alelo T (88±12 pg/mL; $p=0.004$) (Figura 6a). Por otra parte en los pacientes con LES se observó que los niveles de IP-10 en suero fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes con homocigotos alelo T (423±73 pg/mL) comparado con el grupo de pacientes con presencia de los genotipos CC,CT (258±24 pg/mL; $p=0.015$) (Figura 6b). Estos resultados sugieren que la variación genética cerca del gen de IL28B se podrían asociar con la inducción de los genes estimulados por Interferón, como IP-10 en pacientes con LES.

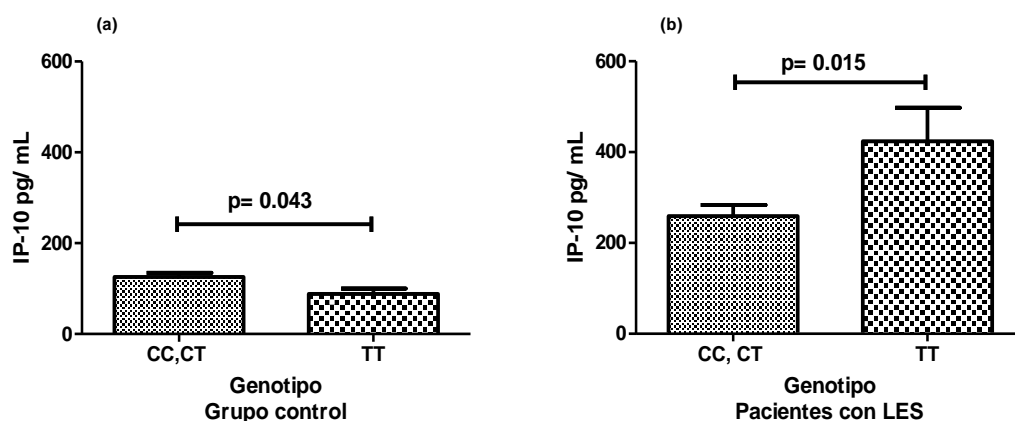


Figura 6. Niveles de la proteína IP-10 en suero de grupo control y pacientes con LES estratificados de acuerdo los genotipos del SNP rs12979860 de IL28B. La concentración en suero de la proteína IP-10 fue determinada mediante el método de ELISA en 75 μ L de suero. (a) Niveles de la proteína IP-10 en muestras de suero del grupo control en el grupo de individuos con presencia del alelo C (CC,CT; n=16) con el grupo de individuos con presencia del alelo T (n=6). (b) Niveles de IP-10 en suero de pacientes con LES en el grupo de pacientes con presencia del alelo C (CC,CT; n= 31) y en pacientes homocigotos alelo T (n= 5). Para el análisis de datos se realizó la prueba de U de Mann Whitney, los datos muestran la media \pm error estándar.

Niveles de expresión relativa del mRNA de IP-10 en grupo control y pacientes con LES

Los niveles de expresión del mRNA de IP-10 en PBMC de pacientes con LES y controles fueron medidos usando PCR en tiempo real, esto para saber si el SNP rs12979860 de IL28B modula la respuesta a IFN- α en los pacientes con LES. Los pacientes con LES (769.8 ± 227.5) tuvieron mayores niveles de inducción del mRNA de IP-10 comparado con los controles (119.2 ± 37.0 ; $p = 0.036$).

En el caso de los controles se observó que los niveles de inducción del mRNA de IP-10 en el tratamiento de 1000 U de IFN- α (90.0 ± 24.3) fueron significativamente mayores comparado con el tratamiento de RPMI (1.0 ± 0.3) (Figura 7a). Los niveles de inducción del mRNA de IP-10 en PBMC de pacientes con LES fueron mayores en el tratamiento de 1000 U de IFN- α (769.8 ± 227.5) que en el tratamiento de RPMI (0.9 ± 0.3 ; $p < 0.0001$) (Figura 7b).

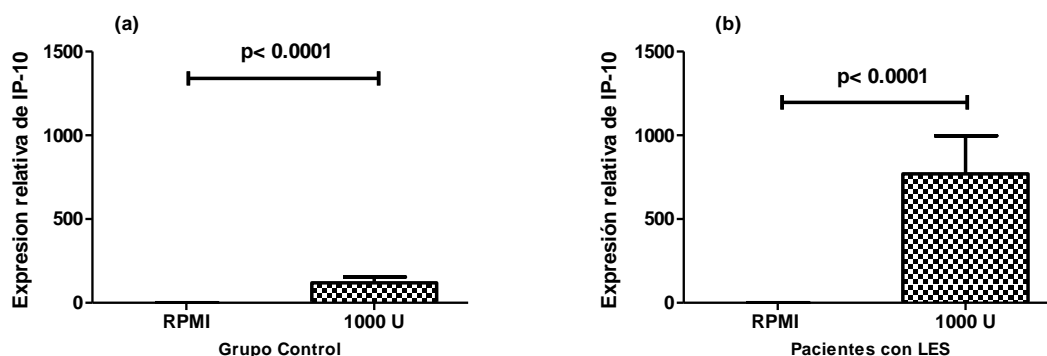


Figura 7. Niveles de inducción de la expresión de IP-10 en grupo control y pacientes con LES. Las PBMC (1×10^6) de controles y pacientes con LES fueron cultivadas con o sin IFN- α (1000 U) recombinante durante 24 horas. Después de las 24 horas la PBMC fueron obtenidas mediante centrifugación, estas células fueron utilizadas para extraer el RNA total y procesado para sintetizar cDNA. Los niveles de expresión del mRNA de IP-10 fueron cuantificados mediante PCR en tiempo real utilizando como gen constitutivo ACTB y el método de $2^{-\Delta CT}$. (a, b) Niveles de inducción del mRNA de IP-10 en 15 muestras del grupo control y 36 muestras de pacientes con LES. Los datos fueron analizados con la prueba de U de Mann-Whitney, los datos muestran la media \pm error estándar.

Los niveles de expresión de IP-10 en el tratamiento de 1000 U fueron analizados con base a los genotipos del SNP rs12979860. En el grupo control se observó que en el tratamiento de 1000 U de IFN- α recombinante los niveles de inducción del mRNA de IP-10 tienden a estar elevados en el grupo de pacientes

con el alelo T (229.7 ± 166.0) en comparación con el grupo de individuos con presencia del alelo C (100.2 ± 29.13) (Figura 8a). En el grupo de pacientes con LES se observó que los niveles de expresión de IP-10 en el tratamiento de 1000 U de IFN- α tienden a estar disminuidos en el grupo de pacientes con el alelo T (527.4 ± 227.2) comparado con el grupo de pacientes con alelo C (808.9 ± 262.2) (Figura 8b).

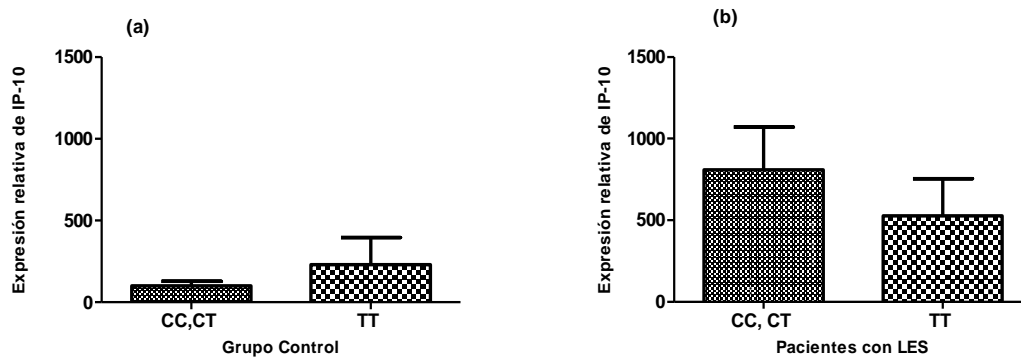


Figura 8. Niveles de inducción de la expresión de IP-10 en grupo control y pacientes con LES en el tratamiento de 1000 U de IFN- α estratificados de acuerdo a los genotipos del SNP rs12979860 de IL28B. Las PBMC (1×10^6) de controles y pacientes con LES fueron cultivadas con o sin IFN- α (1000 U) recombinante durante 24 horas. Después de las 24 horas la PBMC fueron obtenidas mediante centrifugación, estas células se utilizaron para extraer el RNA total y posteriormente sintetizar cDNA. Los niveles de expresión del mRNA de IP-10 fueron cuantificados mediante PCR en tiempo real utilizando como gen constitutivo ACTB y el método de $2^{-\Delta CT}$. (a) Niveles de inducción del mRNA de IP-10 en 12 muestras de individuos con presencia del alelo C (CC,CT) y 3 muestras de individuos con presencia del alelo T. (b) Niveles de inducción del mRNA de IP-10 en pacientes con LES (31 pacientes con presencia del alelo C y 5 pacientes con presencia del alelo T). Los datos fueron analizados con la prueba de U de Mann-Whitney, los datos muestran la media \pm error estándar.

Niveles de secreción de la proteína IP-10 en PBMC del grupo control y pacientes con LES

Los niveles de secreción de IP-10 en cultivo celular de PBMC del grupo control y pacientes con LES fueron cuantificados en el sobrenadante libre de células mediante el método de ELISA. En el caso de los controles se observó que los niveles de secreción fueron significativamente mayores en el tratamiento de 1000 U de IFN- α (548 ± 124 pg/mL) comparado con el tratamiento de RPMI (17 ± 4 pg/mL) (Figura 9a). En los pacientes con LES la secreción de IP-10 fue significativamente mayor en el tratamiento de 1000 U de IFN- α (556 ± 98 pg/mL) comparado con el tratamiento de RPMI (3 ± 0.81 pg/mL; $p < 0.0001$) (Figura 9b).

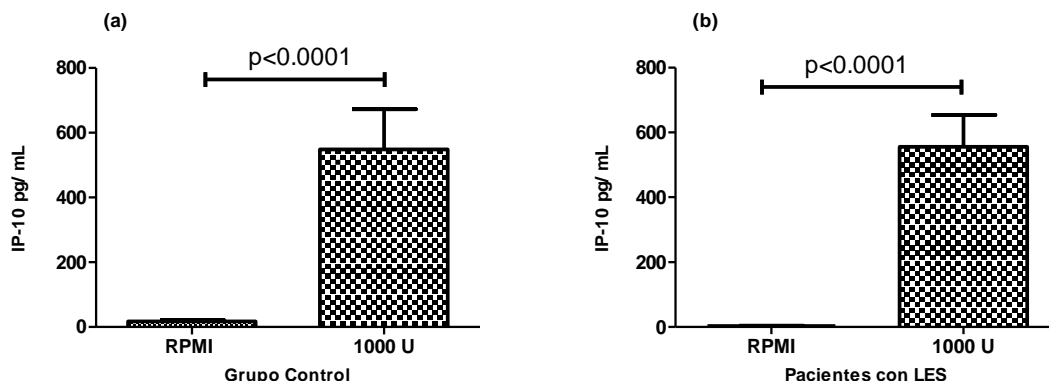


Figura 9. Secreción de IP-10 en PBMC en grupo control y pacientes estimuladas con IFN- α . Las PBMC (1×10^6 mL) fueron estimuladas con o sin 1000 U de IFN- α durante 24 horas. Después de las 24 horas los sobrenadantes libres de células fueron colectados mediante centrifugación. Los niveles de la proteína IP-10 en sobrenadante fueron cuantificados mediante el método de ELISA en 150 μ L de sobrenadante, para lo cual solo los sobrenadantes de 1000 U de IFN- α fueron diluidos 1:5 con el reactivo diluyente proporcionado por el kit. (a, b) Niveles de secreción de la proteína IP-10 en 22 muestras del grupo control y 36 muestras de pacientes con LES. Los datos fueron analizados mediante la prueba de U de Mann-Whitney, los datos muestran la media \pm error estándar.

Los niveles de secreción de IP-10 en ambos grupos fueron analizados de acuerdo a los genotipos del SNP rs12979860. La producción de IP-10 en el tratamiento de 1000 U de IFN- α del grupo control fue significativamente mayor en el grupo de individuos con presencia del alelo C (474 ± 88 pg/mL) en comparación con el grupo de individuos con el alelo T (208 ± 47 pg/mL; $p = 0.032$) (Figura 10a).

En el caso de los pacientes con LES se observó que en el tratamiento de 1000 U de IFN- α los niveles de secreción de IP-10 son significativamente mayores en el grupo de pacientes con el alelo C (587 ± 108 pg/mL) comparado con el grupo de pacientes con el alelo T (147 ± 68 pg/mL; $p = 0.037$) (Figura 10b). El análisis de estos resultados muestra una discordancia con los resultados de los niveles de IP-10 en suero, esta discordancia en los resultados puede deberse a que en el ensayo de cultivo celular se evaluó la capacidad de las PBMC de producir IP-10 después del estímulo con IFN- α .

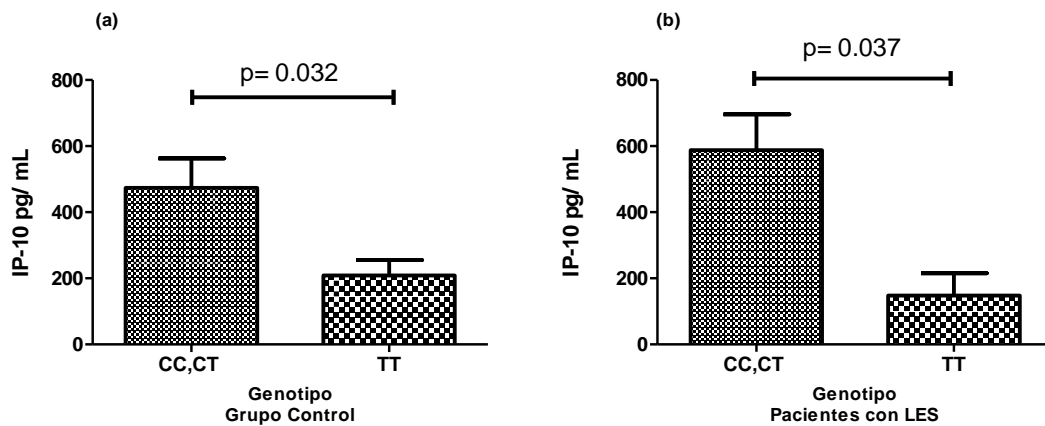


Figura 10. Niveles de secreción de la proteína IP-10 en PBMC de pacientes con LES y controles estratificados con base a los genotipos de SNP rs12979860 de IL28B. Las PBMC (1×10^6 /ml) del grupo control y de pacientes con LES fueron cultivadas con o sin IFN- α (1000 U) durante 24 horas. Los sobrenadantes libres de células fueron colectados después de las 24 horas del estímulo con IFN- α , los niveles de IP-10 fueron medidos mediante el método de ELISA en 150 μ L de sobrenadante. Para la cuantificación los sobrenadantes del tratamiento de 1000 U fueron diluidos 1:5 con diluyente proporcionado por el Kit. (a.) Producción de IP-10 en el 16 muestras de individuos con presencia del alelo C (CC,CT) y 6 muestras del grupo de individuos con el alelo T en el grupo control. (b) Producción de IP-10 en el grupo de pacientes con presencia del alelo C (CC,CT; $n = 31$) y en pacientes con presencia del alelo T ($n = 5$) en pacientes con LES, Para el análisis de estadístico se realizó la prueba U de Mann Whitney, los datos muestran la media \pm error estándar.

Niveles de expresión relativa del mRNA de los genes de la firma de Interferón

La inducción del mRNA de la firma de interferón fue cuantificada en células mononucleares periféricas estimuladas con IFN- α mediante RT-PCR. En este caso se observó que los niveles de inducción del mRNA de IP-10, ISG15 y LY6E en el tratamiento de 1000 U de IFN- α fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes con LES comparado con el grupo control (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de los niveles de inducción del mRNA de los genes de la firma de Interferón en el tratamiento de 1000 U en grupo control y pacientes LES.

	Control (n= 15)	LES (n=36)	P
IP-10	90.0 \pm 24.3	769.8 \pm 227.5	0.048
ISG15	23.4 \pm 7.5	58.3 \pm 15.8	0.019
LY6E	20.3 \pm 2.7	62.4 \pm 14.8	0.010

Se realizó la prueba de U de Mann-Whitney para comparar los niveles de inducción del mRNA de IP-10, ISG15 y LY6E en el grupo control con el grupo de pacientes con LES, los datos muestran la media \pm error estándar.

Los niveles de inducción del mRNA de IP-10, ISG15 y LY6E en el tratamiento de 1000 U de IFN- α del cultivo de PBMC en ambos grupos fueron analizados de acuerdo a los genotipos del SNP rs12979860 de IL28B, esto para saber si los niveles de inducción se modifican de acuerdo a los genotipos. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa (Tabla 8). Por lo que nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de los genes de la firma de Interferón no están asociados a los genotipos del SNP rs12979860 de IL28B.

Tabla 8. Comparación de los niveles de inducción del mRNA de la firma de Interferón tratamiento de 1000 U de IFN- α en grupo control y pacientes con LES. Los datos fueron analizados con base a los genotipos del SNP rs12979860 de IL28B.

Grupo		CC (n=6)	CT (n=6)	TT (n=3)	P
	Control n= 15	IP-10	73.8 \pm 22.8	126.5 \pm 54.1	229.7 \pm 166.0
ISG15		11.6 \pm 4.5	38.9 \pm 18.0	22.5 \pm 10.0	0.569
LY6E		19.0 \pm 3.2	25.2 \pm 6.0	17.1 \pm 3.0	0.640
Pacientes con LES		CC (n= 12)	CT (n=19)	TT (n=5)	P
	n= 36	IP-10	490.8 \pm 168.8	1010 \pm 412.2	527.4 \pm 227.2
ISG15		49.23 \pm 14.7	56.4 \pm 28.1	87.4 \pm 33.8	0.254
LY6E		47.1 \pm 10.1	76.8 \pm 27.0	44.6 \pm 18.1	0.959

Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar los niveles de inducción del mRNA de IP-10, ISG15 y LY6E en el grupo control y en el grupo de pacientes con LES, los datos muestran la media \pm error estándar.

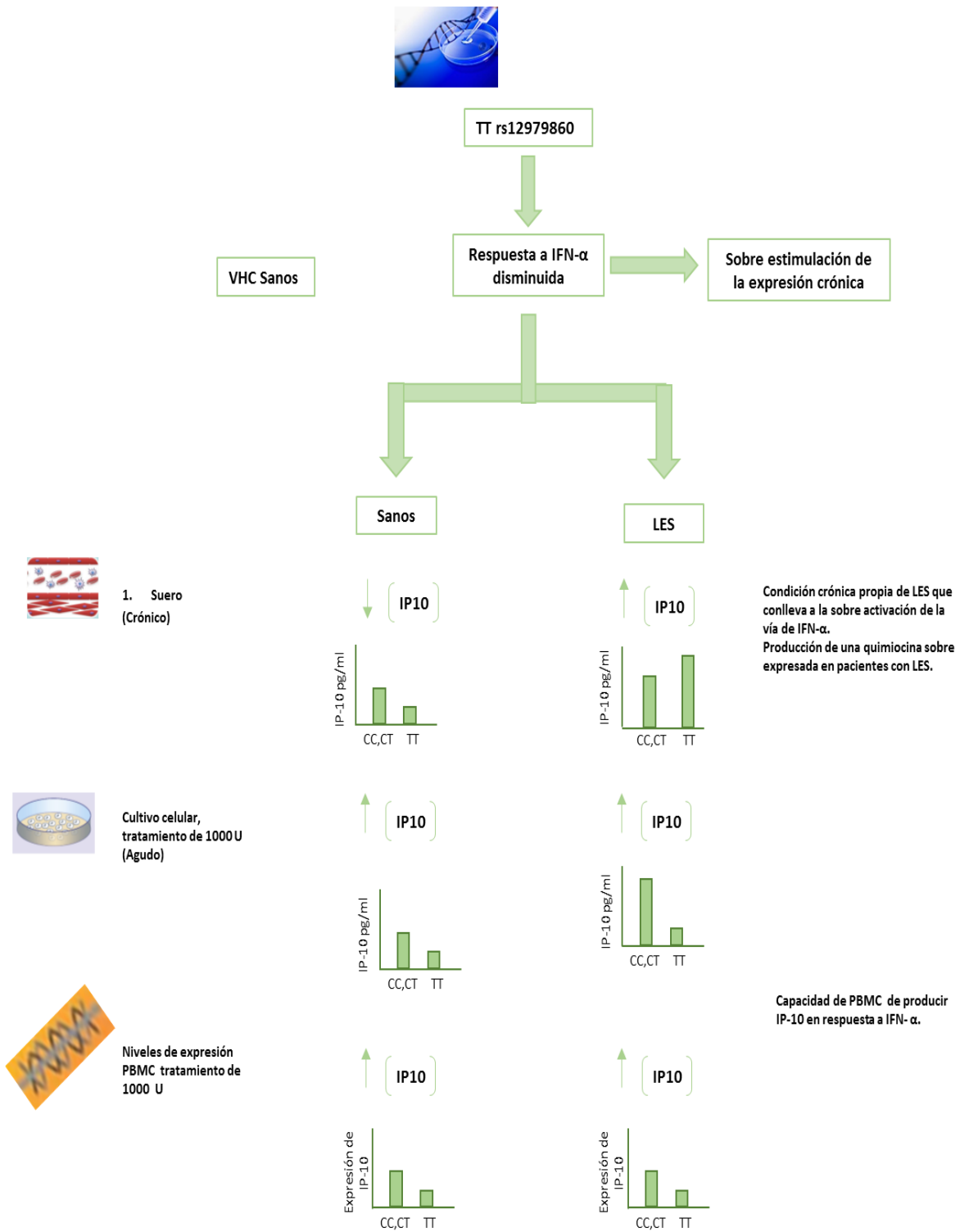


Figura 11. Visión general de los resultados obtenidos en el estudio de participación del SNP rs12979860 de IL28B.

Discusión

El LES es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por múltiples anormalidades inmunológicas, incluyendo producción de autoanticuerpos los cuales pueden llevar a inflamación y daño en tejidos (Yao Y et al, 2009). En particular el IFN- α y la respuesta al mismo participan en la fisiopatogénesis de LES. Diferentes reportes han descrito la inducción de un síndrome similar a Lupus después del tratamiento con IFN- α para Melanoma o Hepatitis C (Ronnlom LE et al, 1990; Obermoser G et al, 2010). Aunado a esto, se ha descrito que el tratamiento con IFN- α se asocia con el desarrollo de autoanticuerpos (Schilling PJ et al, 1991).

El SNP rs12979860 que se encuentra cerca del gen que codifica para IL28B (IFN- λ 3) y ya se ha reportado que predice fuertemente la respuesta endógena y exógena a IFN- α en pacientes con VHC (Ge D et al, 2009). Los resultados de la presente tesis mostraron que el SNP rs12979860 de IL28B se asocia con algunas características clínicas de los pacientes con LES así como también con la producción de la quimiocina IP-10.

Asociación de las características clínicas de los pacientes con LES con las variantes genéticas del SNP rs12979860 de IL28B

Asociación del genotipo TT del SNP rs12979860 de IL28B con autoanticuerpos

Nuestros resultados mostraron que el genotipo TT del SNP rs12979860 se asocia con una menor frecuencia de anticuerpos anti-DNA ($p= 0.038$). Aunque no sabemos a qué se podría deber esta asociación, se han relacionado a los autoanticuerpos con la vía del Interferón tipo I. Se sabe que el tratamiento con IFN- α en pacientes con enfermedades no autoinmunes induce la producción de autoanticuerpos, como los antinucleares y anti-dsDNA (Obermoser G et al, 2010). Hasta el momento no existe literatura que reporte la asociación de las variantes genéticas de este SNP con la producción de anticuerpos anti-DNA. Sin embargo, se han reportado que algunas variantes de otros SNP se asocian con la producción de anticuerpos anti-dsDNA. Los estudios de asociación genética

muestran que los SNP en la región del MHC, STAT4, IRF5, e ITGAM se asocian con los anticuerpos anti-DNA en pacientes con LES. Los hallazgos de estos estudios sugieren que los factores genéticos pueden tener influencia en la producción de anticuerpos anti-dsDNA en LES (Chung SA et al, 2011).

Nuestros resultados mostraron que los pacientes portadores de la variante TT del SNP rs12979860 de IL28 se asocia con menor presencia de anticuerpos anti-DNA. En los pacientes con LES portadores de la variante TT del SNP rs12979860, la respuesta a IFN- α podría estar disminuida generando una menor diferenciación de las células B, debido a que el IFN- α interviene en la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de autoanticuerpos, lo cual a su vez implica una mayor formación de complejos inmunes (Sifuentes Giraldo WA et al 2012). La presencia de autoanticuerpos en LES se conoce desde hace más de 60 años, aunque aún no se comprende por completo su papel patogénico. Los autoanticuerpos son característicos del LES y se sabe que están implicados en la amplificación y perpetuación de la autoinmunidad en LES (Becker-Merok A et al, 2013). Los títulos de autoanticuerpos son utilizados para detectar la actividad de la enfermedad en LES (Yung S et al, 2012), además también se podría considerar las variantes genéticas del SNP rs12979860 de IL28B para predecir los brotes de actividad de la enfermedad. Debido a que la variante TT del SNP rs12979860 de IL28B se asocia con la presencia de los autoanticuerpos anti-DNA.

A su vez nuestros resultados mostraron una tendencia de asociación entre el genotipo TT del SNP rs12979860 con la presencia de los autoanticuerpos anti-La y anti-RNP ($p < 0.1$). Los autoanticuerpos dirigidos contra las proteínas de unión del RNA (anti-La y anti-RNP) son encontrados en el suero de pacientes con LES. Además son los principales predictores de los niveles elevados de IFN- α en suero de pacientes con LES (Kariuk SN et al, 2010). Hasta el momento no se sabe el papel patogénico de los anticuerpos anti-La y anti-RNP. Se sabe que la presencia de los anticuerpos anti-La en sangre de madres de pacientes con Lupus neonatal se asocia fuertemente con Lupus neonatal y con el bloqueo cardiaco congénito. Los anticuerpos anti-La se unen en la superficie de las fibras del corazón, lo cual

sugiere que estos anticuerpos se unen en la superficie de las células del músculo cardíaco con el consecuente daño a este tejido (Cozzani E et al, 2014).

Asociación del genotipo TT del SNP rs12979860 de IL28B con Hipertensión arterial sistémica

Por otro lado, en este estudio encontramos que el genotipo TT del SNP rs12979860 se asocia con una mayor frecuencia de Hipertensión arterial sistémica (HAS; $p= 0.016$). La asociación de los genotipos del SNP rs12979860 se ha estudiado con las características bioquímicas e histológicas en pacientes con VHC. Por ejemplo se puede mencionar la asociación de los niveles en suero de Gamma-glutamil transpeptidasa (GGT) y Alanina aminotransferasa (ATL) con los genotipos del SNP rs12979860 (Agúndez JA et al, 2012). Sin embargo hasta el momento no hay literatura que mencione la asociación de los genotipos del SNP rs12979860 con la frecuencia de HAS.

En los pacientes con LES la Hipertensión es un factor de riesgo para la progresión de enfermedad renal, vascular y cardíaca. En diferentes estudios se reporta una alta prevalencia de Hipertensión en pacientes con LES. Sin embargo, en nuestra población de estudio el 23.9% de la población en estudio presentaba HAS, en contraste con otras cohortes de estudio en las que se observó que la prevalencia de la Hipertensión es del 74% (Al-Herz A et al, 2003). A pesar de que se sabe de la alta prevalencia de Hipertensión en los pacientes con LES, no se conoce por completo el mecanismo fisiopatológico de la Hipertensión en LES (Ryan MJ 2009). Se piensa que el sistema inmune y la inflamación crónica participan en el desarrollo de la Hipertensión (Boos CJ et al, 2006), además es probable que las citocinas inflamatorias y la inadecuada función renal desempeñen un papel en la patogénesis (Ryan MJ 2009). En los pacientes con LES se puede tomar en cuenta los genotipos del SNP rs12979860 para saber si los pacientes con LES desarrollaran Hipertensión, debido a que la variante genotípica TT se asocia con mayor frecuencia de la Hipertensión en LES.

Concentración de IP-10 en suero de pacientes con LES y correlación con el valor de SLEDAI

Los resultados del ensayo de ELISA mostraron que la concentración de IP-10 en suero de pacientes con LES es mayor que en el grupo control ($p < 0.0001$). Así mismo en pacientes con LES hubo una correlación positiva entre la concentración de IP-10 en suero y el valor del SLEDAI. Esto apoya las observaciones anteriores en las cuales se reporta que la concentración en suero de la quimiocina inflamatoria IP-10 está elevada en pacientes con LES comparado con los controles (Narumi S et al, 2000; Kong K et al, 2009; Bauer JW et al, 2009; Dominguez-Gutierrez P et al, 2014). Por otra parte también se ha reportado que la concentración de IP-10 correlaciona positivamente con el valor del SLEDAI (Narumi S et al, 2000; Kong K et al, 2009).

La quimiocina IP-10 tiene actividad quimiotáctica principalmente en las células Th1 y está involucrada en la patogénesis de diferentes enfermedades autoinmunes dominantes Th1 (Lee EY et al, 2009). Sin embargo, aún no se sabe el papel fisiopatogénico que la quimiocina IP-10 tiene en LES. Estudios previos sustentan la participación de IP-10 en la inmunopatogénesis de LES, ya que se ha observado que en los pacientes con LES que presentan daño renal, los niveles de IP-10 se correlacionan positivamente con el grado de actividad de la enfermedad (Lit LC et al, 2006). La elevada concentración de IP-10 en los tejidos genera un reclutamiento inadecuado de los linfocitos autoreactivos a los sitios de inflamación (Wenzel J et al, 2005; Bauer JW et al, 2006). Además IP-10 participa en la progresión de la inflamación, debido a su efecto citotóxico o secretor de mediadores inflamatorios en enfermedades autoinmunes, incluyendo a LES (Wu Q et al, 2011). Por otra parte, la elevación sistémica de las quimiocinas puede desensibilizar sus receptores expresados en los leucocitos activados, resultando en la pérdida de los mecanismos normales y en consecuencia una respuesta inflamatoria (Bauer JW et al, 2009). Cabe mencionar que se ha propuesto medir los niveles de las quimiocinas reguladas por IFN como biomarcadores de la actividad de la enfermedad en LES. Se puede considerar medir los niveles de IP-

10 en combinación con datos de laboratorio y actividad de la enfermedad, para detectar cambios en la actividad de la enfermedad.

Concentración de IP-10 en suero de pacientes con LES con base a los genotipos del SNP rs12979860 de IL28B

Por otra parte se analizaron los niveles de IP-10 en suero de ambos grupos con base a los genotipos del SNP rs12979860 de IL28B. En este sentido el genotipo TT se asoció significativamente con mayores niveles de IP-10 en comparación del grupo CC,CT ($p=0.015$), nuestros resultados soportan la observación previa de Lagging M y colaboradores, en este estudio se cuantificaron los niveles de IP-10 en plasma de pacientes con VHC. Los resultados de este estudio mostraron que los niveles de IP-10 fueron significativamente mayores en los pacientes portadores de una o dos copias del alelo de riesgo (CT,TT) comparado con los pacientes portadores del genotipo CC (Lagging M et al, 2011).

Probablemente la mayor concentración de IP-10 en los pacientes con LES portadores del genotipo rs12979860 se debe a que los niveles de expresión del receptor de IFN- α (IFNAR-1) es diferente en las variantes del SNP rs12979860. Se sabe que la expresión del receptor de IFN- α (IFNAR-1) en PBMC de pacientes con VHC es diferente de acuerdo a las variantes del SNP rs12979860 (Lalle E et al, 2014). Se podría considerar utilizar los genotipos de SNP rs12979860 y los niveles de IP-10 en conjunto con los datos clínicos de los pacientes con LES para identificar los brotes de actividad de la enfermedad.

Secreción de IP-10 en cultivo celular de PBMC estimuladas con IFN- α

Los resultados del cultivo celular mostraron que las PBMC de los dos grupos de estudio estimuladas con IFN- α producen significativamente mayores niveles de IP-10 en comparación con la producción espontánea (RPMI). Nuestros resultados soportan las observaciones previas, en las cuales se reporta que la producción en cultivo celular de IP-10 tanto en pacientes con LES y controles es elevada en respuesta a mitógenos como LPS (Lit LC et al, 2006). Interesantemente se ha reportado que la producción espontánea de IP-10 es

significativamente mayor en los pacientes con LES que en los donadores sanos (Kong KO et al, 2009). Sin embargo, nuestros resultados no muestran la misma tendencia, esta discrepancia en los resultados puede deberse a las diferencias en la gravedad de la enfermedad, así como el número de pacientes estudiados. Interesantemente en nuestro estudio observamos que el genotipo TT se asocia con menores niveles de IP-10 en el sobrenadante de cultivo de PBMC estimuladas con IFN- α recombinante, lo anterior también se observó en controles, lo cual sugiere que el genotipo TT se asocia a la respuesta de IFN- α en el cultivo. Los resultados de secreción de IP-10 en cultivo celular están en discordancia con los resultados obtenidos en la concentración de IP-10 en suero. La discordancia observada puede deberse a que en los pacientes con LES se observa una concentración elevada de IP-10 en suero. La concentración de IP-10 es producto de la actividad de la vía de IFN- α . La vía del IFN- α probablemente tiene una menor sensibilidad a IFN- α , ya que existe el antecedente de que los pacientes portadores del genotipo TT del SNP rs12979860 tienen una baja respuesta al tratamiento con IFN- α , lo cual conlleva a una sobre estimulación de la firma de IFN- α .

Firma de Interferón y asociación con los genotipos de SNP rs12979860 de IL28B

Por ultimo en este estudio seleccionamos tres genes de la firma de Interferón; ISG15, IP-10 y LY6E. La expresión de estos genes fue medida mediante RT-PCR. Los resultado de RT-PCR mostraron una la elevada expresión de los genes ISG15, IP-10 y LY6E en las PBMC de pacientes con LES estimuladas con IFN- α recombinante respecto al grupo control. Actualmente varios grupos de investigadores han demostrado a través de análisis de microarreglos que las PBMC de pacientes con LES sobreexpresan un gran número de genes inducidos por IFN (ISG), este grupo de genes ha sido caracterizado como “firma de Interferón” (Baechler EC et al, 2003; Bennett L et al, 2003). Se sabe que los Interferón de tipo I estimulan la expresión de la firma de Interferón en pacientes con LES (Kirou KA et al, 2004). Además en pacientes pediátricos con Lupus los transcritos de los genes inducidos por IFN correlacionan con la actividad de la

enfermedad y con manifestaciones clínicas de la enfermedad (Bennett L et al, 2003; Baechler EC et al, 2003).

Nuestros resultados mostraron que la expresión de LY6E es mayor en los pacientes con LES respecto al grupo control ($p= 0.010$). Estos resultados apoyan las observaciones previas de que la expresión de LY6E es significativamente mayor en pacientes con LES comparado con el grupo control (Feng X et al, 2006; Komatsuda A et al, 2008; Li QZ et al, 2010; Laska MJ et al, 2014). En el estudio de Feng X y colaboradores se reportó que la expresión de LY6E correlaciona con los niveles de IFN. Además la expresión del mRNA de LY6E fue significativamente mayor en los pacientes con Nefritis Lúpica activa comparado los pacientes con Nefritis Lúpica inactiva y sin Nefritis Lúpica (Feng X et al, 2006). Por otra parte en los estudios en los que se cuantificó la expresión del mRNA de LY6E, se observó que la expresión del mRNA de LY6E correlaciona significativamente con el mRNA del TLR7, lo cual sugiere que el papel patogénico del TLR7 en LES puede ser a través de la producción del IFN tipo I (Laska MJ et al, 2014). Cabe mencionar que un estudio realizado en modelos animales (ratones) propensos a Lupus los niveles de expresión de LY6E en linfocitos periféricos (pero no en células de origen mieloide) correlacionan positivamente con la gravedad de la enfermedad (Kumar KR et al, 2005). La función de LY6E en el sistema inmune no es completamente clara. Aunque se piensa que tiene algunas funciones en la señalización celular y/o en el proceso de adhesión celular (Feng X et al, 2006). Considerando que la expresión de LY6E es mayor en los pacientes con Nefritis Lúpica es posible utilizar la expresión de este gen como marcador de la gravedad de la enfermedad en los pacientes con Nefritis Lúpica activa e inactiva.

Los resultados de RT-PCR mostraron que la expresión de ISG15 es significativamente mayor en los pacientes con LES respecto al grupo control ($p= 0.019$). Los datos obtenidos en este estudio están en concordancia con reportes previos, los cuales informan que la expresión de los genes OAS1, OAS, MX1 e ISG15 es significativamente mayor en los pacientes con LES en comparación con los controles (Feng X et al, 2006). Diferentes estudios han reportado elevados niveles de la firma de Interferón en las PBMC de pacientes con LES. Debido a la

dificultad que representa cuantificar los niveles de IFN de tipo I en la muestras de sangre, frecuentemente se usa la expresión de los transcritos de los ISGs en PBMC como una medida de la actividad del Interferón de tipo I (Bennett L et al, 2003; Baechler EC et al, 2003; Feng X et al, 2006). Cabe mencionar que la expresión de la firma de Interferón correlaciona con la actividad de la enfermedad y con las formas clínicas de la enfermedad (Baechler EC et al, 2003; Rönnblom L et al, 2013).

Por ultimo en el presente estudio se evaluó la asociación del SNP rs12979860 con los niveles de expresión de los genes de la firma de Interferón (IP-10, ISG15 y LY6E). Sin embargo, no se encontró asociación de estos genes con las diferentes variantes genéticas del rs12979860, esto podría ser explicado por la heterogeneidad existente en el grupo de estudio.

Conclusiones

- Las frecuencias de los genotipos del SNP rs12979860 en nuestra población son similares a lo encontrado en el proyecto de 1000 genomas (individuos con ascendencia mexicana).
- En nuestra población de estudio el genotipo TT se asocia significativamente con una mayor frecuencia de Hipertensión arterial sistémica y con una menor presencia de anticuerpos anti-DNA.
- En nuestra población de estudio el genotipo TT se asocia significativamente con mayores niveles de IP-10 en suero de pacientes con LES.
- En nuestra población de estudio el genotipo TT se asocia con menores niveles de IP-10 en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares estimuladas con IFN- α recombinante. Lo anterior también se observó en controles, lo cual sugiere que el genotipo TT se asocia a la respuesta a IFN- α en cultivo celular.
- En nuestra población de estudio la expresión del mRNA de IP-10 fue significativamente mayor en el tratamiento con IFN- α (1000 U). Lo anterior se observó tanto en el grupo control como en pacientes con LES.
- En nuestra población de estudio no se encontró asociación de los genotipos del SNP rs12979860 de IL28B con la inducción del mRNA de los genes de la firma de Interferón (IP-10, LY6E e ISG15).

Perspectivas

- Para confirmar y ampliar lo encontrado en este trabajo se sugiere aumentar el número de controles y pacientes, lo que permitirá asociar los genotipos del SNP rs12979860 con diferentes grados de severidad de la enfermedad y las diversas manifestaciones clínicas.
- Estudiar si las variantes del SNP rs12979860 y los niveles de IP-10 en conjunto con los datos clínicos de los pacientes con LES podrían identificar brotes de actividad de la enfermedad.
- Analizar las variantes del SNP rs12979860 y su potencial para ser utilizadas en la predicción de HAS en los pacientes con LES, debido a que el genotipo TT se asocia con una menor frecuencia de HAS.

Bibliografía

1. Adam C, Thoua Y, Ronco P, Verroust P, Tovey M, Morel-Maroger L. The effect of exogenous interferon: acceleration of autoimmune and renal diseases in (NZB/W) F1 mice. *Clin Exp Immunol*. 1980; 40(2): 373-82.
2. Agúndez JA, García-Martin E, Maestro ML, et al. Relation of IL28B gene polymorphism with biochemical and histological features in hepatitis C virus-induced liver disease. *PLoS One*. 2012; 7(5):e37998.
3. Al-Herz A, Ensworth S, Shojania K, Esdaile JM. Cardiovascular risk factor screening in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2003; 30(3): 493-6.
4. Alvarez-Nemegyei J, Peláez-Ballestas I, Sanin LH, Cardiel MH, Ramirez-Angulo A, Goycochea-Robles MV. Prevalence of musculoskeletal pain and rheumatic diseases in the southeastern region of Mexico. A COPCORD-based community survey. *J Rheumatol Suppl*. 2011; 86: 21-5.
5. Argyrios N, Theofilopoulos, Roberto Baccala, Bruce Beutler, and Dwight H. Kono. Type I Interferons (α/β) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 307–36.
6. Ávalos MR, Dehesa VM, Sandoval SR, et al. Prevalencia de las variantes genéticas de rs12979860 de IL28B y su utilidad en la respuesta al tratamiento antiviral en pacientes con infección crónica por HCV. *Rev Gastroenterol Mex*. 2011; 76(2): 43-44.
7. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(5): 2610-5.
8. Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*. 2005; 202(8): 1131-9.
9. Bauer JW, Baechler EC, Petri M, et al. Elevated serum levels of interferon-regulated chemokines are biomarkers for active human systemic lupus erythematosus. *PLoS Med* 2006; 3: e491.

10. Bauer JW, Petri M, Batliwalla FM, et al. Interferon-regulated chemokines as biomarkers of systemic lupus erythematosus disease activity: a validation study. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(10): 3098-107.
11. Becker-Merok A, Østli-Eilersten G, Lester S, Nossent J. Circulating interferon- α 2 levels are increased in the majority of patients with systemic lupus erythematosus and are associated with disease activity and multiple cytokine activation. *Lupus.* 2013; 22(2): 155-63.
12. Beinhardt S, Aberle JH, Strasser M, et al. Serum level of IP-10 increases predictive value of *IL28B* polymorphisms for spontaneous clearance of acute HCV infection. *Gastroenterology.* 2012; 142(1): 78-85.
13. Bengtsson AA, Sturfelt G, Truedsson L, et al. Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. *Lupus.* 2000; 9(9): 664-71.
14. Bennett L, Palucka AK, Arce E, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med.* 2003; 197(6): 711-23.
15. Bibert S, Roger T, Calandra T, et al. *IL28B* expression depends on a novel TT/G polymorphism which improves HCV clearance prediction. *J Exp Med.* 2013; 210(6): 1109-16.
16. Boos CJ, Lip GY. Is hypertension an inflammatory process? *Curr Pharm Des.* 2006; 12(13): 1623-35.
17. Chung SA, Taylor KE, Graham RR, et al. Differential genetic associations for systemic lupus erythematosus based on anti-dsDNA autoantibody production. *PLoS Genet.* 2011; 7(3): e1001323.
18. Cozzani E, Drosera M, Gasparini G, Parodi A. Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects. *Autoimmune Dis.* 2014; 2014: 321359.
19. Crow MK. Interferon-alpha: a therapeutic target in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am.* 2010; 36(1): 173-86.
20. Cui Y, Sheng Y, Zhang X. Genetic susceptibility to SLE: recent progress from GWAS. *J Autoimmun.* 2013; 41: 25-33.

21. Dall'era MC, Cardarelli PM, Preston BT, Witte A, Davis JC Jr. Type I interferon correlates with serological and clinical manifestations of SLE. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64(12): 1692-7.
22. Desai SD, Reed RE, Babu S, Lorio EA. ISG15 deregulates autophagy in genotoxin-treated ataxia telangiectasia cells. *J Biol Chem.* 2013; 288(4): 2388-402.
23. Dominguez-Gutierrez PR, Ceribelli A, Satoh M, Sobel ES, Reeves WH, Chan EK. Elevated signal transducers and activators of transcription 1 correlates with increased C-C motif chemokine ligand 2 and C-X-C motif chemokine 10 levels in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2014; 23: 16(1): R20.
24. Donnelly RP, Kotenko SV. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J Interferon Cytokine Res.* 2010; 30(8): 555-64.
25. Elkon KB, Stone VV. Type I interferon and systemic lupus erythematosus. *J Interferon Cytokine Res.* 2011; 31(11): 803-12.
26. Feng X, Wu H, Grossman JM, et al. Association of increased interferon-inducible gene expression with disease activity and lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(9): 2951-62.
27. Fragoso-Loyo H, Richaud-Patin Y, Orozco-Narváez A, et al. Interleukin-6 and chemokines in the neuropsychiatric manifestations of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(4): 1242-50.
28. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature.* 2009; 461(7262): 399-401.
29. H Vallin, S Blomberg, G V Alm, B Cederblad, L RÖnnblom. Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have a circulating inducer of interferon-alpha (IFN- α) production acting on leucocytes resembling immature dendritic cells. *Clin Exp Immunol.* 1999; 115(1): 196–202.

30. Hasegawa K, Hayashi T. Synthetic CpG oligodeoxynucleotides accelerate the development of lupus nephritis during preactive phase in NZB x NZWF1 mice. *Lupus*. 2003; 12(11): 838-45.
31. Henneken M, Dörner T, Burmester GR, Berek C. Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cell from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2005; 7(5): R1001-13.
32. Huang J, Li RL, Zhu LN, Sun LY, Feng XB. Evaluating type I interferon-inducible gene expression in patients with systemic lupus erythematosus. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2010; 49(1): 45-8.
33. Jegou G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity*. 2003; 19(2): 225-34.
34. Jeon YJ, Yoo HM, Chung CH. ISG15 and immune diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1802(5): 485-96.
35. Kariuki SN, Franek BS, Kumar AA, et al. Trait-stratified genome-wide association study identifies novel and diverse genetic associations with serologic and cytokine phenotypes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12(4): R151.
36. Kariuki SN, Ghodke-Puranik Y, Dorschner JM, et al. Genetic analysis of the pathogenic molecular sub-phenotype interferon-alpha identifies multiple novel loci involved in systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*. 2015; 16(1): 15-23.
37. Kirou KA, Lee C, George S, et al. Coordinate overexpression of interferon-alpha-induced genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004; 50(12): 3958-67.
38. Komatsuda A, Wakui H, Iwamoto K, et al. Up-regulated expression of Toll-like receptors mRNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 2008; 152(3): 482-7.
39. Kong KO, Tan AW, Thong BY, et al. Enhanced expression of interferon-inducible protein-10 correlates with disease activity and clinical

- manifestations in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2009; 156(1): 134-40.
40. Kotenko SV. IFN- λ s. *Curr Opin Immunol.* 2011; 23(5): 583-90.
41. Kumar KR, Zhu J, Bhaskarabhatla M, Yan M, Mohan C. Enhanced expression of stem cell antigen-1 (Ly-6A/E) in lymphocytes from lupus prone mice correlates with disease severity. *J Autoimmun.* 2005; 25(3): 215-22.
42. Lagging M, Askarieh G, Negro F, et al. Response prediction in chronic hepatitis C by assessment of IP-10 and IL28B-related single nucleotide polymorphisms. *PLoS One.* 2011; 6(2): e17232.
43. Lalle E, Bordi L1, Caglioti C, et al. IFN-Alpha receptor-1 upregulation in PBMC from HCV naïve patients carrying cc genotype. Possible role of IFN-lambda. *PLoS One.* 2014; 9(4): e93434.
44. Laska MJ, Trolborg A, Hansen B, et al. Polymorphisms within Toll-like receptors are associated with systemic lupus erythematosus in a cohort of Danish females. *Rheumatology (Oxford).* 2014; 53(1): 48-55.
45. Lee EY, Lee ZH, Song YW. CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2009; 8(5): 379-83.
46. Li QZ, Zhou J, Lian Y, et al. Interferon signature gene expression is correlated with autoantibody profiles in patients with incomplete lupus síndromes. *Clin Exp Immunol.* 2010; 159(3): 281-91.
47. Lin SC, Kuo CC, Tsao JT, Lin LJ. Profiling the expression of interleukin (IL)-28 and IL-28 receptor α in systemic lupus erythematosus patients. *Eur J Clin Invest.* 2012; 42(1): 61-9.
48. Lit LC, Wong CK, Tam LS, Li EK, Lam CW. Raised plasma concentration and ex vivo production of inflammatory chemokines in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65(2): 209-15.
49. Mangia A, Thompson AJ, Santoro R, et al. An IL28B polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response. *Gastroenterology.* 2010; 139(3): 821-7, 827.

50. Meller S, Winterberg F, Gilliet M, et al. Ultraviolet radiation-induced injury, chemokines, and leukocyte recruitment: An amplification cycle triggering cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(5): 1504-16.
51. Merrill JT, Wallace DJ, Petri M, et al. Safety profile and clinical activity of sifalimumab, a fully human anti-interferon α monoclonal antibody, in systemic lupus erythematosus: a phase I, multicentre, double-blind randomised study. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70(11): 1905-13.
52. Mikita N, Ikeda T, Ishiguro M, Furukawa F. Recent advances in cytokines in cutaneous and systemic lupus erythematosus. *J Dermatol.* 2011; 38(9): 839-49.
53. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol.* 2003; 56(7): 481-90.
54. Nakajima H, Takenaka M, Kaimori JY, et al. Gene expression profile of renal proximal tubules regulated by proteinuria. *Kidney Int.* 2002; 61(5): 1577-87.
55. Narumi S, Takeuchi T, Kobayashi Y, Konishi K. Serum levels of IFN-inducible protein-10 relating to the activity of systemic lupus erythematosus. *Cytokine.* 2000; 12(10): 1561-5.
56. Niewold TB, Clark DN, Salloum R, Poole BD. Interferon alpha in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010: 948364.
57. Obermoser G, Pascual V. The interferon-alpha signature of systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2010; 19(9): 1012-9.
58. Ohl K, Tenbrock K. Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011: 432595.
59. Onoguchi K, Yoneyama M, Takemura A. Viral infections activate types I and III Interferon genes through a common mechanism. *J Biol Chem.* 2007; 282(10): 7576-81.
60. Padovan E, Spagnoli GC, Ferrantini M, Heberer M. IFN- α 2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8⁺ effector T cells. *J Leukoc Biol.* 2002; 71(4): 669-76.

61. Petri M, Wallace DJ, Spindler A, et al. Sifalimumab, a human anti-interferon- α monoclonal antibody, in systemic lupus erythematosus: a phase I randomized, controlled, dose-escalation study. *Arthritis Rheum.* 2013; 65(4): 1011-21.
62. Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 2010; 39(4): 257-68.
63. Proyecto 1000 genomas. Frecuencias alélicas y frecuencias de los diferentes genotipos del SNP rs12979860 de IL28B. Sitio Web: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=19:39247647-39248647;v=rs12979860;vdb=variation;vf=9236436. Consultado 25 de Febrero, 2015.
64. Rekvig OP, Putterman C, Casu C, et al. Autoantibodies in lupus: culprits or passive bystanders? *Autoimmun Rev.* 2012; 11(8): 596-603.
65. Rönnblom L, Alm GV, Eloranta ML. The type I interferon system in the development of lupus. *Semin Immunol.* 2011; 23(2): 113-21.
66. Rönnblom L, Eloranta ML. The interferon signature in autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol.* 2013; 25(2): 248-53.
67. Rönnblom LE, Alm GV, Oberg KE. Possible induction of systemic lupus erythematosus by interferon-alpha treatment in a patient a malignant carcinoid tumour. *J Intern Med.* 1990; 227(3): 207-10.
68. Ryan MJ. The pathophysiology of hypertension in systemic lupus erythematosus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009; 296(4): R1258-67.
69. Salloum R, Niewold TB. Interferon regulatory factors in human lupus pathogenesis. *Transl Res.* 2011; 157(6): 326-31.
70. Santiago-Raber ML, Baccala R, Haraldsson KM, et al. Type-I interferon receptor deficiency reduces lupus-like disease in NZB mice. *J Exp Med.* 2003; 197(6): 777-88.

71. Schilling PJ, Kurzrock R, Kantarjian H, Gutterman JU, Talpaz M. Development of systemic lupus erythematosus after interferon therapy for chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 1991; 68(7): 1536-7.
72. Sifuentes Giraldo WA, García Villanueva MJ, Boteanu AL, Lois Iglesias A, Zea Mendoza AC. New therapeutic targets in systemic lupus. *Reumatol Clin*. 2012; 8(4): 201-7.
73. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982; 25(11): 1271-7.
74. Trinchieri G. Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med*. 2010; 207(10): 2053-63.
75. Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2011; 365(22): 2110-21.
76. Weckerle CE, Franek BS, Kelly JA, et al. Network analysis of associations between serum interferon- α activity, autoantibodies, and clinical features in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2011; 63(4): 1044-53.
77. Wenzel J, Wörenkämper E, Freutel S, et al. Enhanced type I interferon signalling promotes Th1- biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *J Pathol*. 2005; 205(4): 435-42.
78. Witte K, Witte E, Sabat R, Wolk K. IL-28A, IL-28B, and IL-29: promising cytokines with type I Interferon-like properties. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010; 21(4): 237-51.
79. Wu Q, Yang Q, Lourenco E, Sun H, Zhang Y. Interferon-lambda1 induces peripheral blood mononuclear cell derived chemokines secretion in patients with systemic lupus erythematosus: its correlation with disease activity. *Arthritis Res Ther*. 2011; 16: 13(3): R88.
80. Yao Y, Richman L, Higgs BW, et al. Neutralization of interferon-alpha/beta-inducible genes and downstream effect in a phase I trial of an anti-interferon-alpha monoclonal antibody in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2009; 60(6): 1785-96.

81. Yu SL, Kuan WP, Wong CK, Li EK, Tam LS. Immunopathological roles of cytokines, chemokines, signaling molecules, and pattern-recognition receptors in systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: 715190.
82. Yung S, Chan TM. Autoantibodies and resident renal cells in the pathogenesis of lupus nephritis: getting to know the unknown. *Clin Dev Immunol.* 2012: 139365.
83. Zahn S, Rehkämper C, Kümmerer BM, et al. Evidence for a pathophysiological role of keratinocyte-derived type III interferon (IFN λ) in cutaneous lupus erythematosus. *J Invest Dermatol.* 2011; 131(1):133-40.
84. Zheng YW, Li H, Yu JP, Zhao H, Wang SE, Ren XB. Interferon- λ s: special immunomodulatory agents and potential therapeutic targets. *J Innate Immun.* 2013; 5(3): 209-18.

Anexos

Extracción de DNA con el kit UltraClean Blood Spin.

1. Adicionar 200 μ l de sangre periférica a un tubo de 2 ml y adicionar 10 μ l de Proteinasa K.
2. Adicionar 200 μ l de solución B1 y mezclar con vortex durante 15 segundos.
3. Incubar la muestra a 65 °C durante 10 minutos. Centrifugar brevemente para colectar el lisado.
4. Adicionar 200 μ l de solución B2 y agitar con vortex durante 15 segundos. Centrifugar brevemente para colectar la muestra de la tapa del tubo.
5. Transferir el lisado a un filtro y centrifugar durante 1 minuto a 13 000 rpm.
6. Transferir el filtro a otro tubo de 2 ml.
7. Adicionar 500 μ l de la solución B3 al filtro. Centrifugar durante 30 segundos a 13 000 rpm.
8. Quitar el filtro del tubo y descartar el sobrenadante. Colocar el filtro nuevamente en el tubo de 2 ml.
9. Adicionar 500 μ l de la solución B4 al filtro Centrifugar durante 30 segundos a 13 000 rpm.
10. Quitar el filtro del tubo y descartar el sobrenadante. Colocar el filtro nuevamente en el tubo de 2 ml.
11. Centrifugar nuevamente durante 30 segundos a 13 000 rpm para secar la membrana del filtro.
12. Cuidadosamente retirar el filtro del tubo y transferirlo a un tubo nuevo de 2 ml.
13. Adicionar 52 μ l de la solución B5 (Nota: Para incrementar el rendimiento, incubar durante 5 minutos a 65 °C)
14. Centrifugar 1 minuto a 13 000 rpm
15. Quitar el filtro y cerrar el tubo de 2 ml. El tubo de 2 ml contiene el DNA genómico.

Extracción de RNA con el kit TriPure Isolation.

1. Adicionar 1 ml de TriPure a las PBMC y homogenizar para lisar las células.
2. Incubar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos para asegurar la completa disociación de los complejos de nucleoproteína.
3. Adicionar 200 μ l de cloroformo y agitar vigorosamente durante 15 segundos. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
4. Para separar la solución en tres fases, centrifugar el tubo a 13 000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 2 a 8 °C.
5. Después de centrifugar se observan tres fases en el tubo, la fase acuosa (incolora) que se encuentra en la parte superior del tubo se utiliza para aislar el RNA. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo de 2 ml.
6. Adicionar 500 μ l de isopropanol.
7. Mezclar por inversión e incubar la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar la muestra a 13 000 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 2 a 8 °C. Después de centrifugar descartar el sobrenadante.
9. Adicionar 1 ml de etanol al 75% y lavar el pellet de RNA mediante agitación con vortex.
10. Descartar el sobrenadante y colocar los tubos en la campana de extracción, los tubos se colocan en forma invertida sobre papel absorbente. Para remover el exceso de etanol dejar los tubos en la campana aproximadamente 10 minutos.
11. Resuspender el pellet de RNA en 22 μ l de agua libre de RNAasa y DNAasa y almacenar la muestra de RNA a -70° C.

Síntesis de ADN complementario con el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis .

1. En tubos estériles libres de RNAasa preparar la mezcla de reacción para la síntesis de cDNA con hexámeros random, en reacciones de 20 µl de adicionando los componentes en el siguiente orden:

	Volumen	Concentración final
RNA c.b.p. 500 ng	----	500 ng
Hexámeros random	2 µl	60 µM
Agua c.b.p. 13 µl	----	----
Volumen Total	13 µl	

2. Adicionar al tubo que contiene la mezcla de hexámeros random y RNA los componentes remanentes de la reacción en el siguiente orden:

	Volumen	Concentración final
Buffer de reacción (5x)	4.0 µl	1x
Inhibidor de RNAsas	0.5 µl	20 U
Mezcla de dNTPs	2.0 µl	1 mM
Transcriptasa inversa	0.5 µl	10 U
Volumen total	20 µl	

3. Mezclar los reactivos cuidadosamente en el tubo.
4. Centrifugar brevemente el tubo para coleccionar la muestra en la parte inferior del tubo.
5. Incubar la reacción en un termociclador programado de la siguiente manera:

	Temperatura	Tiempo
Preincubación	25 °C	10 minutos
Incubación	55 °C	30 minutos
Desnaturalización	85 °C	5 minutos

6. Almacenar los cDNA a temperatura de -70° C.

Preparación de PBS (Buffer fosfato salino).

1. Añadir las sales a un vaso de precipitados adecuado para el volumen de la solución por preparar. De acuerdo a la tabla de preparación mostrada a continuación:

		250 ml	500ml	1000ml
NaCl	137 mM	2.015 g	4.03 g	8.06 g
KCl	2.7 mM	0.055 g	0.11 g	0.22 g
Na ₂ HPO ₄	8.1 mM	0.2875 g	0.575 g	1.15 g
KH ₂ PO ₄	1.5 mM	0.05 g	0.10 g	0.20 g
H ₂ O		c.b.p. 250 ml	c.b.p. 500 ml	c.b.p. 1000 ml

2. Añadir el 80% del volumen de agua desionizada o destilada requerido y mezclar con el agitador magnético hasta diluir las sales.
3. Ajustar el pH a 7.2- .4 con 1M HCl o 10M NaOH (según sea necesario).
4. Aforar la solución con agua al volumen final requerido.
5. Filtrar la solución a través de unidades de filtración para eliminar partículas suspendidas.
6. Esterilizar en autoclave.

Separación de células mononucleares de sangre periférica con Histopaque 1077.

1. Diluir la muestra de sangre 1:2 con PBS.
2. Colocar 6.0 ml de Histopaque-1077 en un tubo de centrifuga cónico de 15 ml y mantener a temperatura ambiente.
3. Extender con cuidado 6.0 ml de sangre diluida en el tubo que contiene el Histopaque-1077. Centrifugar a 1500 rpm durante 20 minutos, a temperatura ambiente. El centrifugado a temperaturas más bajas, como a 4° C, puede producir la coagulación de la sangre y un recuento escaso de células.
4. Después del centrifugado, con una pipeta aspirar con cuidado la capa superior hasta 0.5 cm de la zona opaca que contiene las células mononucleares. Desechar la capa superior.
5. Con una pipeta transferir con cuidado la zona opaca, a un tubo de centrifuga cónico limpio.
6. Añadir a este tubo 10.0 ml de PBS y mezclar por aspiración suave.
7. Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Aspirar el sobrenadante y desecharlo.
9. Suspender el pellet de las células en 10.0 ml de PBS y mezclar por aspiración suave con un pipeta.
10. Centrifugar a 1500 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente.
11. Aspirar el sobrenadante y desecharlo.
12. Suspender el pellet de células en 1.0 ml de medio de cultivo RPMI.
13. Contar la células: poner una muestra del medio de cultivo que contiene a las PBMC en cada pocillo de la cámara añadiendo, 5 µl de muestra y 5 µl de azul de Tripano al 0.05% homogenizando. Posteriormente colocar el cubreobjetos de la cámara evitando la formación de burbujas y observar al microscopio.

Cultivo de PBMC estimuladas con interferón alfa recombinante.

1. A partir de la cantidad total de PBMC hacer los cálculos necesarios para colocar en cada uno de los pozos de la placa 1×10^6 células y agregar medio RPMI cuanto baste para 1.0 ml de medio en el pozo.
2. Estimular un pozo con 1000 U de IFN- α y el otro pozo sin IFN-estimulo, dejar en incubadora durante 24 horas.
3. Después del tiempo de estimulación recolectar el sobrenadante en un tubo de 1.5 ml y centrifugar durante 15 minutos a 2400 rpm.
4. Almacenar el sobrenadante en tubos eppendorf de 0.6 mL rotulados a -70°C.
5. Agregar 1 ml de Tripure (Roche) a los pozos libres de sobrenadante y tratar de que el reactivo cubra todo el pozo, mezclar con la pipeta.
6. Retirar el reactivo Tripure de la placa con un pipeta y agregarlo al tubo que contiene botón de PBMC y mezclar con la pipeta varias veces.
7. Almacenar la muestra a -70°C.

Genotipificación del SNP rs12979860 de IL28B.

Reconstitución del reactivo.

1. Centrifugar a 3000 rpm el vial que contiene los primers y la sonda durante 2 minutos.
2. Adicionar 100 µl de agua grado PCR a cada uno de los viales que contienen los reactivos, mezclar la solución (vortex) y centrifugar a 3000 rpm durante 2 minutos.
3. Usar 1 µl del reactivo Mix por cada 20 µl de reacción de PCR.

Mezcla de reacción.

Mezcla de reacción 20 µl

H ₂ O	9.4 µl
Sonda	2.0 µl
Mix 5X	3.6 µl
DNA	5.0 µl
Total	20.0 µl

Programar el equipo de PCR de la siguiente manera:

Programa	Desnaturalización		Amplificación			Desnaturalización			Enfriamiento
Parámetro	<i>None</i>		<i>Quantification</i>			<i>Melting curves</i>			<i>None</i>
Analysis Mode	<i>None</i>		<i>Quantification</i>			<i>Melting curves</i>			<i>None</i>
Cycles	1		45			1		1	
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1	
Target [°C]	95	95	60	72	95	40	75	40	
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:10	00:00:15	00:00:30	00:20:00	00:00:00	00:00:30	
Ramp Rate [°C/s] 384	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	-	2.0	
Ramp Rate [°C/s] 96	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	-	1.5	
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Continu.	None	
Acquisition [per°C]							3		

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para determinar la concentración de en suero y sobrenadante de IP-10.

Preparación de la muestra: diluir el sobrenadante del cultivo celular 1:5 (60 µl de muestras y 240 µl de reactivo diluyente).

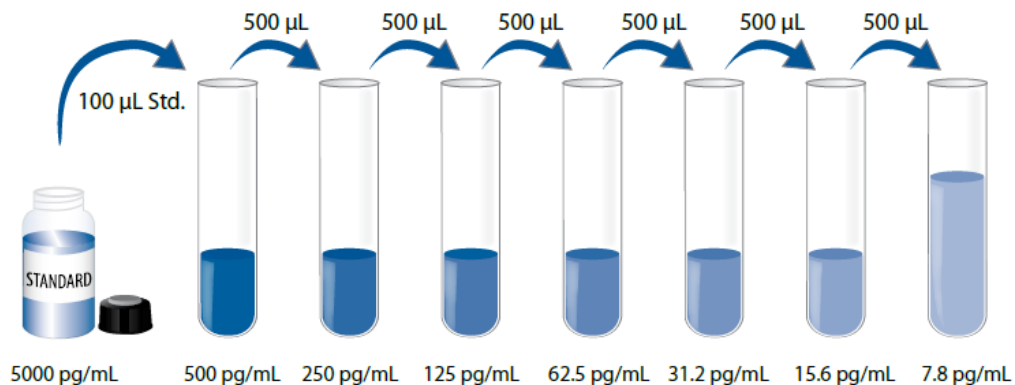
Preparación de los reactivos:

Reactivo de lavado: diluir 20 mL de reactivo de lavado concentrado en agua desionizada para 500 mL de reactivo de lavado.

Solución sustrato: mezclar el reactivo A y B en volúmenes iguales. Preparar este reactivo 15 minutos antes de su uso y proteger de la luz. Se requieren 200 µl de esta mezcla son requerido por pozo.

Estándar de IP-10: reconstituir el estándar de IP-10 con agua desionizada o destilada, la preparar e estándar se obtiene una solución stock de 5000 pg/mL.

Curva estándar: colocar 900 µl de calibrador diluyente RD5K (para sobrenadante de cultivo celular/ saliva/ muestras de orina) o calibrador diluyente RD6Q (para muestras de suero o plasma) en el tubo que contiene 500 pg/mL del estándar. Agregar 500 µl del apropiado calibrador diluyente en los demás tubos y utilizar la solución estándar para producir diluciones seriadas. Mezclar cada tubo antes de transferir la solución al siguiente tubo. El diluyente calibrador sirve como estándar cero (0 pg/mL).



Procedimiento:

1. Preparar los reactivos, estándar de trabajo y muestras como se indicó anteriormente.
2. **Para sobrenadante de cultivo celular:** adicionar 150 μl del reactivo diluyente RD1-56 a cada uno de los pozos.
Para suero: adicionar 75 μl del reactivo diluyente RD1-56 a cada uno de los pozos.
3. **Para sobrenadante de cultivo celular:** adicionar 100 μl del estándar, control o muestra. Cubrir con una tapa adhesiva e incubar a temperatura ambiente durante 2 horas.
Para suero: adicionar 75 μl de estándar, control o muestra. Cubrir con una tapa adhesiva e incubar a temperatura ambiente durante 2 horas.
4. Aspirar cada pozo y lavar, repetir este proceso tres veces para hacer un total de 4 lavados. Lavar cada pozo adicionando a cada uno de los pozos 300 μl de reactivo de lavado y remover por completo el reactivo remante de los pozos.
5. Adicionar 200 μl del reactivo conjugado a cada pozo. Cubrir con una tapa adhesiva e incubar a temperatura ambiente durante 2 horas.
6. Repetir el procedimiento de aspiración/lavado (paso numero 4).
7. Adicionar 200 μl de solución sustrato a cada uno de los pozos. Incubar durante 30 minutos temperatura ambiente y proteger de la luz.
8. Adicionar 50 μl de solución de paro y cada pazo. El color en los pozos debe cambiar de azul a amarillo.
9. Determinar la densidad óptica usando un lector de placa a una longitud de onda de 450 nm.