



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO DE UN SOLO
NUCLEÓTIDO RS1059702 LOCALIZADO EN *IRAK1* EN PACIENTES
CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO PEDIÁTRICO”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

JESÚS RUIZ FLORES

DIRECTOR DE TESIS

CECILIA CONTRERAS CUBAS



CIUDAD DE MÉXICO

2016



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR: MARISOL LOPEZ LOPEZ

VOCAL: PROFESOR: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

SECRETARIO: PROFESOR: CECILIA CONTRERAS CUBAS

1er. SUPLENTE: PROFESOR: JULIO CESAR MARTINEZ ALVAREZ

2° SUPLENTE: PROFESOR: ALBERTO ORTEGA VAZQUEZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE
MEDICINA GENOMICA (INMEGEN)**

ASESOR DEL TEMA: CECILIA CONTRERAS CUBAS _____

SUSTENTANTE: JESÚS RUIZ FLORES _____

RESUMEN

El lupus eritematoso sistémico (LES) es el prototipo de las enfermedades autoinmunes, en la que se afectan diversos órganos. Se presenta con una incidencia de 10 casos por cada 100 000 habitantes, siendo más frecuente en las mujeres con una relación M:H de 9:1. De acuerdo a la edad de inicio de la enfermedad, el LES se clasifica en LES adulto (LESa), si se diagnostica después de los 16 años, y en LES pediátrico (LESp), diagnosticado antes de esta edad. El LESp se presenta del 15-20 % del total de los casos de LES y se caracteriza por presentar síntomas más agudos y graves en comparación con LESa, principalmente la nefritis lúpica (NL), una grave consecuencia de los síntomas comunes en lupus.

EL LES es una enfermedad compleja, en la que intervienen diversos factores que predisponen al individuo a desarrollarla. Dentro de las variantes genéticas que se han asociado a LES se encuentran el haplotipo de riesgo localizado en la región Xq28, principalmente en el gen de la cinasa-1 asociada al receptor de interleucina-1 (*IRAK1*, por sus siglas en inglés: *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1*). El SNP rs1059702 (A/G), localizado en el exón 5 de *IRAK1*, forma parte del haplotipo de riesgo, es un SNP no sinónimo (S196F) y se ha implicado en el aumento de la translocación del factor de transcripción, NF-κB, al núcleo. De igual manera este polimorfismo se ha correlacionado con bajos niveles de mRNA de la proteína 2 de unión a sitios CpG metilados (*MECP2*, por sus siglas en inglés: *Methyl-CpG-Binding-Protein 2*) que se encuentra aledaño a *IRAK1*.

En el presente trabajo se genotipificó el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés: *Single Nucleotide Polymorphism*) rs1059702 en 417 pacientes con LESp y 434 controles. Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas de la población de estudio y se compararon con las reportadas en la base de datos 1000 Genomas para otras poblaciones con diversos orígenes étnicos. De manera interesante, se encontró que el alelo de riesgo A es más frecuente en la población mexicana. Por otro lado, en el estudio caso-control con LESp y NL, se observó en ambos casos una asociación significativa (OR=1.401 y

$P=0.0016$; $OR=1.886$ y $P=0.0010$, respectivamente). El análisis de desequilibrio de transmisión (TDT) mostró que el alelo A se sobre-transmite de padres a hijos en 51%, sin embargo, estos resultados no fueron significativos ($P=0.0652$).

En conclusión, se observó que en la población mexicana el SNP rs1059702 presenta una distribución alélica y genotípica diferente a la reportada para otras poblaciones, siendo más frecuente el alelo de riesgo en ésta, lo que sugiere que esta variante ha sido enriquecida en nuestra población. Finalmente, este alelo se asoció a riesgo para LESp y NL, por lo que podría jugar un papel importante en la fisiopatología del LES.

Abreviaturas

ACE: Enzima conversora de Angiotensina I (por sus siglas en inglés: *Angiotensin I Converting Enzyme*)

ACR: Colegio Americano de Reumatología (por sus siglas en inglés: *American College of Rheumatology*).

AIMs: Marcadores Informativos de Ancestría (por sus siglas en inglés: *Ancestry Informative Markers*)

ATG5: Gen relacionado a la Autofagia 5 (por sus siglas en inglés: *Autophagy Related 5*)

Bcl-2: Células B de linfoma 2 (por sus siglas en inglés: *B-Cell CLL/Lymphoma 2*)

BTK: Tirocin Cinasa de Bruton (por sus siglas en inglés: *Bruton Tyrosine Kinase*)

COL25A1: Colágeno Tipo XXV Alfa 1 (por sus siglas en inglés: *Collagen Type XXV Alpha 1*)

CSK: Tirocin Cinasa C-Src (por sus siglas en inglés: *C-Src Tyrosine Kinase*)

DNMT: ADN metil-transferasa (por sus siglas en inglés: *DNA Methyl-Transferase*).

dsDNA: ADN de doble cadena (por sus siglas en inglés: *double stranded DNA*).

EB: virus de Epstein Barr.

EBF: Factor de células B tempranas (por sus siglas en inglés: *Early B-Cell Factor*)

FCGR2A: Receptor IIa del Fragmento Fc de IgG (por sus siglas en inglés: *Fc Fragment Of IgG Receptor IIa*)

FCGR3A: Receptor IIIa del Fragmento Fc de IgG (por sus siglas en inglés: *Fc Fragment Of IgG Receptor IIIa*)

GWAS: Estudios de Asociación de Genoma Completo (por sus siglas en inglés: *Genome Wide Association Studies*).

HLA: Antígeno Leucocitario Humano (por sus siglas en inglés: *Human Leukocyte Antigen*).

IC: Intervalo de Confianza

IFN-I: Interferón tipo I.

IKZF1: Familia de IKAROS del Dedo de Zinc 1 (por sus siglas en inglés: *IKAROS Family Zinc Finger 1*)

IL-1R: Receptor de Interleucina-1 (por sus siglas en inglés: *Interleukin-1 Receptor*)

IRAK1: Cinasa-1 Asociada al Receptor de Interleucina-1 (por sus siglas en inglés: *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1*).

IRF5: Factor Regulador de Interferón 5 (por sus siglas en inglés: *Interferon Regulatory Factor 5*)

IRF7: Factor Regulador de Interferón 7 (por sus siglas en inglés: *Interferon Regulatory Factor 7*)

ITGAM: Integrina subunidad Alfa M (por sus siglas en inglés: *Integrin Subunit Alpha M*)

KLK: Peptidasa relacionada a Calicreina (por sus siglas en inglés: *Kallikrein Related Peptidase*)

LAMC2: Subunidad Gamma 2 de Laminina (por sus siglas en inglés: *Laminin Subunit Gamma 2*)

LD: Desequilibrio de Ligamiento (por sus siglas en inglés: *Linkage Disequilibrium*)

LES: Lupus Eritematoso Sistémico.

LESa: Lupus Eritematoso Sistémico adulto.

LESp: Lupus Eritematoso Sistémico pediátrico.

MBD: Dominio de Unión a grupos Metil (por sus siglas en inglés: *Methyl Binding Domain*)

MECP2: Proteína 2 de Unión a sitios CpG Metilados (por sus siglas en inglés: *Methyl-CpG-Binding Protein 2*)

MHC-II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad-II (por sus siglas en inglés: *Major Histocompatibility Complex-II*).

MyD88: Respuesta Primaria de Diferenciación Mieloide 88 (por sus siglas en inglés: *Myeloid Differentiation Primary Response 88*)

NF-κB: Factor Nuclear Kappa B (por sus siglas en inglés: *Nuclear Factor Kappa B*)

NL: Nefritis Lúpica.

Pax5: Caja pareada 5 (por sus siglas en inglés: *Paired Box 5*)

PDCD1: Gen de Muerte Celular Programada 1 (por sus siglas en inglés: *Programmed Cell Death 1*)

PTPN22: Proteína Tirosina Fosfatasa no Receptora-22 (por sus siglas en inglés: *Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 22*)

RBC: Células Rojas de la Sangre (por sus siglas en inglés: *Red Blood Cells*)

SNP: Polimorfismo de un Solo Nucleótido (por sus siglas en inglés: *Single Nucleotide Polymorphism*).

STAT1: Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 1 (por sus siglas en inglés: *Signal Transducer And Activator Of Transcription 1*)

STAT4: Traductor y Activador de Señales de Transcripción 4 (por sus siglas en inglés: *Signal Transducer and Activator of Transcription 4*).

TCF3: Factor de transcripción 3 (por sus siglas en inglés: *Transcription Factor 3*)

TDT: Estudio de Desequilibrio de Transmisión (por sus siglas en inglés: *Transmission Disequilibrium Test*)

TLR: Receptor Tipo Toll (por sus siglas en inglés: Toll-Like Receptor).

TLR9: Receptor Tipo Toll-9 (por sus siglas en inglés: *Toll Like Receptor 9*)

TNFAIP3: TNF- α Inducido por Proteína 3 (por sus siglas en inglés: *TNF Alpha Induced Protein 3*)

TRD: Dominio de Represión Transcripcional (por sus siglas en inglés: *Transcription Repression Domain*)

TREX: Exonucleasa 1 de Reparación (por sus siglas en inglés: *Three Prime Repair Exonuclease 1*)

Índice

I. Marco teórico	10
I.1.- Lupus eritematoso sistémico (LES).....	10
I.1.1.- Fisiopatología de LES.....	12
I.2.- Lupus eritematoso sistémico pediátrico (LESp).....	17
I.3.- Genética de LES.....	19
I.4.- Haplotipo de riesgo IRAK1 y MECP2 en LES.....	21
I.5.- Cinasa-1 asociada al receptor de interleucina-1 (IRAK1).....	27
I.6.- Proteína de unión a sitios CpG metilados (MECP2).....	29
II. Justificación	32
III. Procedimiento experimental	32
IV. Resultados	35
V. Discusión	42
VI. Conclusiones	46
VII. Bibliografía	47

I. Marco Teórico

I.1.- Lupus Eritematoso Sistémico

El lupus eritematoso sistémico (LES) es el prototipo de las enfermedades autoinmunes, el cual tiene una incidencia de 10 casos por cada 100,000 habitantes. Es un padecimiento crónico-inflamatorio en el que se ven afectados diversos órganos y tejidos, llevando al deterioro de la salud del individuo. Una de las principales características de esta enfermedad es la producción de autoanticuerpos, principalmente aquellos que reconocen DNA de doble cadena (dsDNA, por sus siglas en inglés: *double-stranded DNA*) que desencadenan una respuesta inmune en contra del material genético, tejidos y órganos propios. Debido a la gran heterogeneidad de síntomas que se presentan en la enfermedad, en 1982, el Colegio Americano de Reumatología (ACR, por sus siglas en inglés: *American College of Rheumatology*) estableció 11 criterios, a partir de los cuales se diagnostica al paciente con LES cuando presenta por lo menos cuatro de estos (Tabla 1).¹

Tabla 1. Criterios diagnósticos de lupus eritematoso sistémico, según el Colegio Americano de Reumatología establecidos en 1982. Tomada y modificada de ¹

1. ERITEMA MALAR	Eritema fijo, plano o elevado sobre las eminencias malares, que no compromete los surcos nasogenianos.
2. LUPUS DISCOIDE	Placas eritematosas elevadas con escamas adherentes y taponamiento folicular, atrofia cicatrizal en lesiones antiguas.
3. FOTOSENSIBILIDAD	Eritema en la piel como resultado de reacción inusual a la luz por historia del paciente u observación del médico.
4. ÚLCERAS ORALES	Ulceración oral o nasofaríngea indolora.
5. ARTRITIS	Artritis no erosiva que compromete 2 o más articulaciones periféricas caracterizada por edema, tensión o derrame.
6. SEROSITIS	1) Pleuritis- historia de dolor pleurético o frote o evidencia de derrame. 2) Pericarditis- documentado por ECG, frote o evidencia de derrame pericárdico.
7. ALTERACIÓN RENAL	1) Proteinuria persistente mayor de 0.5 g/24 h mayor de 3. 2) Cilindros celulares de glóbulos rojos, hemoglobina, de tipo granular, tubular o mixtos.
8. ALTERACIÓN NEUROLÓGICA	1) Pérdida de conocimiento, en ausencia de medicamento o alteraciones metabólicas: uremia, cetoacidosis, o desbalance electrolítico 2) Psicosis en ausencia de medicamento o alteraciones metabólicas: uremia, cetoacidosis, o desbalance electrolítico
9. ALTERACIÓN HEMATOLÓGICA	1) Anemia hemolítica reticulocitosis. 2) Leucopenia menor de 4000/mm ³ total en dos o más ocasiones. 3) Linfopenia, menor de 1500/mm ³ en dos o más ocasiones. 4) Trombocitopenia, menor de 100000/mm ³ en ausencia de medicamentos.
10. ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS	1) Presencia de anti-ADN nativo 2) Presencia de anti-Sm 3) Hallazgo positivo de anticuerpos anti-fosfolípidos basados en: <ul style="list-style-type: none"> • Niveles elevados de suero de anticuerpos anticardiolipinas IgG o IgM • Prueba positiva para anticoagulante lúpico • Prueba en suero para sífilis falso positivo por 6 meses y confirmado por pruebas de inmovilización de treponema o absorción de anticuerpos fluorescentes.
11. ANTICUERPOS ANTINUCLEARES	Título normal por inmunofluorescencia o equivalente, en ausencia de drogas asociadas a lupus inducido por drogas.

I.1.1- Fisiopatología de LES

El LES es considerado una enfermedad multifactorial (**Figura 1**), ya que para su desarrollo se ven involucrados diferentes factores tales como: genéticos, epigenéticos, ambientales, inmunológicos y hormonales.

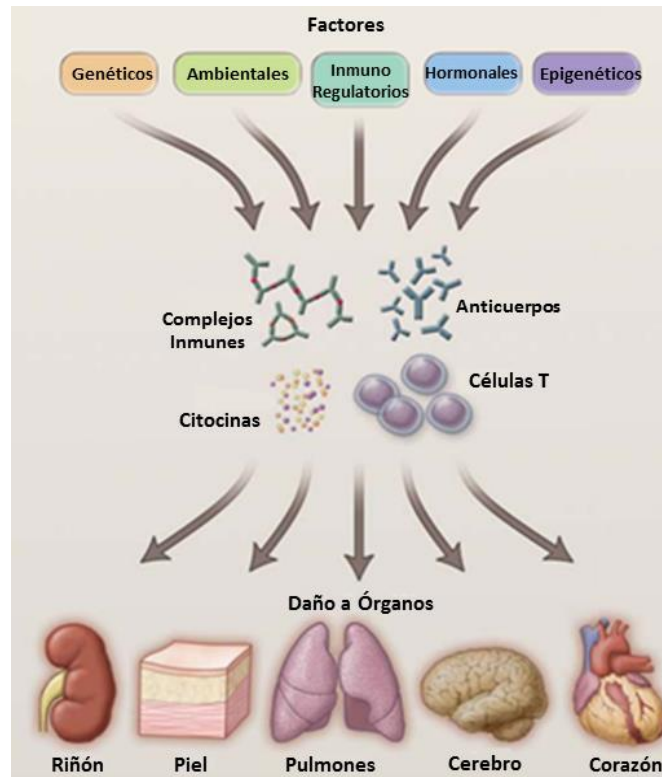


Figura 1. Diversos factores involucrados en el desarrollo del lupus eritematoso sistémico. Estos factores son el ambiente, material genético, regulación inmune, presencia de hormonas, regulación epigenética, que en conjunto llevan al daño de diversos órganos y tejidos en el individuo que presenta esta enfermedad. Tomado y modificado de ³.

Se ha reportado que algunos factores ambientales pueden conducir a la producción de células T auto-reactivas y auto-anticuerpos, la producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias, así como al daño dirigido a órganos. ² Algunos ejemplos son los agentes infecciosos, puntualmente el virus de Epstein-Barr, del cual se ha hipotetizado un mimetismo molecular entre el epítipo EBNA-1 del virus y el epítipo PPPGMRPP de la nucleoproteína Sm del humano, lo que

desencadena una producción de auto-anticuerpos. ⁴ Los pacientes con LES presentan un título alto de anticuerpos para este virus. ⁵

También se sabe que la presencia de auto-antígenos es una característica muy común en esta enfermedad, la mayoría son complejos de proteínas y ácidos nucleicos (ribonucleoproteínas) como snRNP, Ro, La, Sm, ribosomas o nucleosomas. ⁶

Otro factor es el consumo de tabaco, ya que contiene diversos compuestos tóxicos como la nicotina, monóxido de carbono e hidrocarburos aromáticos policíclicos. En un estudio caso-control realizado en Estados Unidos se determinó la asociación entre el tabaquismo y la predisposición a desarrollar LES (OR: 6.69 para fumadores activos y 3.62 para fumadores pasivos). ⁷ Existen otros factores ambientales que se han relacionado a la predisposición a esta enfermedad, los cuales se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Factores ambientales que se relacionan con la predisposición a LES. Tomada y modificada de ²

Agentes infecciosos
- ADN bacteriano/endotoxinas
- Virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, parvovirus B19
- Retrovirus
Exposición a contaminantes
- Sílica cristalina
- Solventes
- Pesticidas
- Colorantes de cabello
- Metales pesados
Medicamentos
- Procainamida, hidralazina, clorpromazina, isoniazida, fenitoína
Hormonas y estrógenos ambientales
- Terapia de reemplazamiento hormonal, tabletas anticonceptivas orales
- Exposición prenatal a estrógenos
Exposición ambiental
- Luz ultravioleta
- Tabaco
Factores dietéticos
- Alto consumo de grasas saturadas
- L-canavanina

Estudios realizados en diferentes poblaciones de los Estados Unidos han demostrado que hispanos, asiáticos y afro-americanos presentan una mayor prevalencia de esta enfermedad, y que el desarrollo de ésta es a una edad más temprana, en comparación con individuos de origen caucásico ⁸. De hecho, los casos de incidencia son tres veces mayores, atribuyendo a esta situación la condición genética de los individuos. Curiosamente se reporta que los afro-americanos son más propensos a LES que los afro-africanos, dejando en claro la importancia que tienen los factores genéticos propios de cada población en el desarrollo de esta enfermedad. ⁸

Por otra parte, diversos estudios en modelos murinos han demostrado que el aumento de hormonas, principalmente los estrógenos, altera la eliminación de linfocitos B auto-reactivos en las etapas de desarrollo de estas células. ⁹ Aunado a lo anterior, se ha observado que alteraciones en la secreción de la hormona lactogénica, prolactina, puedan relacionarse con LES, ya que el 25% de los pacientes presentan altos niveles de ésta (hiperprolactinemia), ¹⁰ y la administración de un antagonista, bromocriptina, bloquea la producción de la misma, aminorando los síntomas de este padecimiento en humanos. ¹¹

A la fecha se han logrado identificar algunos genes implicados en la susceptibilidad a LES, los cuales participan principalmente en la respuesta inmunológica. ⁷ De acuerdo a las vías de señalización en las que participan cada uno de estos genes se han clasificado en cuatro categorías: (a) genes que afectan el desarrollo y activación de linfocitos, particularmente linfocitos B, tales como el factor de transcripción 3 (*TCF3*, por sus siglas en inglés: *Transcription Factor 3*), el factor de células B tempranas (*EBF*, por sus siglas en inglés: *Early B-Cell Factor*), la caja pareada 5 (*Pax5*, por sus siglas en inglés: *Paired Box 5*), la Tirosin Kinasa de Bruton (*BTK*, por sus siglas en inglés: *Bruton Tyrosine Kinase*) y las células B de linfoma 2 (*Bcl-2*, por sus siglas en inglés: *B-Cell CLL/Lymphoma 2*), etc. ¹²; (b) genes que afectan las vías de señalización del sistema inmune innato, por ejemplo, la activación de NF-κB y la señalización del interferón tipo I (IFN-I) tales como el gen de la Respuesta Primaria de Diferenciación Mieloide 88 (*MyD88*, por

sus siglas en inglés: *Myeloid Differentiation Primary Response 88*), el Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 1 (*STAT1*, por sus siglas en inglés: *Signal Transducer And Activator Of Transcription 1*), el Factor Regulador de Interferón 5 (*IRF5*, por sus siglas en inglés: *Interferon Regulatory Factor 5*), etc.^{13,14}; (c) genes que juegan un papel importante en la función renal como la peptidasa relacionada a calicreina (*KLK*, por sus siglas en inglés: *Kallikrein Related Peptidase*), la Subunidad Gamma 2 de Laminina (*LAMC2*, por sus siglas en inglés: *Laminin Subunit Gamma 2*), la Enzima convertora de Angiotensina I (*ACE*, por sus siglas en inglés: *Angiotensin I Converting Enzyme*), el gen de Colágeno Tipo XXV Alfa 1 (*COL25A1*, por sus siglas en inglés: *Collagen Type XXV Alpha 1*), etc.^{13,14}; y (d) genes que participan en la remoción de desechos apoptóticos, cromatina y complejos inmunes que se unan a estos antígenos como el caso de la Integrina subunidad Alfa M (*ITGAM*, por sus siglas en inglés: *Integrin Subunit Alpha M*), la Exonucleasa 1 de Reparación (*TREX1*, por sus siglas en inglés: *Three Prime Repair Exonuclease 1*), el Gen relacionado a la Autofagia 5 (*ATG5*, por sus siglas en inglés: *Autophagy Related 5*), etc. (**Figura 2**).^{13,14}

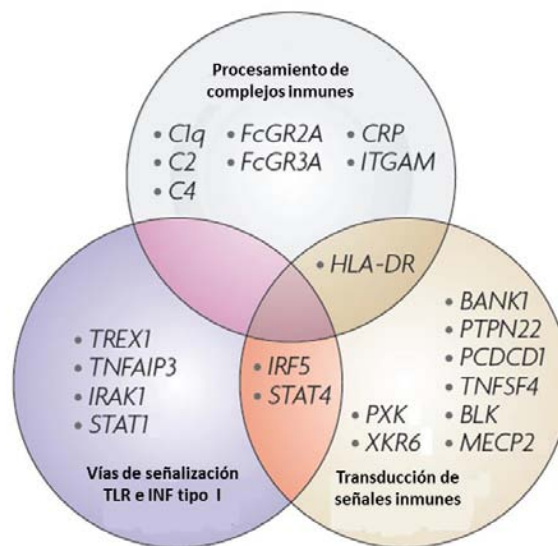


Figura 2. Genes asociados a LES. Se muestran diversos genes, los cuales participan en la respuesta inmune y se ha demostrado su asociación para el desarrollo de LES. Tomado y modificado de ¹³

De manera interesante, el estudio de variantes genéticas en estos genes ha sido determinante para entender más acerca de los factores genéticos que participan en LES. Las variantes genéticas son cambios en la secuencia del DNA que en algunos casos pueden llevar a una alteración en la función de las proteínas, y que se han asociado al riesgo a presentar ciertas enfermedades.¹⁵ En algunos casos, se presentan variantes genéticas en un solo gen (por ejemplo, *C1q* del sistema del complemento), y comúnmente se encuentra la presencia de variantes genéticas en diferentes genes.¹⁶ Dentro de las variantes genéticas más estudiadas, se encuentran los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés: *Single Nucleotide Polymorphism*), los cuales consisten en el cambio de un solo nucleótido en la secuencia de DNA. Estos son muy frecuentes en el genoma humano y pueden repercutir en la estructura primaria de la proteína hasta afectar su función.¹⁷ También se han descrito haplotipos, los cuales consisten de varios SNPs que co-segregan en bloque, asociados a enfermedades.^{13,14}

Aunado a la contribución de los factores genéticos, recientemente se ha reportado que existe una participación importante de la regulación epigenética en LES, tales como la metilación del DNA y las modificaciones en las histonas (acetilación y metilación). La metilación del DNA se lleva a cabo por una enzima DNA metiltransferasa (DNMT: por sus siglas en inglés, *DNA Methyl Transferase*) en el carbono 5 de la citosina, promoviendo una modificación en la estructura de la cromatina que la hace inaccesible a los factores de transcripción. Se ha reportado que algunos compuestos, como la 5-azacitidina, inhiben a las DNMTs; también se sabe que la procainamida y la hidralazina inducen síntomas muy semejantes al lupus, convirtiendo a los linfocitos T CD4⁺ en auto-reactivos.¹⁸ En pacientes con LES se ha reportado que existe un estado de hipometilación en células T CD4⁺, además de una disminución en los niveles de enzimas DNMTs.¹⁸

La supervivencia de los linfocitos es necesaria para el mantenimiento de la homeostasis linfoide, la cual evita que se de un estado de autoinmunidad.¹⁶ Existen células T auto-reactivas en individuos sanos, lo que demuestra la existencia de mecanismos por los cuales se controla la actividad de estas células. Un ejemplo de esto son las células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ que expresan

Foxp3, el cual juega un papel inhibitor de la respuesta inmune. ¹⁹ La ausencia o defectos en estas células conllevan al desarrollo de enfermedades autoinmunes; se ha demostrado que en pacientes con LES, el número de estas células reguladoras es bajo. ¹⁹ También se presenta una disminución en el número de células T CD8⁺ y NK ²⁰, y estas presentan una actividad citotóxica deficiente; se suma a esto el aumento en la producción de IL-10 e IL-4, promoviendo la proliferación y diferenciación de linfocitos B, lo que resulta, a su vez, en un aumento en la producción de auto-anticuerpos. ²⁰ Otra característica es la producción reducida de IL-2 lo que resulta en una deficiente actividad citotóxica de las células T y el incremento en el riesgo de infección, la cual es una causa importante de la enfermedad y muerte en los pacientes que la presentan. ¹⁶

I.2.- Lupus eritematoso sistémico pediátrico (LESp)

De acuerdo a la edad de inicio de la enfermedad, el LES se ha clasificado en pediátrico (LESp) y adulto (LESa). A diferencia de LESa, los pacientes con LESp debutan con la enfermedad antes de los 16 años de edad, con una edad media de diagnóstico entre 12-14 años. ^{21,22}

El LESp se presenta con una incidencia del 10-20 % de todos los casos a nivel mundial. ²² En un estudio publicado por Tucker y colegas, en donde se evaluaron 79 pacientes con LES, siendo el 90% de estos mujeres (31 con LESp y 48 con LESa), se demostró que los síntomas renales, hematológicos y neurológicos en pacientes con LESp son más agudos y graves, además de presentarse un mayor porcentaje de mortalidad respecto a LESa ^{21,22, 23} (**Figura 2**).

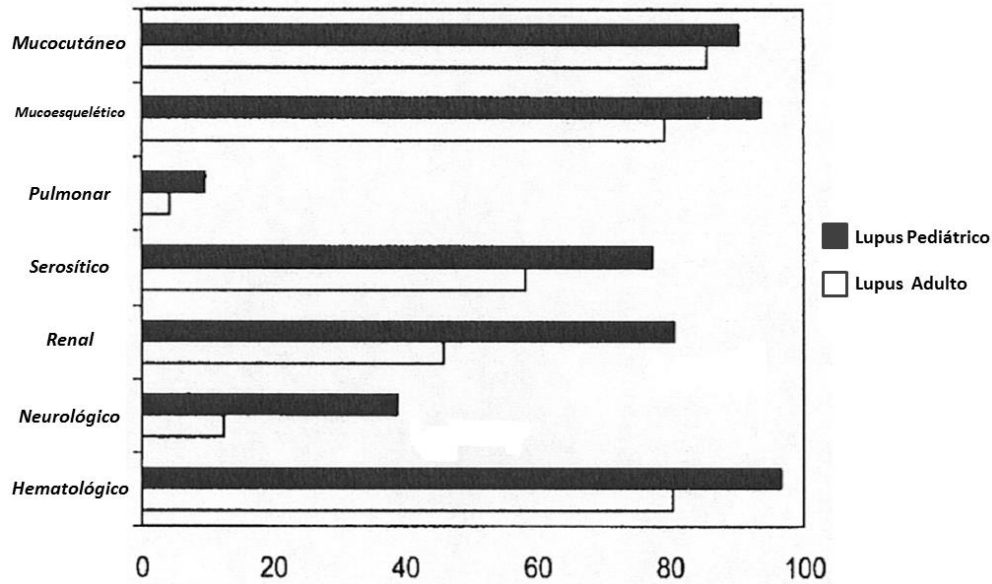


Figura 2. Comparación entre LPSp y LESa. Se muestran porcentajes de casos con diferentes síntomas. Cabe resaltar un mayor porcentaje de pacientes con LPSp con daño renal, neurológico y hematológico en comparación con LESa. Tomada y modificada de ²³

En LPSp, la proporción de mujeres:hombres es de 5:1, mientras que en LESa esta proporción aumenta a 9:1. El daño renal en pacientes pediátricos es del 60-80%, mientras que en adultos del 35-50%; el daño hematológico, eritema malar y úlceras bucales están presentes en más del 70% de los casos en LPSp; el daño neurológico lo presentan de 20-45% de los casos pediátricos y 10-25 % en adultos. El daño respiratorio, junto con artralgia, son síntomas más comunes en pacientes adultos que en pediátricos; y por último, los anticuerpos que reconocen el dsDNA inciden en un 61-93% de casos pediátricos y 25-78% en adultos. ^{21,22}

Dentro de las afecciones más frecuentes y graves, como consecuencia de LES, se encuentra la nefritis lúpica (NL), la cual afecta del 40-70% de los pacientes, con una incidencia dependiente del origen étnico, la edad y el género. ¹⁴

El daño renal puede ser la primera manifestación de LES y aunque ocurre durante el primer año de diagnóstico, más comúnmente dentro de los 5 años siguientes, puede presentarse en cualquier momento durante el transcurso de la enfermedad.

La NL suele manifestarse como síndrome nefrótico y/o nefrítico con varias combinaciones de edema, proteinuria, hematuria, función anormal renal, perfil lipídico anormal e hipertensión. ²⁴

Aunque no se conoce del todo la patogenia de la NL, en algunos modelos animales, se ha encontrado evidencia de la formación de complejos inmunes en los riñones, llevando a la activación del complemento, y provocando así daño al tejido renal. ²⁴

I.3.- Genética de LES

Como se mencionó anteriormente, los factores genéticos tienen una gran influencia en desarrollo de LES, el cual presenta una heredabilidad mayor al 66%. La concordancia genética entre gemelos monocigóticos es del 20-40%, mientras que en gemelos dicigóticos y hermanos directos es del 2-5%, datos que apoyan la evidencia de la compleja base genética detrás de este padecimiento. ^{13,14}

Aún más, se ha reportado que ciertos grupos étnicos son más propensos al desarrollo de LES, como los afro-americanos, hispanos, afro-caribeños, nativos americanos y asiáticos ⁸. Incluso, se han encontrado diferencias en el perfil de anticuerpos entre poblaciones; por ejemplo, los anticuerpos anti-Ro son más comunes en la población china del sur y africanos. La prevalencia de anticuerpos anti-Sm es mayor en afro-americanos, africanos, sauditas y vietnamitas. Por su parte, los anticuerpos anti-P ribosomal son más comunes en japoneses y malayos. Estas diferencias se atribuyen a condiciones genéticas propias de cada población, ya que la producción de estos anticuerpos se encuentra asociada con un incremento en la frecuencia de complejos que involucran al complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II, por sus siglas en inglés: *Major Histocompatibility Complex-II*) ⁸. Lo anterior ha propiciado que se realicen estudios específicos dentro de cada una de las poblaciones para indagar más a fondo sobre las características genéticas que los predisponen a LES y otras enfermedades.

Los primeros genes reportados con asociación a LES, el Receptor IIa del Fragmento Fc de IgG (*FCGR2A*, por sus siglas en inglés: *Fc Fragment Of IgG Receptor IIa*), *FCGR3A*, el Gen de Muerte Celular Programada 1 (*PDCD1*, por sus siglas en inglés: *Programmed Cell Death 1*), se encontraron mediante de estudios de genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés: *Genome Wide Association Studies*), los cuales analizan las variantes en las secuencias de DNA a través de todo el genoma humano para identificar factores genéticos de riesgo a enfermedades que son comunes en la población.^{13, 17} La primera asociación genética, basada en la metodología caso-control, descrita para LES fue con el antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés: *Human Leucocyte Antigen*), localizado en la región 6p21.3, región que codifica para más de 200 genes que en su mayoría participan en la respuesta inmunológica. Se encontró la asociación significativa de siete alelos con LES.¹⁵ En 2008 fueron identificadas variantes en el transductor de señales y activador de la transcripción 4 (*STAT4*, por sus siglas en inglés: *Signal Transducer and Activator of Transcription 4*) como factores de riesgo para el desarrollo de este padecimiento. Posteriormente, Taylor, et al²⁵ evaluaron la asociación del SNP rs7574865 con diversas manifestaciones de LES, encontrándose asociado a daño renal (OR=1.5).

En años más recientes se ha reportado un mayor número de genes candidato que confieren susceptibilidad a LES, dentro de los cuales se pueden mencionar: el gen de la Familia de IKAROS del Dedo de Zinc 1 (*IKZF1*, por sus siglas en inglés: *IKAROS Family Zinc Finger 1*), el Receptor Tipo Toll-9 (*TLR9*, por sus siglas en inglés: *Toll Like Receptor 9*), la Proteína Tirosina Fosfatasa no Receptora-22 (*PTPN22*, por sus siglas en inglés: *Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 22*), la Tirocin Kinasa C-Src (*CSK*, por sus siglas en inglés: *C-Src Tyrosine Kinase*), el gen de interleucina-10 (IL-10), entre otros.¹⁴

Por medio de estudios de GWAS y de genes candidato, se identificaron los genes *IRAK1*, *TREX1*, *IRF5* y el gen de TNF- α Inducido por Proteína 3 (*TNFAIP3*, por sus siglas en inglés: *TNF Alpha Induced Protein 3*), como reguladores de la producción de interferón tipo-I (IFN-I).^{13,14}

La sobre-expresión de IFN-I promueve la producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias, la maduración de las células dendríticas, la activación de células B y T auto-reactivas, la producción de auto-anticuerpos y la pérdida de una auto-tolerancia, síntomas muy característicos de este padecimiento.

Se ha reportado que individuos de origen étnico africano e hispano presentan un mayor riesgo para desarrollar la enfermedad. Aunque en los estudios realizados en pacientes pediátricos se han replicado variantes genéticas reportadas en LESa, aún no se puede explicar cómo éstas repercuten en las diferencias en la gravedad y edad de inicio de los síntomas entre pacientes pediátricos y adultos. ²²

En pacientes pediátricos se ha reportado una deficiencia en componentes del sistema del complemento, principalmente en C1q que produce defectos en la eliminación de material necrótico ²⁶ y que confiere un 90 % de riesgo de presentar síntomas parecidos al lupus durante etapas tempranas de la vida. Otra asociación es la deficiencia de C4, que disminuye la eliminación de linfocitos B auto-reactivos ²⁶ y con una relación del 75 % a LES. ²²

I.4- Haplotipo de riesgo *IRAK1-MECP2* en LES

Como ya se mencionó, existen diferentes genes asociados a LES. En un estudio reciente se demostró que existe un haplotipo de riesgo en la región Xq28, específicamente en el gen de la cinasa-1 asociada al receptor de interleucina-1 (*IRAK1*, por sus siglas en inglés: *Interleukin-1 Receptor Associated Kinase-1*) y el gen de la proteína 2 de unión a sitios CpG metilados (*MECP2*, por sus siglas en inglés: *Methyl-CpG-binding protein 2*) ²⁷, los cuales se encuentran adyacentes y en desequilibrio de ligamiento (LD, por sus siglas en inglés: *Linkage Disequilibrium*), es decir, los alelos co-segregan de generación en generación.

También se llevó a cabo una prueba condicional de otras variantes de la misma región, Xq28, en otros siete genes (*L1CAM*, *AVPR2*, *ARHGAP4*, *NAA10*, *RENBP* y *HCFC1*) utilizando 15783 individuos (caso-control) divididos en 4 categorías: europeos-americanos, africanos-americanos, asiáticos e hispanos. Se determinó

que un haplotipo, H1, compuesto por 34 SNPs (**Figura 3**), confería riesgo a LES en todas las poblaciones estudiadas.

rs2269368 ⁵	ARHGAP4	rs2071129	NAA10	rs2071130	NAA10	rs5945377	RENBP	rs5945378	RENBP	rs4898374	TMEM167	rs13397	TMEM167	rs4898375	rs633	rs12400188	rs3027896	rs731642	IRAK1	rs2239673 ⁸	IRAK1	rs763737 ⁸	IRAK1	rs1059703	IRAK1	rs5945174 ⁸	IRAK1	rs7061789 ⁸	IRAK1	rs1059702	IRAK1	rs1059701	IRAK1	rs2734647	MECP2	rs2075596 ^b	MECP2	rs4898467	MECP2	rs1734790	MECP2	rs909131	MECP2	rs17435 ^b	MECP2	rs1624766 ^b	MECP2	rs1734787 ^b	MECP2	rs1616369	MECP2	rs1734791 ^b	MECP2	rs1734789	MECP2	rs1734792 ^b	MECP2	rs2239464 ^b	MECP2	rs5945393	MECP2	rs2872736	Haplotype	SLE	CTRL	P
T	G	C	C	G	T	A	A	C	G	C	A	C	G	G	G	G	G	G	G	A	G	T	A	G	C	G	T	C	C	A	T	G	A	A	G	C	H1	17.4%	13.3%	3.8E-09																										
C	T	T	G	A	G	G	G	T	A	A	G	T	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	C	G	A	A	A	A	T	A	G	A	A	C	G	A	T	H2	78.8%	82.8%	7.6E-08																									
T	G	C	C	G	T	A	A	C	G	C	A	C	G	G	G	G	G	G	A	G	T	A	G	C	G	T	C	C	A	T	G	A	A	G	C	H1	69.1%	64.2%	1.7E-04																											
C	T	T	G	A	G	G	G	T	A	A	G	T	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	C	G	A	A	A	A	T	A	G	A	A	C	G	A	T	H2	13.6%	19.3%	1.6E-06																									
T	G	C	C	G	T	A	A	C	G	C	A	C	G	G	G	G	G	A	G	T	A	G	C	G	T	C	C	A	T	G	A	A	G	C	H1	52.1%	40.1%	1.4E-09																												
C	T	T	G	A	G	G	G	T	A	A	G	T	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	C	G	A	A	A	A	T	A	G	A	A	C	G	A	T	H2	40.6%	53.4%	4.6E-05																									
--	G	C	C	--	T	A	A	C	G	C	--	C	G	--	G	G	A	G	T	A	--	--	G	T	C	C	A	T	G	A	A	G	--	H1	6.3%	4.3%	4.9E-04																													
--	T	T	G	--	G	G	G	T	A	A	--	T	A	--	A	A	G	A	C	G	--	--	A	A	T	A	G	A	A	C	G	A	--	H2	19.5%	18.9%	0.322																													

Figura 3. Haplotype de riesgo para LES. El haplotipo H1, que involucra el alelo menor, A, en el SNP rs1059702, fue el asociado como riesgo para LES en las cuatro poblaciones estudiadas, Europeos Americanos (EA), Asiáticos (AS), Hispanos Americanos (HA) y Africanos Americanos (AA), tanto en pacientes como en controles. Tomada de ²⁷

Se determinó que en la región *TMEM187-IRAK1-MECP2* (**Figura 4**) se encuentran seis SNPs que presentaban la mayor asociación (rs13397, rs4898375, rs1059702, rs2734647, rs2075596 y rs1616369). De esta manera, se identificó al SNP rs1059702 (localizado en el exón 5 de *IRAK1*) como la variante causal con mayor asociación, ya que en un meta-análisis este SNP mostró el valor de *P* más significativo ($P=1.3 \times 10^{-27}$, OR=1.43). Se describió también que el genotipo homocigoto para alelo menor (AA) confiere un cambio de aminoácido, S196F, a la proteína IRAK1, sugiriendo una alteración de su función, lo que conlleva a un incremento en la actividad de NF- κ B, relacionando esto último con un incremento en el riesgo para desarrollar LES. ²⁷

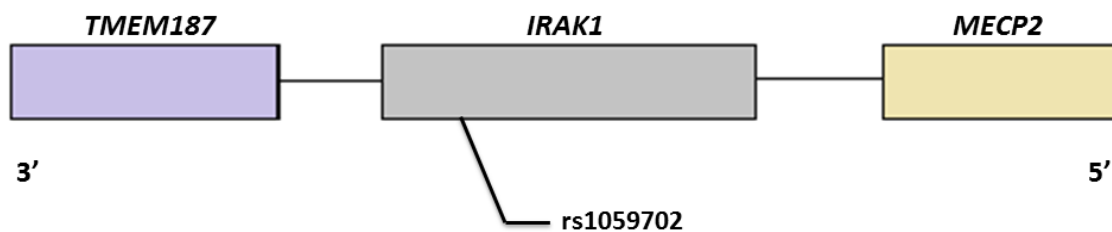


Figura 4. Región *TMEM187-IRAK1-MECP2*. El gen de *IRAK1*, localizado en Xq28, se encuentra aledaño al gen de *MECP2*, está compuesto por 14 exones, el SNP rs1059702 se localiza en el exón 5 y confiere un cambio de aminoácido, S196F.

De manera interesante, se encontró que este SNP correlaciona con el aumento de los niveles de mRNA de *MECP2* en pacientes con LES y controles, pero no de *IRAK1*, por lo que se sugiere que el efecto sea de otro SNP que se encuentre en LD con rs1059702 y afecte directamente la expresión de *MECP2*, sin embargo, aún no se han realizado estudios al respecto.

En la **Tabla 3** se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs1059702 obtenidas en estudios previos en diferentes poblaciones y enfermedades autoinmunes.

Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas previamente reportadas del SNP rs1059702 en distintas poblaciones adultas. Los datos se obtuvieron de estudios de asociación de este polimorfismo con diferentes enfermedades.

Enfermedad	LES		LES		LES		LES		LES		ES		ES		AR	
Población	Hispana ²⁷		Europea ²⁷		Africana ²⁷		Asiática ²⁷		China ²⁸		Caucásica ²⁹		Caucásica ³⁰		Coreana ³¹	
	Controles (N=807)	Casos (N=1487)	Controles (N=3462)	Casos (N=3915)	Controles (N=1920)	Casos (N=1674)	Controles (N=1256)	Casos (N=1262)	Controles (N=665)	Casos (N=665)	Controles (N=2530)	Casos (N=2890)	Controles (N=2217)	Casos (N=1808)	Controles (N=1016)	Casos (N=1303)
Frecuencias alélicas (%)																
A	39	51	15	19	4	6	75	82	77	83	15	16	16	17	73	78
G	61	49	85	81	96	94	25	18	23	17	85	84	84	83	27	22
Frecuencias genotípicas (%)																
A/A	15	26	3	4	0	1	56	67	61	69	3	4	3	4	56	63
A/G	48	50	25	31	8	11	38	30	33	28	24	25	25	27	34	30
G/G	37	24	72	65	92	88	6	3	6	3	73	71	72	69	10	7

LES: Lupus Eritematoso Sistémico, **ES:** Esclerosis Sistémica, **AR:** Artritis Reumatoide

Se observa que en poblaciones asiáticas el genotipo de riesgo (AA) es más frecuente. El hecho de que este genotipo se encuentre con mayor frecuencia en ciertas poblaciones que otras, sugiere que existe un componente genético propio de cada población. Aún y cuando el SNP rs1059702 ha sido estudiado en población de origen hispano no se ha estudiado en población mexicana con LESp.

I.5.- Cinasa-1 asociada al receptor de interleucina-1 (IRAK1)

El gen de *IRAK1* se localiza en el cromosoma Xq28 y consta de 14 exones. Como su nombre lo indica, IRAK1 es una cinasa que participa en la vía de señalización que tiene como resultado la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B; juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmunológica, modulando la expresión de citocinas y mediadores pro-inflamatorios.³² También se relaciona con la vía de señalización de los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés: *Toll-like Receptor*) y de los receptores de Interleucina 1 (IL-1R, por sus siglas en inglés: *Interleukin-1 Receptor*). Al activarse el TLR por la presencia de algún estímulo, rápidamente es reclutada la proteína MYD88; posteriormente IRAK1 e IRAK4 se unen al complejo. IRAK4 fosforila a IRAK1, y este último, interacciona con TRAF6 facilitando la unión de diversas proteínas que fosforilan al modulador esencial de NF- κ B (NEMO, por sus siglas en inglés: *NF- κ B Essential Modulator*) conformado con subunidades α y β (IKK), que fosforila a los inhibidores de NF- κ B (I κ B, por sus siglas en inglés: *Inhibitors of NF- κ B*) son fosforilados por IKK, dirigiéndolos a ubiquitinación y degradación.³² Posteriormente los factores P50 y P65 (NF- κ B) se translocan al núcleo. **(Figura 5)** De esta manera, NF- κ B promueve la transcripción de citocinas y otros mediadores de la inflamación, jugando un papel importante en el sistema inmune, por lo que ha sido considerado gen candidato para la susceptibilidad a LES.

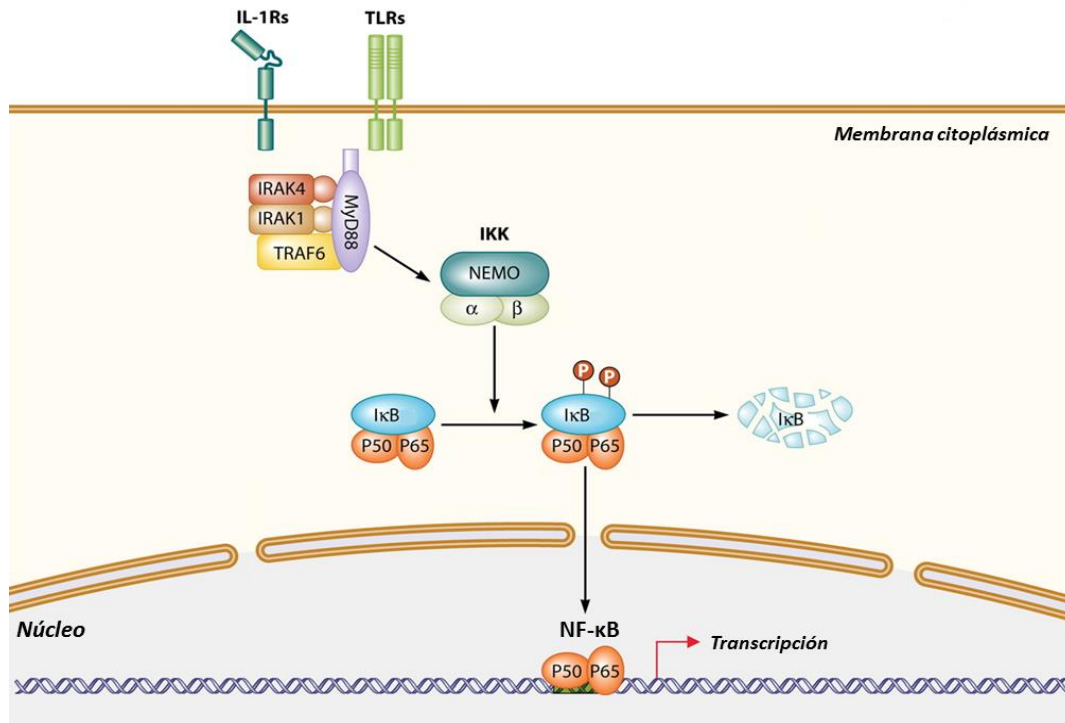


Figura 5. Vía de señalización de IRAK1. Al activarse el TLR o el receptor de interleucina-1 (IL-1R), rápidamente es reclutada la proteína MYD88; posteriormente IRAK1 e IRAK4 se unen al complejo. IRAK4 fosforila a IRAK1, y este último, interacciona con TRAF6 facilitando la unión de diversas proteínas que fosforilan al modulador esencial de NF-κB (NEMO) conformado con subunidades α y β (IKK); este complejo es activado y fosforila a los inhibidores de NF-κB (IκB), dirigiéndolos a ubiquitinación y degradación. Posteriormente los factores P50 y P65 (NF-κB) se translocan al núcleo. Tomada y modificada de ³³

En un estudio realizado en 2009 por Jacob y colegas ³⁴, se trató de demostrar la asociación de *IRAK1* con LES. Se realizó un estudio caso-control utilizando 13 SNP; se incluyeron 769 pacientes pediátricos, 5337 pacientes adultos y 5317 controles, cada grupo compuesto por cuatro poblaciones con diferente origen étnico (americanos europeos, afroamericanos, asiáticos americanos e hispanos americanos). Cinco SNPs mostraron una asociación significativa a LES (rs2239673, rs763737, rs3027907, rs5945174 y rs7061789), de los cuales tres mostraron asociación tanto en individuos con LESp como LESa (rs2239673, rs763737 y rs7061789). Los análisis en las diferentes poblaciones mostraron que el haplotipo GGGG (definido como “G” en rs2239673, rs763737, rs5945174 y rs7061789) se asocia significativamente a LES en tres de las cuatro poblaciones

(exceptuando la asiática), tanto en niños como en adultos. En contraparte, el haplotipo AAAA se asoció a protección.³⁴

Otro estudio caso-control se realizó en población china, en el cual se utilizaron 667 pacientes (591 mujeres y 76 hombres) y 667 controles (589 mujeres y 78 hombres), donde se evaluaron dos SNPs, rs3027898 y rs1059702. Se observó una asociación significativa de ambos para LES, rs3027898 (OR=1.438, $P<0.001$) y rs1059702 (OR=1.383, $P=0.001$).²⁸

Estos estudios demostraron la asociación de *IRAK1* con la susceptibilidad a LES en diferentes poblaciones.

I.6.- Proteína 2 de unión a sitios CpG metilados (MECP2)

La célula presenta diversos mecanismos por los cuales regula su expresión génica, es decir, el silenciamiento o sobreexpresión de genes. Algunos de estos mecanismos son las modificaciones epigenéticas, las cuales incluyen modificaciones químicas en el DNA, en específico las citosinas. La metilación del DNA ocurre sobre el carbono 5 de la citosina, mediante la acción de la DNA-metil transferasa (DNMT, por sus siglas en inglés: *DNA Methyl Transferase*), principalmente en las llamadas islas CpG, que son regiones en el DNA en donde es más abundante la presencia de la citosina (C) seguida de una guanina (G). Las islas CpG se localizan principalmente en las regiones promotoras de genes constitutivos, y cuando se encuentran metiladas, se reprime la expresión de estos; en contraste, en los promotores con islas CpG no metiladas, la expresión de estos genes se ve altamente favorecida.³⁵

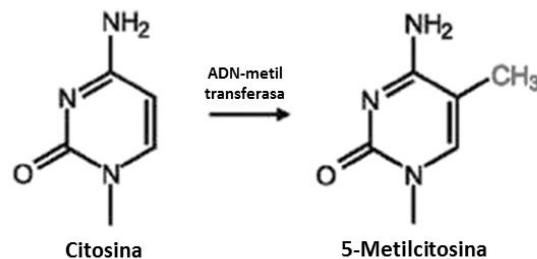


Figura 6. Metilación de la citosina en el carbono 5 debido a la acción de DNA-metil transferasa (DNMT, por sus siglas en inglés: *DNA Methyl Transferase*)

El gen *MECP2* también se localiza la región en Xq28, consta de cuatro exones y codifica para la proteína de unión a sitios metilados, MECP2, la cual actúa como represor transcripcional al unirse a los grupos metilo presentes en el DNA. Lo anterior lleva al reclutamiento de las enzimas desacetilasas de histonas (HDAC, por sus siglas en inglés: *Histone Deacetylase*) que incrementan la carga de atracción entre el DNA y las histonas, induciendo así a una configuración de la cromatina que es inaccesible para la maquinaria transcripcional.³⁶ MECP2 se expresa en todos los tejidos, principalmente en cerebro durante el desarrollo postnatal, y se encuentra reprimida durante etapas fetales.³⁷ Esta proteína posee dos dominios: uno de unión a sitios metilados (MBD, por sus siglas en inglés: *Methyl-CpG-Binding Domain*) que participa en el remodelamiento de la cromatina y otro de represión transcripcional (TRD, por sus siglas en inglés: *Transcriptional Repression Domain*). Este último recluta diversas proteínas tales como Sin3A, HDAC1, HDAC2, c-Ski, N-CoR, entre otras, formando un complejo que regula e impide la transcripción de diversos genes aledaños y por ende la síntesis de proteínas.³⁸

Se sabe que esta proteína tiene implicaciones muy importantes para mantener las funciones normales del cerebro, y una expresión alterada de esta conlleva a complicaciones neurológicas, la más común conocida como síndrome de Rett que se presenta en 1/10000-22000 nacimientos de mujeres. El síndrome de Rett se caracteriza por un detenimiento en el desarrollo, entre los 6 y 18 meses de edad, además de diversos síntomas clínicos como son microcefalia, autismo, ataxia, movimientos involuntarios de las manos e hiperventilación.³⁹

De manera interesante, se ha observado que la patogenia de LES, ya sea por enfermedad o inducida por algún fármaco, involucra algún defecto en la metilación del DNA de las células T, resultando en la sobre-expresión de algunos genes como *ITGAL* (CD11a), *TNFSF7* (CD70), *PRF1* (perforina), y *CD40LG* (CD40L). Las células T CD4⁺ tratadas con inhibidores de metilación, como 5-azacitidina, presentan un estado de metilación similar a las células T de un paciente con lupus; también se ha observado que *in vitro* éstas se tornan auto-reactivas, y son

capaces de lisar macrófagos, inducir la activación de células B y la producción de inmunoglobulinas.⁴⁵ Esto dio paso a investigar más a fondo acerca de *MECP2*, ya que en LES, al encontrarse el DNA en un estado de hipometilación, se podía indagar de qué manera repercutía esta situación en la proteína y tal vez podría encontrarse alguna relación con los síntomas de esta enfermedad.

En un estudio realizado por Webb y colegas se identificaron variantes en el gen *MECP2*. Se utilizó un grupo de 1377 pacientes con LES de descendencia europea (1293 mujeres y 84 hombres) y 1853 controles (1097 mujeres y 756 hombres). Se encontraron varios SNPs con una alta asociación, principalmente los SNPs rs3027933, rs1734791, rs1734792, rs1734787 y rs2075596, todos con $OR > 1$ y un valor de $p < 0.05$. Además, se identificó el haplotipo de riesgo “ACTGCAAA” ($OR = 1.38$, 95% CI= 1.19–1.60, $P = 2.36 \times 10^{-5}$), mientras que el haplotipo “GGAAATCG” fue considerado de protección ($OR = 0.82$, 95% CI= 0.72–0.93, $P = 0.0022$). Se identificaron 128 genes que eran diferencialmente expresados en individuos portadores del haplotipo de riesgo, de los cuales 104 se sobre-expresan y 24 se sub-expresan, y se relacionó con niveles mayores de *CREB1* ($P = 0.04$) y menores niveles de *HDAC1* ($P = 0.018$)⁴⁰

Por otro lado, en un estudio caso-control realizado en la población coreana se genotipificaron 8 SNPs localizados en *MECP2* en 628 pacientes con LES y 736 controles, donde se encontraron asociaciones de riesgo para los SNPs rs17435 ($OR = 1.58$, $P = 1.8 \times 10^{-6}$), rs1734787 ($OR = 1.55$, $P = 3.4 \times 10^{-6}$), rs1734792 ($OR = 1.53$, $P = 5.4 \times 10^{-6}$) y rs1734791 ($OR = 1.51$, $P = 1.5 \times 10^{-5}$). El haplotipo “ACTGCAAA” fue identificado como de riesgo en un 82.3% en pacientes con LES y en un 75.3% controles ($OR = 1.53$, $P = 1.3 \times 10^{-5}$). Por otra parte, el haplotipo “GGAAATCG” fue denominado de protección con una frecuencia de 16.8% en pacientes con LES y en un 23.4% en controles ($OR = 0.66$, $P = 2.7 \times 10^{-5}$).

De esta manera, ambos estudios demostraron que *MECP2* también confiere riesgo para el desarrollo de LES.⁴¹

II. Justificación

El polimorfismo rs1059702 se ha reportado previamente como la variante causal del haplotipo de riesgo IRAK1-MECP2 en poblaciones con diferente origen étnico. Debido a que la población mestiza presenta un componente genético heterogéneo y debido a la diferencia de aporte genético entre los pacientes con LESp y LESa, resulta interesante estudiar esta variante genética en pacientes mexicanos con LESp.

III. Materiales y métodos

III.1.- Población de estudio

En el presente estudio se incluyeron 437 pacientes con LESp, provenientes del Centro Médico Nacional Siglo XXI y del Instituto Nacional de Pediatría. Un médico reumatólogo o inmunólogo evaluó a los pacientes, llenando una hoja de captación de datos. Para el estudio de tríos, se incluyeron muestras de padre y madre de algunos pacientes. Para los controles se incluyeron a individuos mayores de 18 años que no refirieron alguna enfermedad autoinmune o crónica. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes. El estudio contó con la autorización de los comités de ética, bioseguridad e investigación de las instituciones participantes.

- **Criterios de inclusión**

Se incluyeron pacientes mexicanos con LESp diagnosticados antes de los 16 años de edad, que cumplieran con al menos 4 de los 11 criterios de la clasificación establecida por la ACR, y cuyos tutores aceptaran firmar la carta de consentimiento informado o se contara con el asentimiento del paciente. Como controles se incluyeron individuos sanos, sin antecedentes de enfermedades autoinmunes (mediante la aplicación de un cuestionario). Los datos tanto de

pacientes como de controles fueron corregidos por ancestría determinada con marcadores informativos de ancestría (AIMs, por sus siglas en inglés: *Ancestry Informative Markers*) previamente establecidos para la población mexicana.⁴² Tanto para los casos como para los controles, se tomó como criterio de inclusión que las dos últimas generaciones hubieran nacido en México y que no refirieran antecedentes extranjeros.

- **Criterios de exclusión**

Se tomaron en cuenta los siguientes criterios de exclusión: pacientes con cualquier otra enfermedad crónica concomitante y que hubieran sido transfundidos en los últimos tres meses.

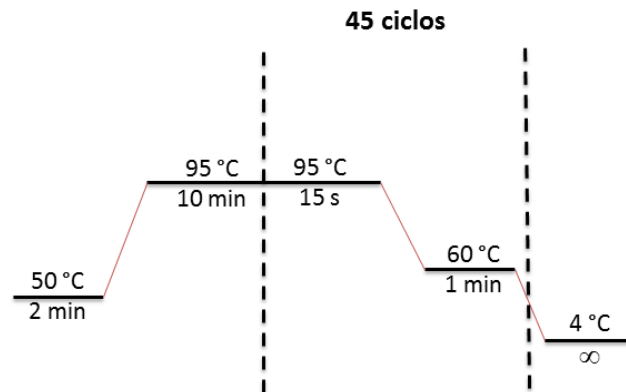
III.2.- Extracción de DNA

Se realizó la extracción de DNA a partir de sangre periférica utilizando el *kit Gentra Puregene* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del proveedor. En breve, la muestra se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, se extrajo el plasma y se transfirió la sangre a un tubo de 15 mL. Se agregaron 5 mL de solución de lisis RBC (por sus siglas en inglés: *Red Blood Cell*) al tubo con sangre remanente y nuevamente fueron transferidos al tubo de 15 mL. Se ajustó a un volumen final de 14 mL con la solución de lisis RBC, se mezcló y se dejó incubando durante 15 min. Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón de células blancas con la solución remanente. Se agregaron 3 mL de solución de lisis celular, se mezcló vigorosamente. Posteriormente, se agregó 1 mL de solución de precipitación de proteínas y se mezcló en vórtex durante 30 s. Se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante a un nuevo tubo de 15 mL. Se agregó isopropanol al 100% en relación 1:1 y se agitó por inversión. Se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min, se desechó el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol al 70%. Se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante y se

dejó secar el botón a temperatura ambiente aproximadamente 4 h. Finalmente, el botón se resuspendió en 300 μ L de amortiguador TE. Posteriormente se realizó la cuantificación de DNA utilizando el espectrómetro Nanodrop (ND 1000), considerando un DNA de calidad al obtener los valores de absorbancia 260/280 y 260/230 mayores a 1.8.

III.3.- Genotipificación

La genotipificación se llevó a cabo por discriminación alélica, utilizando el método de sonda TaqMan para genotipificación (Applied Biosystems) para el SNP rs1059702 (C__8966367_30). Para cada reacción se utilizaron: 25 ng de DNA genómico de cada muestra, 2.5 μ L de TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X) y 0.125 μ L de la sonda SNP Genotyping Assay (40x). Los ensayos se llevaron a cabo en el termociclador ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) utilizando el siguiente termociclaje:



III.4.- Determinación de frecuencias alélicas y genotípicas

Para los datos de genotipificación se obtuvo un “call rate” >95%. Se observó que las frecuencias estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg. Posteriormente se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas. Se compararon con las frecuencias previamente reportadas para este SNP en poblaciones continentales,

en la base de datos 1000 genomas ⁴³, en americanos, africanos, europeos, asiáticos, y con estudios previamente realizados en subpoblaciones.

III.5.- Análisis de asociación

Para el análisis de asociación caso: control se utilizó el programa gPLINK ⁴⁴ realizando una regresión lineal logística, con un intervalo de confianza (IC) del 95%, corrigiendo por género y ajustando por la prueba de Bonferroni. Además, se realizó una corrección por ancestría utilizando AIMS, previamente descritos, para la población mexicana y que se determinaron en las muestras de pacientes con LESp mediante un microarreglo de genotipificación Golden Gate (Illumina). ⁴⁵ El análisis de desequilibrio de transmisión (TDT, por sus siglas en inglés: *Transmission Disequilibrium Test*) se llevó a cabo utilizando el programa Haploview. ⁴⁶ Para todos los análisis estadísticos se consideraron valores significativos con $P < 0.05$.

IV. Resultados

IV.1.- Genotipificación del SNP rs1059702

Se realizó la genotipificación del SNP rs1059702 en 417 pacientes con LESp y 434 controles, mientras que para el análisis de TDT se genotipificaron 212 tríos (compuestos por madre, padre e hijo afectado) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Datos obtenidos al genotipificar el SNP rs1059702

SNP	Pacientes	Controles	Tríos	Pacientes con datos de nefritis
rs1059702	417	434	212	287 con nefritis, 130 sin nefritis

IV.2.- Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs1059702

Para determinar la distribución de las frecuencias alélicas (A y G) y genotípicas (AA, AG y GG) en la población mexicana, primero estas fueron determinadas en los controles y se compararon con las reportadas para poblaciones continentales, americanos, europeos, africanos y asiáticos en la base de datos 1000 Genomas⁴³. Debido a que el aporte europeo al genoma mestizo mexicano es principalmente español, se incluyó la población ibérica de 1000 Genomas, y se incluyó la población mexicana residente en Los Ángeles, California, reportada en la misma base (**Tabla 5**).

Tabla 5. Frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs1059702 de la población control. Se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas de la población control y la comparación con los datos reportados de poblaciones continentales.

SNP: rs1059702 (A/G)								
Población (%)								
Alelo	Controles (N=434)	AMR (N=347)	MXL (N=64)	EUR (N=503)	IBS (N=107)	EAS (N=504)	AFR (N=661)	YRI (N=108)
A	56	43	40	15	14	78	3	2
G	44	57	60	85	86	22	97	98
Genotipo								
A/A	41	29	25	7	7	69	2	1
A/G	29	26	28	15	13	18	3	2
G/G	30	45	47	78	80	13	95	97

AMR: población americana. **AFR:** población africana. **EAS:** población asiática. **EUR:** población europea. **IBS:** individuos de la región ibérica de España. **MXL:** individuos con ancestría mexicana residentes en Los Angeles, California, EE.UU. **YRI:** población de la tribu Yoruba, residentes en Ibadan, Nigeria. Datos publicados en 1000 Genomas

En la población control estudiada se observó que el alelo A se encuentra ligeramente en mayor proporción respecto al alelo G; de igual manera se observa el mismo comportamiento para el genotipo homocigoto (A/A), mientras que el genotipo heterocigoto (A/G) y homocigoto para el otro alelo (G/G) la proporción es la misma.

Al comparar las frecuencias alélicas obtenidas (A: 56%, G: 44%) con respecto a las de las poblaciones continentales, se observa una notoria diferencia, principalmente con europeos (A: 15%, G: 85%) y africanos (A: 3%, G: 97%), siendo más parecidas a las de los asiáticos (A: 78%, G: 22%), aunque todavía distan de ser similares; en las frecuencias genotípicas ocurre la misma tendencia:

controles (A/A: 41%, A/G: 29%, G/G: 30%), europeos (A/A: 7%, A/G: 15%, G/G: 78%), africanos (A/A: 2%, A/G: 3%, G/G: 95%) y asiáticos (A/A: 69%, A/G: 18%, G/G: 13%).

Debido a que este SNP ha sido previamente asociado a LES en otras poblaciones, se decidió comparar las frecuencias alélicas y genotípicas, de casos y controles, con los datos previamente reportados (**Tabla 3**). Al comparar las frecuencias obtenidas en los casos en nuestra población (A: 64%, G: 36%) con caucásicos (A: 16%, G: 84%), chinos (A: 83%, G: 17%) y africanos (A: 6%, G: 94%), se aprecia que siguen la misma tendencia que con los datos de 1000 genomas, parecidos a la población asiática (chinos) pero aún diferentes y totalmente opuestos a europeos (caucásicos) y africanos. Una comparación directa de la población mexicana de este estudio se realizó con la población de origen hispano, debido a la similitud genética resultado del mestizaje (**Tabla 6**).

Tabla 6. Comparación de frecuencias alélicas y genotípicas del SNP rs1059702 en población mexicana y de origen hispano. Se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas de la población mexicana estudiada y la comparación con los datos reportados en el estudio caso-control en lupus del polimorfismo rs1059702 en población hispana.

SNP: rs1059702 (A/G)				
Frecuencias (%)				
Alelo	MEX		HIS	
	Controles (N=434)	Casos (N=417)	Controles (N=807)	Casos (N=1487)
A	56	64	39	51
G	44	36	61	49
Genotipo				
A/A	41	45	15	26
A/G	29	37	48	50
G/G	30	18	37	24

HIS: población hispana, **MEX:** población mexicana.

Las frecuencias alélicas distan de ser similares tanto en controles (MEX. A: 56%, G: 44%) vs (HIS. A: 39%, G: 61%), como en pacientes (MEX. A: 64%, G: 36%) vs (HIS. A: 51%, G: 49%), siendo más frecuente el alelo de riesgo (A) en población mexicana; esto mismo ocurre con el genotipo, donde la frecuencia del genotipo de riesgo (A/A) es mayor en población mexicana que en amerindios-europeos, donde el genotipo heterocigoto (A/G) es más frecuente en esta población.

IV.3.- Estudio de asociación caso:control

Debido al mestizaje europeo y amerindio, la población mestiza mexicana es genéticamente heterogénea, por lo que se realizó una corrección por ancestría, utilizando los dos primeros AIMs, los cuales proporcionan la mayor información de la ancestría. El estudio de asociación se realizó con el número total de pacientes y controles indicados en la **Tabla 4**. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Estudio de asociación caso-control con LESp. Se muestran los valores de *P* y OR (95% CI) para los ensayos, con y sin corrección por ancestría, utilizando AIMs.

Caso-Control rs1059702		
	<i>P</i>	OR (95% IC)
Por ancestría	<i>0.0016</i>	<i>1.401 (1.135-1.729)</i>
Sin ancestría	<i>0.0056</i>	<i>1.345 (1.090-1.658)</i>

P: valor de p de la regresión logística. **OR:** Odds Ratio. **IC:** Intervalo de Confianza.

Para ambos casos se obtuvo un valor de $P < 0.05$, por lo que los datos tienen un valor significativo, mientras que el OR, de igual manera para ambos casos, fue mayor a 1, lo que nos indica que este polimorfismo está asociado a riesgo para LESp en pacientes mexicanos.

IV.4.- Estudio de asociación a NL

La NL es una de las complicaciones más frecuentes en LES. Con el fin de observar la asociación del SNP con la gravedad de la enfermedad, se realizó el mismo estudio de asociación ahora en pacientes con LESp con y sin NL, en un

total de 417 individuos (287 con nefritis/130 sin nefritis). Los resultados se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Estudio de asociación del SNP rs1059702 con NL. Se muestran los valores de *P* y OR (95% IC) para los ensayos: sin corrección y con corrección por ancestría utilizando AIMS.

SNP	Asociación a Nefritis		
		<i>P</i>	OR (95% IC)
rs1059702	Por ancestría	0.0010	1.886 (1.291-2.756)
	Sin ancestría	0.0056	1.437 (1.029-2.007)

P: valor de P de la regresión logística. **OR:** Odds ratio. **IC:** intervalo de confianza.

Para ambos casos se obtuvo un valor de $P < 0.05$, por lo que los datos tienen un valor significativo, mientras que el OR, de igual manera para ambos casos, fue mayor a 1, lo que nos dice que este polimorfismo, también, es un factor de riesgo para el desarrollo de NL.

IV.5.- Estudio de TDT del SNP rs1059702.

Se realizó el análisis de TDT, prueba estadística que se basa en el análisis de la frecuencia de los alelos transmitidos de padres heterocigotos a los hijos afectados y la frecuencia de los alelos no transmitidos (**Tabla 9**).

Tabla 9. Análisis de TDT. Se muestra el alelo sobre-transmitido, las frecuencias de transmisión y no transmisión y el valor de *P* para el ensayo del SNP rs1059702.

SNP	Alelo sobre-transmitido	T:U	P
rs1059702	A	51:34	0.0652

P: valor de p del ensayo χ^2 . **T:U:** Frecuencias de transmisión:frecuencias de no transmisión

Se observó que el alelo A se encuentra sobre-transmitido, aunque los resultados no fueron significativos ya que se obtuvo una $P > 0.05$

V. Discusión

La variante genética rs1059702 ha sido previamente descrita como variante causal del haplotipo de riesgo IRAK1-MECP2 para LES en poblaciones con distintos orígenes étnicos. Debido a que la población mexicana presenta un componente genético heterogéneo, es de suma importancia estudiar esta variante en pacientes con LESp, indagar en qué proporción se encuentran distribuidos los alelos este polimorfismo y su asociación con LES. En el presente estudio se realizó una genotipificación por medio de discriminación alélica utilizando el método de sonda TaqMan en 851 individuos, de los cuales, 434 fueron controles y 417 pacientes pediátricos con LES.

Al comparar las frecuencias alélicas de los controles (A: 56%, G: 44%) con aquellas reportadas en la base de datos de 1000 genomas, se observa una diferencia importante en la distribución de las frecuencias alélicas con respecto a los africanos (A: 3%, G: 97%), seguidos de los europeos (A: 15%, G: 85%); en las cuales el alelo de riesgo (A) es menos frecuente, mientras que en la población asiática se encuentra es más frecuente (A: 78%, G: 22%). Aún más, al compararla con las frecuencias alélicas reportadas para los mexicanos residentes en Los Angeles, California (A: 40%, G: 60%) y población mestiza con antecedente

amerindio y europeo (A: 43%, G: 57%), se observa que la proporción alélica la población del presente estudio se encuentra invertida con respecto a estas. Lo anterior podría explicarse, en parte, por las diferencias en el componente genético de las poblaciones, por ejemplo, el hecho que la población mexicana residente en L.A., California tenga un componente más heterogéneo que la población mestiza del presente estudio, debido a que esta población está compuesta por individuos provenientes de distintas regiones del país que migran a los Estados Unidos.

En lo que respecta a los genotipos, estos siguen la misma tendencia que las frecuencias alélicas, diferenciándose de manera significativa tanto en europeos como en africanos; y lo contrario se observa en mexicanos residentes en L.A., California.

Asimismo, al comparar las distribuciones alélicas entre casos y controles se observa una mayor frecuencia del alelo A en los casos con respecto a los controles, mientras que al comparar esta distribución con la reportada en un estudio previo realizado en población con origen hispano, compuesta por individuos mestizos con ancestría amerindia y europea, la cual es más parecida a la población mexicana, se observa también diferencia en las frecuencias en los controles (MEX. A: 56%, G: 44%) vs (HIS. A: 39%, G: 61%), en donde las frecuencias alélicas están también invertidas, siendo el alelo A más frecuente en la población de estudio. Sin embargo, al comprar a los casos (MEX. A: 64%, G: 36% vs HIS. A: 51%, G: 49%), aunque el alelo A sigue siendo más frecuente en los pacientes con LESp de este estudio, la distribución alélica es igual al de la población amerindia-europea. Tomando en cuenta las frecuencias genotípicas, se observa que el genotipo de riesgo (A/A) sigue siendo más frecuente en mexicanos, mientras que el genotipo heterocigoto (A/G) lo es en mestizos.

Por otra parte, en el estudio de asociación caso: control del SNP se obtuvo un $OR=1.345$ y $P=0.0056$, por lo que se encuentra asociado al riesgo a LESp. Además, estos resultados se replicaron al corregir por ancestría, lo que evita un sesgo debido al componente étnico heterogéneo en nuestra población. De manera

interesante, también se encontró asociación con NL, tanto con corrección por ancestría (OR=1.886; $P=0.0010$) como sin corrección (OR=1.437; $P=0.0056$) por lo que esta variante también se asocia con el daño renal, y por lo tanto con la gravedad de ésta.

Por otro lado, el resultado obtenido en el estudio TDT mostró que el alelo de riesgo se transmitió de padres a hijos en un 51% de los casos; como resultado estadístico se obtuvo $P=0.0652$ lo que indica que estos datos no son significativos.

El hecho que el alelo A presente una mayor frecuencia en la población mexicana con respecto a las demás poblaciones, y que exista una asociación significativa de este tanto a LESP como a NL, sugiere que el efecto biológico de esta variante genética podría ser de suma importancia para el desarrollo de LES en nuestra población. Al respecto, se sabe que este cambio de nucleótido (A→G) es no sinónimo, ya que confiere un cambio de aminoácido de serina a fenilalanina en la posición 196 (S196F), lo que lleva a su vez a un cambio en la estructura primaria de la proteína de IRAK1, aumentando los niveles de NF- κ B que se transloca al núcleo. También se ha asociado a niveles bajos del mRNA de MECP2, por lo que podría tener relevancia en la regulación epigenética en los pacientes con LES.

En un estudio previo, se demostró que la presencia del alelo A del rs1059702 aumenta los niveles de NF- κ B en comparación con la presencia del alelo G. Sin embargo, se debe de tomar en cuenta que esta variante se ha asociado con otros polimorfismos, los cuales se encuentran en LD con éste, y en conjunto conforman un haplotipo localizado en la región de *IRAK1*. Este haplotipo está conformado por 5 SNPs intrónicos: rs3027898 (T/G), rs731642 (G/A), rs2239673 (T/C), rs5945174 (A/G) y rs7061789 (A/G); y 3 SNPs exónicos: rs1059701 (G/A) [sinónimo], rs1059702 (G/A) [no sinónimo, S196F] y rs1059703 (A/G) [no sinónimo, L532S].

⁴⁷ Se ha sugerido que los polimorfismos que conllevan a un cambio de aminoácido (rs1059702 y rs1059703) actúan en conjunto, y que estos cambios repercuten en el arreglo estructural de la proteína, dando como resultado una proteína IRAK1 que interacciona menor tiempo con IRAK4, de esta manera IRAK1 puede reclutar rápidamente a TRAF6 y continuar más rápidamente con la vía de señalización ⁴⁷,

de esta manera se refleja un aumento de translocación de NF-κB al núcleo. Con base en lo anterior, podemos sugerir que en los pacientes con LESp se encuentra este haplotipo presente en la región de IRAK1.

La translocación de NF-κB al núcleo juega un papel importante en la respuesta inmunológica, ya que modula la expresión de citocinas y otros mediadores de la inflamación.³² Al presentarse una mayor cantidad de NF-κB, este promueve la producción de citocinas pro-inflamatorias; la presencia de auto-antígenos mantiene la respuesta inmune activa y por ende NF-κB seguirá promoviendo la producción de citocinas, lo que podría explicar la relación de este SNP con la presencia de NL en los pacientes. Cabe recordar que en pacientes pediátricos los síntomas son más graves y agudos, en comparación con los adultos. Además, NF-κB también regula la inflamación, induciendo apoptosis en neutrófilos,⁴⁸ sin embargo, este aporte sería mínimo en comparación con todas las anormalidades inmunológicas presentes en LES.

Todavía se desconoce el mecanismo por el cual disminuyen los niveles de mRNA de MECP2 por la presencia de este SNP, se cree que puede estar relacionado con algún otro polimorfismo que, en conjunto, afecten directamente la expresión de este gen.²⁷ Como ya se mencionó anteriormente, en pacientes con LES existe un estado de hipometilación, lo que podría ser una contribución parcial de la disminución de la expresión de MECP2; no hay una regulación transcripcional adecuada y de ahí se podrían desencadenar las diversas anormalidades presentes en esta enfermedad.

Finalmente, de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, resulta interesante caracterizar las implicaciones funcionales de la variante rs1059702 en pacientes con LESp, para conocer más sobre la contribución de ésta a la patogenia del LES.

VI. Conclusiones

- El alelo de riesgo A, así como el genotipo homocigoto (AA) del SNP rs1059702 se encontró en una alta frecuencia en población mexicana. Esta diferencia en la distribución alélica y genotípica pudiera ser propia del origen étnico de la población mexicana.
- Se encontró una asociación del alelo menor, A, del SNP rs1059702, con LESP y NL.
- En el análisis de TDT se encontró que el alelo A se sobre-transmite de padres a hijos en una mayor frecuencia, sin embargo, esta no fue de manera significativa.

VII. Bibliografía

1. Yu, C., Gershwin, E. & Chang, C. Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: A critical review. *Journal of Autoimmunity* **48-49**, (2014).
2. Sarzi-Puttini, P., Atzeni, F., Iaccarino, L. & Doria, A. Environment and systemic lupus erythematosus: an overview. *Autoimmunity* **38**, 465–72 (2005).
3. Tsokos, G. C. Mechanisms of Disease: Systemic Lupus Erythematosus. *The New England Journal of Medicine* **365**, 2110–21 (2011).
4. Riemekasten & Hahn. Key autoantigens in SLE. *Rheumatology* **44**, 975–982 (2005).
5. Draborg, A., Duus, K. & Houen, G. Epstein-Barr Virus and Systemic Lupus Erythematosus. *Clin Dev Immunol* **2012**, 370516 (2012).
6. Zieve, G. & Khusial, P. The anti-Sm immune response in autoimmunity and cell biology. *Autoimmun Rev* **2**, 235–240 (2003).
7. Costenbader, K. & Karlson, E. Cigarette smoking and systemic lupus erythematosus: a smoking gun? *Autoimmunity* **38**, 541–7 (2005).
8. Lau, C., Yin, G. & Mok, M. Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: an overview. *Lupus* **15**, 715–719 (2006).
9. Grimaldi, C. M., Jeganathan, V. & Diamond, B. Hormonal regulation of B cell development: 17 beta-estradiol impairs negative selection of high-affinity DNA-reactive B cells at more than one developmental checkpoint. *J. Immunol.* **176**, 2703–10 (2006).
10. Saha, S., Tieng, A., Pepeljugoski, K., Zandamn-Goddard, G. & Peeva, E. Prolactin, systemic lupus erythematosus, and autoreactive B cells: lessons learnt from murine models. *Clin Rev Allerg Immu* **40**, 8–15 (2011).

11. Walker, S. Bromocriptine treatment of systemic lupus erythematosus. *Lupus* **10**, 762–768 (2001).
12. LeBien, TW & Tedder, TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* (2008). at <<http://www.bloodjournal.org/content/112/5/1570.short>>
13. Harley, I., Kaufman, K., Langefeld, C., Harley, J. & Kelly, J. Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* **10**, 285–290 (2009).
14. Mohan, C. & Putterman, C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nature Reviews Nephrology* **11**, 329–341 (2015).
15. Ceccarelli, F. *et al.* Genetic Factors in Systemic Lupus Erythematosus: Contribution to Disease Phenotype. *J Immunol Res* **2015**, 1–11 (2015).
16. Crispín, J. *et al.* Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol Med* **16**, 47–57 (2010).
17. Bush, W. & Moore, J. Chapter 11: Genome-wide association studies. *Plos Comput Biol* **8**, e1002822 (2012).
18. Patel, D. & Richardson, B. Epigenetic mechanisms in lupus. *Curr Opin Rheumatol* **22**, 478 (2010).
19. Okamoto, A., Fujio, K., Okamura, T. & Yamamoto, K. Regulatory T-Cell-Associated Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus. *Biomed Res Int* **2011**, 463412 (2011).
20. Krishnamurthy, S. & Mahadevan, S. Systemic Lupus Erythematosus: Recent Concepts in Genomics, Pathogenetic Mechanisms, and Therapies. *International Scholarly Research Notices* **2011**, (2011).

21. Morgan, T., Watson, L., McCann, L. & Beresford, M. Children and adolescents with SLE: not just little adults. *Lupus* **22**, 1309–19 (2013).
22. Mina, R & Brunner, HI. Pediatric lupus—are there differences in presentation, genetics, response to therapy, and damage accrual compared with adult lupus? *Rheumatic Disease Clinics of North America* (2010). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889857X09001331>>
23. Tucker, L. *et al.* Adolescent onset of lupus results in more aggressive disease and worse outcomes: results of a nested matched case-control study within LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA LVII). *Lupus* **17**, 314–322 (2008).
24. Borchers, A. T. *et al.* Lupus nephritis: a critical review. *Autoimmun Rev* **12**, 174–94 (2012).
25. Taylor, K. *et al.* Specificity of the STAT4 genetic association for severe disease manifestations of systemic lupus erythematosus. *Plos Genet* **4**, e1000084 (2008).
26. Manderson, A., Botto, M. & Walport, M. The Role of Complement in the Development of Systemic Lupus Erythematosus. *Immunology* **22**, 431–456 (2004).
27. Kaufman, KM, Zhao, J, Kelly, JA & Hughes, T. Fine mapping of Xq28: both MECP2 and IRAK1 contribute to risk for systemic lupus erythematosus in multiple ancestral groups. *Annals of the ...* (2012). at <<http://ard.bmj.com/content/early/2012/08/16/annrheumdis-2012-201851.short>>
28. Zhai, Y. *et al.* Association of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK1) gene polymorphisms (rs3027898, rs1059702) with systemic lupus erythematosus in a Chinese Han population. *Inflamm Res Official J European Histamine Res Soc Et Al* **62**, 555–60 (2013).

29. Carmona, F. *et al.* New insight on the Xq28 association with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* **72**, 2032–8 (2013).
30. Dieudé, P. *et al.* Evidence of the contribution of the X chromosome to systemic sclerosis susceptibility: association with the functional IRAK1 196Phe/532Ser haplotype. *Arthritis Rheum* **63**, 3979–87 (2011).
31. Han, T.-U. *et al.* Association of an activity-enhancing variant of IRAK1 and an MECP2-IRAK1 haplotype with increased susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **65**, 590–8 (2013).
32. Liu, G., Tsuruta, Y., Gao, Z., Park, Y.-J. & Abraham, E. Variant IL-1 Receptor-Associated Kinase-1 Mediates Increased NF- κ B Activity. *J Immunol* **179**, 4125–4134 (2007).
33. Picard, C., Casanova, J.-L. L. & Puel, A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or I κ B α deficiency. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 490–7 (2011).
34. Jacob, C. O. *et al.* Identification of IRAK1 as a risk gene with critical role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 6256–61 (2009).
35. Illingworth, R. & Bird, A. CpG islands--'a rough guide'. *Febs Lett* **583**, 1713–20 (2009).
36. Lombardi, LM & Baker, SA. MECP2 disorders: from the clinic to mice and back. *Journal of Clinical ...* (2015). at <http://search.proquest.com/openview/7d27d2c12d80e65fad99b768e8315e92/1?pq-origsite=gscholar>
37. Han, K. *et al.* Human-specific regulation of MeCP2 levels in fetal brains by microRNA miR-483-5p. *Genes & Development* **27**, 485–490 (2013).

38. Du, Q., Luu, P.-L. L., Stirzaker, C. & Clark, S. J. Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics* **7**, 1051–73 (2015).
39. Viana, M., Menezes, A., Moreira, M., Pissinatti, A. & Seuánez, H. MECP2, a gene associated with Rett syndrome in humans, shows conserved coding regions, independent Alu insertions, and a novel transcript across primate evolution. *BMC Genetics* **16**, 77 (2015).
40. Webb, R. *et al.* Variants within MECP2, a key transcription regulator, are associated with increased susceptibility to lupus and differential gene expression in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatism* **60**, 1076–1084 (2009).
41. Sawalha, A. H. *et al.* Common variants within MECP2 confer risk of systemic lupus erythematosus. *PLoS ONE* **3**, e1727 (2008).
42. Kosoy, R. *et al.* Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America. *Human Mutation* **30**, 69–78 (2009).
43. Aldridge, S. *et al.* 1000 Genomes project. *Nat Biotechnol* **26**, 256 (2008).
44. Purcell, S. *et al.* PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *Am J Hum Genetics* **81**, 559–75 (2007).
45. Armstrong, R. When to use the Bonferroni correction. *Ophthal Physl Opt* **34**, 502–508 (2014).
46. Barrett, J., Fry, B., Maller, J. & Daly, M. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Method Biochem Anal* **21**, 263–265 (2005).

47. Arcaroli, J. *et al.* Variant IRAK-1 haplotype is associated with increased nuclear factor-kappaB activation and worse outcomes in sepsis. *Am J Resp Crit Care* **173**, 1335–41 (2006).
48. Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a001651 (2009).