



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

EVALUACIÓN DEL SNP -169 T/C EN EL GEN *FCRL3* Y SU
RELACIÓN CON EL RIESGO A DESARROLLAR ARTRITIS
REUMATOIDE EN POBLACIÓN MEXICANA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA

KARINA MALDONADO MURILLO

NO. DE CUENTA: 305110248

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JULIÁN RAMÍREZ BELLO

ASESOR INTERNO:
DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN

CIUDAD DE MÉXICO, 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.**

Comunico a usted que la alumna **MALDONADO MURILLO KARINA**, con número de cuenta **305110248**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **06 de marzo de 2018** a las **09:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. ALFONSO MACARIO LUNA VÁSQUEZ

VOCAL Dr. JULIÁN RAMÍREZ BELLO*

SECRETARIO Dr. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN

SUPLENTE M. en C. CARLOS BAUTISTA REYES

SUPLENTE Dra. HORTENSIA ROSAS ACEVEDO



El título de la tesis que presenta es: **Evaluación del SNP -169 T/C en el gen FCRL3 y su relación con el riesgo a desarrollar artritis reumatoide en población mexicana.**

Opción de titulación: Tesis

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.


ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 12 de enero de 2018

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA
DIRECCIÓN

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO


VO. BO.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

Este trabajo lo dedico a mi padre, el Lic. José Manuel Maldonado Rodríguez, a mi madre, Virginia Murillo Ramírez y a mi hermano, el Lic. Emmanuel Maldonado Murillo, gracias por su apoyo incondicional, por ser mis guías y mis ejemplos a seguir.

GRACIAS:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por formarme académicamente desde mi ingreso al Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Oriente, hasta mi egreso de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Al Hospital Juárez de México por aceptarme en su Unidad de Investigación en Enfermedades Metabólicas y Endócrinas para realizar este trabajo.

A mi asesor, el Dr. Julián Ramírez Bello, por su motivación, paciencia y dedicación, sin su apoyo no habría sido posible la realización del presente trabajo.

Al Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón, por su atenta revisión y por haber compartido conmigo parte de sus conocimientos para mejorar este trabajo.

A mis sinodales, la Dra. Hortensia Rosas Acevedo, el M. En C. Alfonso Macario Luna Vásquez y el M. En C. Carlos Bautista Reyes, por tomarse el tiempo para la revisión de esta tesis y por sus comentarios para mejorarla.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
Definición de artritis reumatoide y características generales	9
Epidemiología	10
Fisiopatología de la AR	11
Etiología de la AR	15
Genética de la AR	16
Genes relacionados con AR	19
HLA de clase II	19
<i>PTPN22</i>	19
<i>STAT4</i>	20
<i>FCRL3</i>	21
Antecedentes de <i>FCRL3</i> en AR	21
JUSTIFICACIÓN	24
OBJETIVOS	24
General	24
Particulares	25
HIPÓTESIS	25
METODOLOGÍA	25
Diseño de estudio	25
Población de estudio	25
Criterios de selección de la muestra; Pacientes	26
Criterios de selección de la muestra; Controles	27
Cálculo del tamaño de muestra	28
Toma de muestras	28
Extracción del material genético	28
Cuantificación del ADN	30

Diluciones de ADN nuclear	30
Elaboración de las placas para PCR	31
Ensayo 5' exonucleasa para el análisis de discriminación alélica del SNP -169	
T/C de <i>FCRL3</i>	32
Lectura y análisis de las placas	33
Análisis estadístico.....	34
RESULTADOS	34
Número de pacientes y controles.....	34
Análisis del Equilibrio Hardy – Weinberg	36
Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP –169 T/C de <i>FCRL3</i>	36
Análisis de asociación.....	37
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	45
ANEXOS.....	51
Anexo 1.....	52
Anexo 2.....	58

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AR	Artritis reumatoide
ARJ	Artritis reumatoide juvenil
BCR	Receptor de células B
CI	Complejo Inmune
CPAs	Células presentadoras de antígenos
EA	Enfermedad autoinmune
FCRL3	Receptor de la fracción cristalizable gamma 3
GWAS	Estudio de asociación de genoma completo
HLA	Antígeno leucocitario humano
IC	Intervalo de confianza
LD	Desequilibrio de ligamiento
LES	Lupus eritematoso sistémico
Mb	Megabase
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
mRNAs	RNAs mensajeros
OR	Odds ratio
PTPN22	Proteína tirosina fosfatasa, tipo no receptor 22
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
rSNPs	SNPs reguladores
srSNPs	SNP RNA estructurales
STAT4	Factor de transcripción transductor de señal y activador de la transcripción 4
TA	Tiroiditis autoinmune
TNF	Factor de necrosis tumoral

RESUMEN

La artritis reumatoide (AR), es una enfermedad inflamatoria, crónica y articular autoinmune, que afecta principalmente a las mujeres. Aunque su causa no es bien conocida, se han identificado diversos factores ambientales y genéticos involucrados en su desarrollo. Estudios previos reportan una asociación entre una variante funcional tipo polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) localizada en la posición -169 T/C del promotor del gen que codifica a la proteína 3 parecida al receptor de la fracción cristalizable gamma (*FCRL3*) en pacientes con AR y lupus eritematoso sistémico (LES) en población Japonesa. Adicionalmente, un estudio previo realizado en nuestra población, indica que este SNP está asociado con protección para desarrollar AR juvenil (ARJ), de manera dependiente de género; solo en varones. En el actual estudio se incluyeron 248 muestras de pacientes diagnosticados con AR, de los cuales fueron 232 mujeres y 16 varones, así como 314 controles, de los cuales fueron 283 mujeres y 31 hombres. El SNP -169 T/C de *FCRL3* fue genotipificado usando un ensayo de discriminación alélica con 5' exonucleasa TaqMan. Los resultados arrojaron que el SNP -169 T/C de *FCRL3* estuvo en Equilibrio Hardy – Weinberg en los casos y controles. Adicionalmente, los datos indican que el SNP -169 T/C de *FCRL3* no está asociado con AR, por lo cual, esta variante no confiere susceptibilidad para esta enfermedad autoinmune en Mexicanos.

INTRODUCCIÓN

Definición de artritis reumatoide y características generales

Artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria, multifactorial y con etiología aún no bien definida, está influenciada por diversos factores ambientales y genéticos de riesgo, que cuando se combinan conducen a una reacción inflamatoria, la cual deriva además en inflamación del sinovio, destrucción del tejido sinovial y erosión del hueso (Bajpai et al., 2012).

La AR causa dolor, hinchazón y rigidez en las articulaciones, pudiendo provocar graves daños en las mismas, así como la pérdida de función y discapacidad, hasta ser una posible causa de muerte prematura en los individuos afectados. AR puede durar desde algunos meses hasta toda la vida, mientras, los síntomas clínicos pueden mejorar o empeorar con el paso del tiempo (Weisman, 2011). Algunos de los síntomas de la AR son: inflamación articular, sensibilidad a la palpación, engrosamiento del tejido sinovial, dolor, rigidez y deformidad de las articulaciones (Lee, 2001).

Epidemiología

Se estima que la AR afecta entre el 0.5 y el 1.0% de la población adulta mundial, siendo las mujeres las más afectadas, alcanzando una proporción 3:1, o más respecto a los varones. Adicionalmente, tener un pariente de primer grado afectado con AR aumenta la probabilidad de desarrollar la enfermedad de 3 a 9 veces más en comparación con la población general, lo que sugiere la influencia de factores genéticos y/o ambientales compartidos (Karlson & Dean, 2012). La edad pico de aparición de esta enfermedad autoinmune (EA) se presenta entre los 30 – 55 años, mientras, la prevalencia aumenta con la edad.

A nivel mundial se han hecho estudios sobre la prevalencia, los datos indican que ésta varía de acuerdo a la población evaluada, por ejemplo, en Estados Unidos se estima una prevalencia de 0.5% a 1.1%, mientras, en el Sur de Europa va de 0.3 a 0.7%, en Sudamérica es del 2.0% y en el Medio Oriente representa el 3.6% (Ramírez-Bello, 2016).

La prevalencia estimada en México es de 1.6%, en hombres de 0.85% y en mujeres de 2.09%, pero esta prevalencia varía de acuerdo con la región de estudio; en la Ciudad de México es de 1.0%, en Yucatán 2.8%, Chihuahua 1.9%, Sinaloa 1.8%, mientras en Nuevo León es del 0.7% (Ramírez-Bello, 2016).

Fisiopatología de la AR

Es posible identificar niveles de citocinas y autoanticuerpos alterados varios años antes del diagnóstico de AR, es por esto que se dice que esta EA se desarrolla en fases, las cuales se muestran en el siguiente diagrama (figura 1):

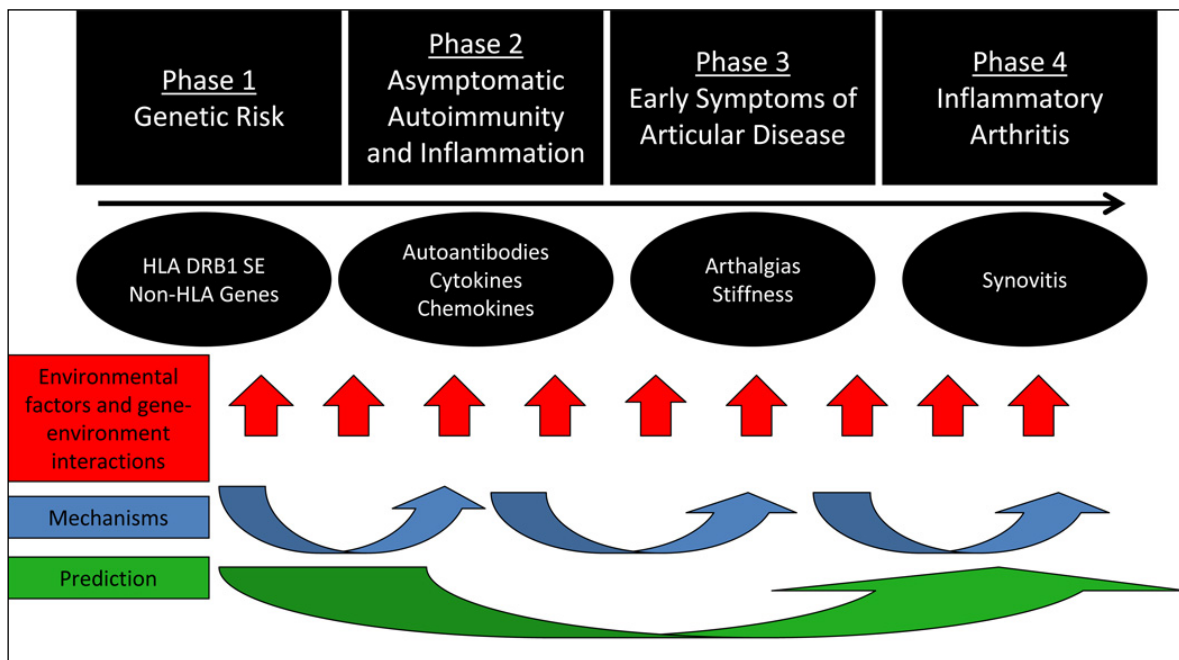


Figura 1. Fases del desarrollo de AR. Fase 1, fase asintomática del riesgo genético; fase 2, fase de activación inmune asintomática con presencia de autoanticuerpos y biomarcadores elevados tales como citocinas y quimiocinas; fase 3, fase preclínica con presencia de biomarcadores anormales de inflamación y tal vez artralgias; fase 4, artritis inflamatoria clínicamente aparente (definida como enfermedad articular sintomática que incluye dolor, rigidez e hinchazón, y sinovitis identificable en el examen) que puede ser una artritis indiferenciada o cumplir con la clasificación clara de AR (Karlson & Dean, 2012).

En AR existe inflamación persistente del tejido sinovial, destrucción del cartílago de las articulaciones con movimiento y erosión del hueso. Estos eventos se dan por la activación anormal de los linfocitos B y T, así como de macrófagos, y otras células del sistema inmunológico, las cuales tienen un papel regulador tanto a nivel del sistema inmunológico innato y adaptativo, adicionalmente, cuando ellas se encuentran alteradas en esta EA, se producen niveles anormales de algunas citocinas, quimiocinas, receptores de citocinas y quimiocinas, moléculas de adhesión y adaptadoras (por mencionar algunos), autoanticuerpos, etc., las cuales están implicadas en la patogénesis de AR (Rodríguez-Elías et al., 2016).

Una de las principales citocinas involucradas en AR, es el factor de necrosis tumoral (TNF); proteína proinflamatoria que participa tanto en el inicio agudo y cronicidad de esta EA, algunos estudios han mostrado que su sobreexpresión es suficiente para inducir esta enfermedad, dado que esta también induce la expresión de diversas interleucinas (IL), tales como IL-1 e IL-6 (citocinas proinflamatorias), estas últimas también están involucradas en la actividad de AR (figura 2). Adicionalmente, TNF, induce la expresión de genes que codifican para moléculas de adhesión intracelular y vascular (ICAM y VCAM), así como de metaloproteasas, las cuales están implicadas en la destrucción del cartílago y en la erosión del hueso, al mismo tiempo se ha observado que esta citocina induce la síntesis de autoanticuerpos (estimula a las células B a sintetizar autoanticuerpos), los cuales son factores de gravedad y mal pronóstico en AR (Rodríguez-Elías et al., 2016).

Otra citocina proinflamatoria involucrada en todas las fases de desarrollo de AR es IL-17, proteína producida principalmente por células Th17. Entre sus funciones se encuentra la inducción de la producción de citocinas inflamatorias en el sinovio, dañando de esta manera el tejido sinovial, además, promueve la supervivencia de los sinoviocitos y células inflamatorias así como un aumento en el número de estos, así como inflamación exacerbada en las articulaciones de los pacientes con AR (Rodríguez-Elías et al., 2016).

Las células plasmáticas (células diferenciadas a partir de células B, encargadas de la síntesis de anticuerpos y/o autoanticuerpos) sintetizan autoanticuerpos bajo ciertos estímulos antigénicos propios o extraños, también participan importantemente en la fisiopatología de la AR (Díaz-González & Ferraz-Amaro, 2007). Adicionalmente, las células B, conocidas por ser células presentadoras de antígeno profesionales, pueden también sintetizar tanto citocinas proinflamatorias como antiinflamatorias, lo cual contribuye fuertemente en la patogénesis de diversas EA, incluyendo AR (Díaz-González & Ferraz-Amaro, 2007; Nashi et al., 2010). Las células B contienen en su superficie receptores para la fracción cristalizante (FcRs), proteínas que interactúan con diversos isotipos de inmunoglobulinas (IgA, IgE, IgM e IgG), las cuales participan en la regulación y ejecución de respuestas mediadas por anticuerpos. Estas reacciones proinflamatorias deben estar estrechamente reguladas para evitar dañar o destruir tejidos sanos. Cuando ésta regulación falla, puede iniciar una respuesta inmune anormal así como el desarrollo de diversas enfermedades crónicas autoinmunes (Nimmerjahn & Ravetch, 2007). Los FcRs interactúan selectivamente con

anticuerpos/autoanticuerpos, los cuales van en complejos inmunes (CI), formados de múltiples anticuerpos/autoanticuerpos unidos a un antígeno. La unión de los CI a las células B, induce la activación de diferentes vías de señalización, sin embargo, hay receptores inhibidores y otros activadores, pero ambos se expresan conjuntamente en la misma célula, esto determina la magnitud de la respuesta inmune adaptativa mediada por las células B. Kochi y *cols.* (2005), identificaron una variante genética localizada en el promotor del gen *FCRL3*, a nivel de proteína, que se expresa en la membrana de las células B, por su parte se identificó que esta variante afecta su expresión génica y causa susceptibilidad para AR, lupus eritematoso sistémico (LES) y tiroiditis autoinmune (TA), (Kochi et al., 2005). De esta manera, estos datos muestran el papel que pueden jugar las variantes genéticas y las células B en la fisiopatología de AR.

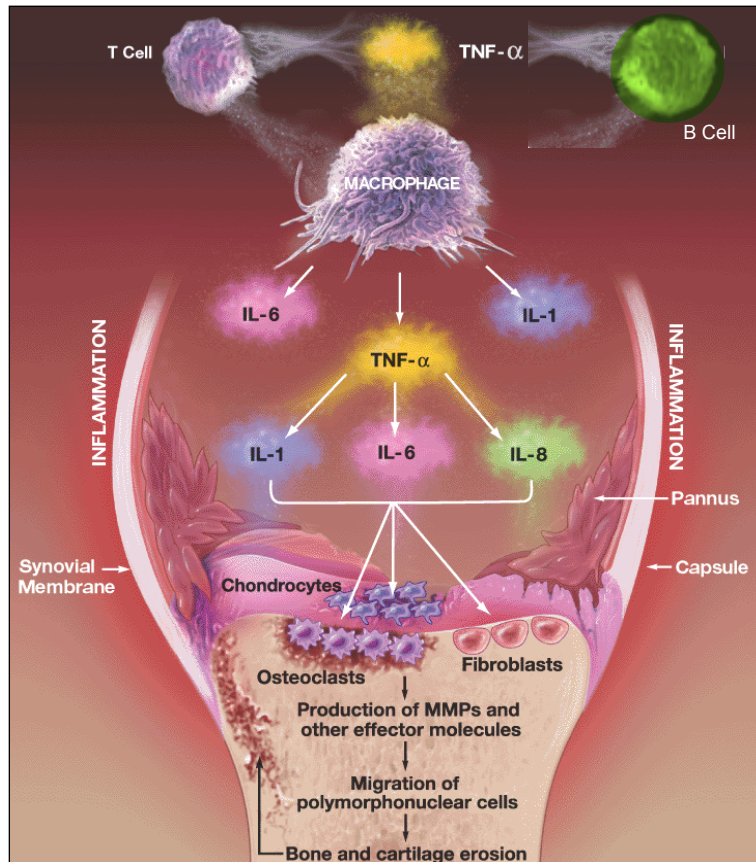


Figura 2. Fisiopatología de la AR. Diversas células del sistema inmunológico que muestran autoreactividad, así como citocinas, quimiocinas, receptores, de citocinas, quimiocinas, autoanticuerpos, etc., contribuyen importantemente en mantener la inflamación crónica, además de inducir daño, destrucción articular y erosión ósea (Rodríguez-Elías et al., 2016; Imagen www.docplayer.es).

Etiología de la AR

AR es una de las formas más comunes de artritis. La aparición de AR se origina como resultado de una compleja interacción entre factores ambientales (humo de cigarrillos, uso de hormonas exógenas, contaminación del aire, periodontitis, virus (Epstein-Barr, parvovirus B19) y sus productos (por ejemplo, proteínas de choque térmico) y bacterias (*Streptococcus*, *Mycoplasma*, *Proteus* y *E. Coli*) (Kamphuis et

al., 2005; Rodríguez-Elías et al., 2016) y factores de riesgo genéticos heredados, aunque se desconoce cual es el evento inicial que desencadena la respuesta inflamatoria crónica en esta enfermedad (Karlson & Deane, 2012; Stark, 2013). Independientemente de esto, para que se desarrolle AR se requiere de la combinación de factores ambientales y genéticos de riesgo. En la actualidad no se conoce de manera clara la participación de todos los factores de riesgo, motivo por el cual, la participación de la interacción gen-ambiente no se encuentra bien dilucidada en AR. Sin embargo, desde el punto de vista genético en esta EA, esta ha sido fuertemente respaldada en diversos estudios que demuestran que los genes son el factor de riesgo de mayor importancia que contribuye en AR. La asociación genética más sólida en esta EA está dada por alelos particulares del antígeno leucocitario humano (*HLA-DRB1*) (Pratt et al., 2009).

Genética de la AR

Algunos estudios, realizados en familias y gemelos han mostrado el efecto que ejerce el factor genético en AR, de hecho, la heredabilidad estimada en esta EA es de aproximadamente 65% (Rodríguez-Elías et al., 2016). Actualmente, mediante estudios de asociación de gen candidato o los del genoma completo (GWAS), se han logrado identificar varios *loci* de riesgo asociados con susceptibilidad para desarrollar AR. Hasta la fecha, mediante este tipo de estudios se han descrito al menos 100 genes asociados con susceptibilidad, gravedad, actividad y respuesta a tratamiento para AR, algunos de estos genes son: *FCRL3*, *PTPN22*, *STAT4* y

HLA clase II, entre muchos otros. Cabe mencionar que las variantes localizadas en los genes anteriormente citados, y que han mostrado asociación con susceptibilidad para AR, son del tipo polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).

Algunas características de los SNPs se describen a continuación (Ramírez-Bello & Jiménez-Morales, 2017):

- Los SNPs se localizan en todo el genoma humano y son las variantes más comunes.
- Se localizan tanto en genes codificantes como en no codificantes de proteínas.
- Se encuentran a cada 250 pares de bases aproximadamente.
- Son bialélicos en su mayoría, pero también pueden ser trialélicos y tetraalélicos.
- Su genotipificación es sencilla con métodos automatizados.
- En salud, los SNPs pueden ser usados para identificar individuos genéticamente susceptibles para desarrollar enfermedades multifactoriales.

Estas variantes de un solo nucleótido se dividen en neutras y funcionales, siendo las últimas las que presentan un impacto biológico, y las que tienen un efecto directo en la asociación con diversas enfermedades multifactoriales. Los SNP funcionales se clasifican de acuerdo a la región donde se ubican y a la función que cumplen, sus efectos se pueden observar en la tabla siguiente (tabla 1):

SNP funcionales	Ubicación	Función
rSNP y miR-rSNP	Promotor de genes codificantes de proteínas y no codificantes, respectivamente	Alteran la expresión génica
- srSNP	pre-mRNA y mRNA maduros	Alteran la traducción, la estabilidad, la longitud y la interacción de mRNA/miRNA
- miR-srSNP	pri, pre y miRNA maduros	Afectan la estructura, el procesamiento y la función de los miRNA
cSNP	Secuencia codificante	Afectan la estructura y la función o la actividad de las proteínas o enzimas
- sSNP		Los nsSNP sin sentido generan un codón de paro y terminación prematura de las proteínas
- nsSNP		Los nsSNPs de sentido erróneo generan cambios de aminoácidos
• Sin sentido		
• Sentido erróneo		

cSNP: SNP codificantes; miR-rSNP: SNP reguladores de microRNA; miR-srSNP: SNP RNA estructurales de microRNA; nsSNP: SNP no sinónimos; rSNP: SNP reguladores; srSNPs: SNP RNA estructurales; sSNP: SNP sinónimos.

Tabla 1. Clasificación funcional de los SNPs (tomada de Ramírez-Bello & Jiménez-Morales, 2017).

Los SNPs, de acuerdo con su amplia distribución dentro de los genes que codifican y no codificantes de proteínas, pueden afectar su estructura (de los genes), teniendo un efecto sobre la expresión génica, adicionalmente, los SNPs localizados en los mRNAs con intrones (mRNAs primarios) o en los mRNAs maduros (ya sin intrones), pueden afectar el corte y empalme, la estabilidad de los mRNAs, el inicio de la traducción, la interacción entre microRNAs/mRNAs, la estructura y/o función de las proteínas. De esta manera, estas variantes funcionales pueden ser causa directa de susceptibilidad para AR (Ramírez-Bello et al., 2013. Ramírez-Bello & Jiménez-Morales, 2017) (Ver tabla 1).

Genes relacionados con AR

HLA de clase II

Los genes del HLA, se localizan en la citobanda 6p21, la cual comprende 3.6 Mb y se divide en genes del HLA de clase I, II y III. Los genes de HLA-III no codifican moléculas presentadoras de antígenos, mientras, HLA-I y el II, codifican proteínas de superficie celular, las cuales presentan antígenos propios y/o extraños y son altamente polimórficas. El HLA junto con el antígeno propio/extraño interacciona con el receptor de células T y con el correceptor T CD4⁺, es decir, interacciona, en primer lugar con estas proteínas de las células T CD4⁺, las cuales, inducen su activación y posterior activación del sistema inmunológico adaptativo. El HLA-II es el principal factor de riesgo genético asociado para AR, contribuyendo en un 11% de susceptibilidad para desarrollar la enfermedad (Rodríguez-Elías et al., 2016).

PTPN22

El gen *PTPN22* (localizado en la citobanda 1p13.3-13.1), el cual codifica para la proteína LYP, representa el segundo *loci* de mayor importancia en la susceptibilidad para AR (solo se encuentra por detrás del *HLA-II*). Su función a nivel proteínica es regular la activación de diversas subpoblaciones de células T, células B, neutrófilos, etc. En el 2004, se identificó el SNP no sinónimo C1858T, el

cual, cambia una citocina por timina en el codón 620 del mRNA de *PTPN22*, este cambio origina el reemplazo del aminoácido arginina por triptófano (R620W). Esta variante ha sido asociada con susceptibilidad para diabetes tipo 1 (una enfermedad autoinmune), así como para otras EA, tales como AR, LES y tiroiditis autoinmune (TA). En población mexicana, el alelo C del SNP C1858T de *PTPN22* se asoció con susceptibilidad para AR: OR 4.06, $p=0.0004$ (Rincón et al., 2016), mientras, en TA también mostró asociación con susceptibilidad; OR 4.3, $p=0.004$ (López-Cano et al., 2017).

STAT4

El gen *STAT4*, codifica para el factor de transcripción transductor de señal y activador de la transcripción 4, el cual se encarga de transducir señales inducidas por IL-12, IL-23 e interferón 1. A nivel cromosómico, este gen está localizado en la citobanda 2q32.2, mientras a nivel de función proteínica está implicado en la diferenciación y proliferación de células Th1 y Th2, tipos celulares involucrados en el desarrollo de enfermedades crónicas inflamatorias y con diversas EA. En 2007, un SNP (rs7574865G/T) localizado en el intrón 3 de *STAT4* se identificó estar asociado con LES y AR (Rodríguez, 2016). Beltrán-Ramírez y cols. (2016) identificaron este SNP asociado con susceptibilidad tanto para AR como para LES (G vs T; OR 1.42, $p=0.0009$, y OR 1.74, $p=0.0002$, respectivamente) (Beltrán-Ramírez et al., 2016).

FCRL3

FCRL3 se localiza en la citobanda 1q21 del cromosoma 1, y codifica para la proteína 3 parecida al receptor de la fracción cristalizante gamma. La proteína se expresa en la superficie de células B, y es un miembro de la súper familia de los receptores de inmunoglobulinas, encargado de regular la activación/inactivación de células B a través de sus motivos de activación o inhibición en inmunorreceptores basados en tirosina (ITAM e ITIM) (Rodríguez-Elías et al., 2016). Hasta ahora, la función de *FCRL3* no se conoce claramente (tampoco se conoce su ligando), sin embargo, debido a la presencia de sus motivos ITAM e ITIM en el dominio intracelular se sugiere que su participación podría estar mediada por un ligando afín, el cual, probablemente pueda activar/inactivar la función de las células B (Bajpai et al., 2012).

Antecedentes de *FCRL3* en AR

Kochi y cols., en 2005, analizaron la región 1q21-23 (mediante un arreglo de Illumina de SNPs), la cual previamente había sido reportada estar ligada con AR y otras EA, en su análisis identificaron varios SNPs del gen *FCRL3* asociados con AR, LES y TA. El estudio identificó múltiples bloques en desequilibrio de enlace (o ligamiento) (LD) en esta región, además se identificaron al menos 4 SNPs de *FCRL3* (y que estuvieron en alto LD) asociados con AR, estos polimorfismos se localizaron en *FCRL3*. El SNP funcional importante en la susceptibilidad para AR,

LES y TA fue el -169T/C de *FCRL3*, el cual afecta su expresión génica a través de la modificación de la afinidad de unión del factor de transcripción NF- κ B. El cultivo de células obtenidas de individuos sanos mostraron que los genotipos -169 T/C y -169 CC correlacionaron con mayores niveles de expresión del mRNA de *FCRL3* cuando se comparó con el genotipo común (-169 TT) (Kochi et al., 2005). De esta manera, esta variante confirió susceptibilidad para esas tres EA.

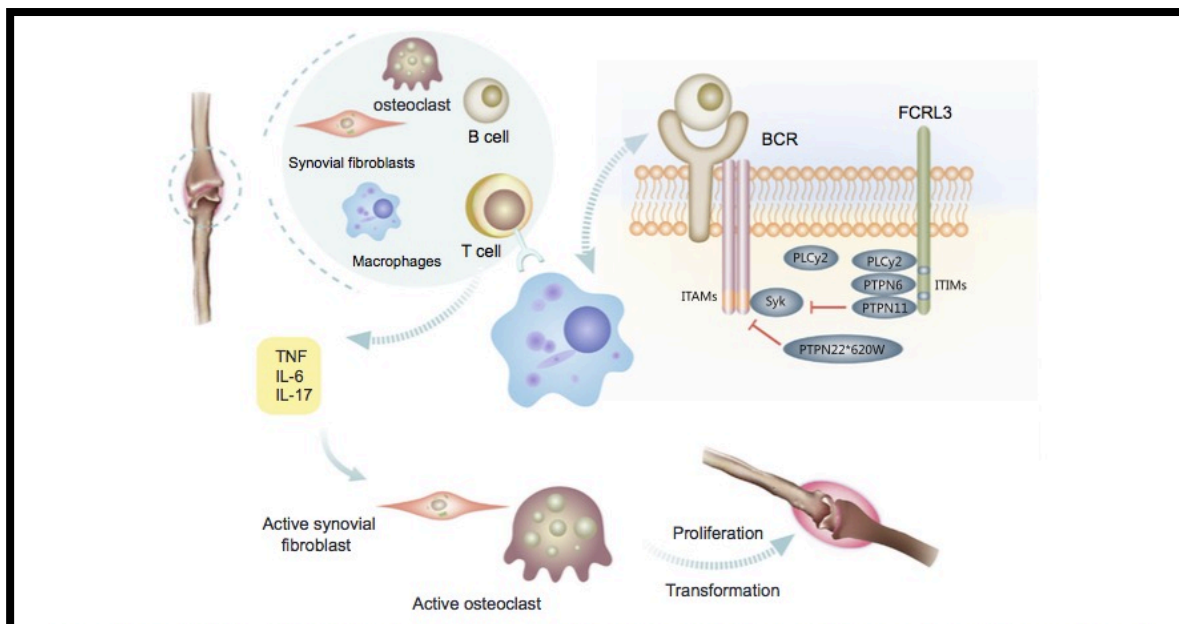


Figura 3. Mecanismo potencial de *FCRL3* en AR. En esta imagen se muestra el papel de diversas células y citocinas involucradas en el activación de ellas mismas o de otras células involucradas en la patogénesis de AR. Adicionalmente, *FCRL3*, una proteína expresada en la superficie de las células B participa en la activación/inactivación de células B, claves en la producción de autoanticuerpos en AR (Imagen tomada de Lin et al., 2016).

Algunos estudios genéticos posteriores llevados a cabo en otras poblaciones evaluaron si este hallazgo era similar a los encontrados por Kochi, por ejemplo, Lin y cols., (Lin et al., 2016), encontraron que esta variante mostró asociación con AR en población China. Un estudio previo en 2010, coincide con estos resultados identificados en pacientes chinos, pero menciona que la magnitud del riesgo es considerablemente menor que el efecto estimado en la población japonesa (Wu et al., 2010). Otro estudio realizado en 2006, identificó una asociación entre esta variante y AR en una población de Canadá (Newman et al., 2006). Adicionalmente, en población holandesa se identificaron resultados similares; una asociación del genotipo homocigoto CC con susceptibilidad para desarrollar AR en comparación con los genotipos TT y TC (Thabet et al., 2007). Sin embargo, otros estudios no han replicado este hallazgo, en 2013, se realizó un estudio sobre el efecto de esta variante y la susceptibilidad para AR en población iraní, encontrándose una no asociación con AR (Golmoghaddam et al., 2013). Este dato fue similar a lo encontrado en población coreana, la variante no mostró estar asociada con la susceptibilidad (Choi et al., 2006). Adicionalmente, en norteamericanos blancos, el alelo -169 C tampoco mostró asociación con AR (Hu et al., 2006). Por su parte, en población mexicana, solo se ha hecho un estudio de esta variante en pacientes con AR juvenil (ARJ), y resultó que el alelo C del SNP -169 T/C confirió protección para desarrollar la enfermedad de manera dependiente de género (en individuos masculinos) (Ramírez-Bello et al., 2013). De esta manera, es importante determinar en otras poblaciones, incluyendo la nuestra, si el SNP -169 T/C de *FCRL3* confiere riesgo o protección para desarrollar AR.

JUSTIFICACIÓN

AR es una enfermedad multifactorial que afecta principalmente a las mujeres, su etiología no se conoce de manera clara, sin embargo, estudios recientes han demostrado que el factor genético es fundamental en el desarrollo de esta enfermedad. El SNP -169 T/C de *FCRL3* ha sido asociado anteriormente con susceptibilidad para desarrollar AR en población japonesa (así como en otras poblaciones), este mismo SNP fue evaluado en pacientes con ARJ en población mexicana y mostró asociación con protección de manera dependiente de género. Este proyecto buscó determinar si este polimorfismo está o no asociado con susceptibilidad o protección para desarrollar AR de población mexicana. De esta manera, es importante identificar individuos genéticamente susceptibles para AR, con el fin de tener una medicina más predictiva y personalizada.

OBJETIVOS

General

- Determinar si el polimorfismo -169 T/C de *FCRL3* confiere riesgo para desarrollar AR en población mexicana.

Particulares

- Identificar las frecuencias de genotipos y alelos del SNP -169 T/C de *FCRL3* en una población de estudio.
- Determinar si el SNP -169 T/C de *FCRL3* está asociado o confiere riesgo para desarrollar AR.

HIPÓTESIS

¿El alelo C del SNP -169 del gen *FCRL3* confiere susceptibilidad en individuos mexicanos a desarrollar AR?

METODOLOGÍA

Diseño de estudio

Observacional, retrospectivo, transversal y comparativo.

Población de estudio

En este estudio se incluyeron 248 pacientes con AR (232 mujeres y 16 varones), así como 314 controles (283 mujeres y 31 hombres). Los pacientes fueron

diagnosticados con AR o LES por médicos reumatólogos del Hospital Juárez de México (HJM), al mismo tiempo, los controles fueron captados en diferentes servicios del HJM. Los individuos sanos no tuvieron ningún antecedente de alguna EA o crónicas inflamatorias, como obesidad, alergia (los diferentes tipos de alergia), urticaria crónica o aguda, infarto agudo al miocardio, y otras, como diabetes tipo 2, hipertensión, etc. Los comités de Investigación, Ética y Bioseguridad aprobaron este protocolo. Cada uno de los casos y controles proporcionó su firma de consentimiento informado, antes de tomar su muestra para los estudios genéticos.

Criterios de selección de la muestra; Pacientes.

De inclusión

- Pacientes con diagnóstico de AR acorde a los criterios de clasificación ACR/EULAR 2010.
- Ambos sexos, edad entre 18 y 65 años.
- Mestizos mexicanos (persona nacida en México, que tiene 2 generaciones ascendentes nacidas en México, dato evaluado por cuestionario) y residentes de México.
- Consentimiento informado firmado.

De exclusión

- Coexistencia de otras enfermedades autoinmunes, excepto Síndrome de Sjögren.

- Coexistencia con neoplasias activas.
- Infecciones agudas.

De eliminación

- Revocación del consentimiento.
- Muestra insuficiente.
- Muestra coagulada.
- Muestra mal procesada.

Criterios de selección de la muestra; Controles.

De inclusión

- Individuos sanos sin antecedentes de EA e inflamatorias (sin obesidad, hipertensión, asma, etc.).
- Ambos sexos, edad entre 18 y 65 años.
- Mestizos mexicanos (persona nacida en México, que tiene 2 generaciones ascendentes nacidas en México, dato evaluado por cuestionario) y residentes de México.
- Consentimiento informado firmado.

De exclusión

- Coexistencia con neoplasias activas.
- Infecciones agudas.

De eliminación

- Revocación del consentimiento.
- Muestra insuficiente.
- Muestra coagulada.
- Muestra mal procesada.

Cálculo del tamaño de muestra

De acuerdo al programa QUANTO, el cual evalúa el tamaño de muestra tomando en cuenta la frecuencia de los alelos a evaluar, el OR, un poder estadístico de al menos 80%, un valor de p menor a 0.05, la prevalencia de la enfermedad y un modelo genético, el número es de 248 pacientes con AR.

Toma de muestras

A todos los casos y controles se les tomó una muestra de sangre periférica de 5 mL mediante venopunción, en tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante. A partir de esta muestra, se extrajo el ADN nuclear.

Extracción del material genético

Para realizar la extracción del ADN se utilizó el kit de extracción Invisorb Blood Universal Kit; Stratec molecular, mediante el siguiente procedimiento:

1. Las muestras de 5 mL de sangre periférica se centrifugaron durante 10 minutos a 2500 r.p.m. para obtener la capa de leucocitos.
2. Se removió la capa de leucocitos y se colocó en un tubo limpio de 15 mL, después se agregaron 13 mL de buffer EL de lavado (el cual estuvo a una temperatura de 4°C), se homogenizó la mezcla y se colocó en la centrifuga a 3500 r.p.m. durante 10 minutos, posteriormente, este procedimiento se realizó de 2 a 3 veces hasta que se eliminaron todas las células rojas.
3. Una vez que el botón de leucocitos quedó limpio, se colocaron 3 mL de buffer HL y 30 μ L de proteinasa K, posteriormente se incubó por 10 minutos a 60°C en baño maría.
4. Transcurridos 10 minutos, se agregaron 3 mL de alcohol isopropílico a la mezcla, agitándose vigorosamente en el vórtex para que precipitara el ADN, obteniendo así la lisis de los glóbulos blancos.
5. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 3500 r.p.m. durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 1.5 mL de etanol al 70% (reactivo de grado biología molecular).
6. Nuevamente se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se dejó deshidratar el ADN de cada muestra a temperatura ambiente por 10 minutos.
7. Finalmente, se colocó el ADN en tubos Eppendorf de 1.6 mL y se agregaron 600 μ L de buffer U (que sirve para mantener estable el ADN durante varios meses o años). Estas muestras se incubaron durante una hora a 60°C en un termo shaker con agitación continua.

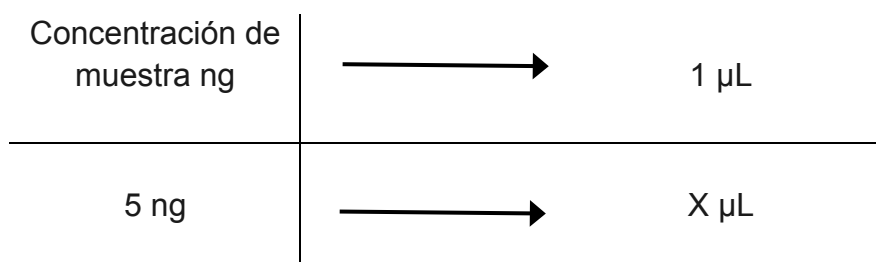
Cuantificación del ADN

Una vez que el ADN se disolvió en 300 μL de buffer U, se cuantificó la cantidad de ADN de cada una de las muestras, de casos y de controles, mediante lecturas de densidad óptica (DO) o absorbancia con un espectrofotómetro a 260 y 280 nm.

Con el cociente de la DO 260/280 se determinó el grado de pureza de la muestra obtenida de ADN, los valores considerados como adecuados fueron entre 1.7 y 2.0, ya que valores inferiores a estos son indicadores de contaminación por proteínas o por solventes orgánicos, en estos casos se realizó una nueva purificación de las muestras de ADN.

Diluciones de ADN nuclear

A partir de las cuantificaciones de ADN de cada una de las muestras de casos y controles, se hicieron diluciones a 5 ng/ μL con agua libre de DNAsas en un volumen final de 200 μL , utilizando la siguiente fórmula:



Tanto las muestras stock de ADN como las diluciones a 5 ng/μL, se almacenaron en tubos Eppendorf a -20°C para evitar la degradación progresiva del material genético, así como una posible contaminación.

Elaboración de las placas para PCR

Las diluciones de ADN de 5 ng/μL de cada caso-control se colocaron en una placa de 96 pozos.

Posteriormente, en cada uno de los pozos se colocaron los reactivos necesarios para la reacción de PCR en tiempo real.

Reactivos colocados por cada muestra de casos y controles:

Reactivo	Volumen
Muestra de ADN	2 μL (previamente colocado en cada pozo y deshidratado)
Sondas, primer (rs7528684) TaqMan SNP genotyping assays	0.065 μL
Agua libre de nucleasas	2.435 μL
Master mix 2X	2.5 μL
Volumen final: 7 μL	

Una vez realizado este procedimiento con cada una de las muestras de los controles y de los casos, las placas se colocaron en el PCR de tiempo real de BioRad CFX96 Real Time System (C1000 Thermal Cycler), bajo las siguientes condiciones

Ciclos	Temperatura °C	Tiempo
Pre-PCR	50	2 minutos
1 ciclo	95	8 minutos
PCR	94	15 segundos
45 ciclos	60	60 segundos
Post-PCR	4	∞

Tabla 2. Condiciones del PCR en tiempo real.

Ensayo 5' exonucleasa para el análisis de discriminación alélica del SNP - 169 T/C de *FCRL3*

Para evaluar los genotipos de esta variante, se utilizó la técnica 5' exonucleasa, la cual implica el uso de sondas fluorescentes TaqMan y analiza las variantes bialélicas de los SNPs. El vial, contiene dos sondas para identificar cada uno de los alelos del SNP. Cada sonda en su extremo 5' contiene un fluoróforo, en una de ellas contiene el fluoróforo VIC, mientras, en la segunda contiene el fluoróforo FAM, cuando las sondas son 100% complementarias al lugar donde se

encuentran los dos alelos del SNP se excitan y emiten fluorescencia a diferente longitud de onda, esta última es detectada por un software del equipo PCR en tiempo real; CFX96 Real-Time System, y traducida en colores en un plot de discriminación alélica.

Lectura y análisis de las placas

El software Bio-Rad CFX Manager, se utilizó para evaluar la fluorescencia de cada muestra de ADN contenida en las placas. El software normaliza la fluorescencia de los fluorocromos VIC o FAM con respecto a la fluorescencia del fluorocromo de referencia pasivo (ROX) en cada pozo. A continuación, el software traza las intensidades normalizadas (R_n) de los fluorocromos del notificador en cada pozo en una gráfica de discriminación alélica, lo que origina las intensidades de ambas sondas específicas de alelo.

Finalmente, el software CFX Manager agrupa algorítmicamente los datos de las muestras de casos y controles y asigna un genotipo a cada una con el fin de hacer una discriminación alélica de cada muestra. Esta agrupación de datos puede variar a lo largo del eje horizontal (alelo 1), el eje vertical (alelo 2) o diagonal (alelo 1/alelo 2). Esta variación es a consecuencia de las diferentes intensidades de fluorescencia respectiva de ambos fluoróforos después de la amplificación de PCR.

Análisis estadístico

Los genotipos se obtuvieron por conteo directo. La prueba estadística empleada en este estudio fue la X^2 . Se emplearon tablas de contingencia de 2 x 2 y 2 x 3, para obtener datos de OR, IC del 95% y valor de p de alelos y genotipos, respectivamente. El programa empleado para obtener los datos de OR, IC 95% y el valor de p , fue el de Finetti, el cual además evalúa el equilibrio de Hardy-Weinberg entre genotipos del SNP -169 T/C de *FCRL3* en casos y controles.

RESULTADOS

Número de pacientes y controles

En este estudio de casos y controles se analizaron 248 pacientes adultos con diagnóstico de AR, este grupo de pacientes incluyó 232 individuos del sexo femenino y 16 varones. También se incluyeron 314 individuos sanos adultos, de los cuales 283 fueron mujeres y 31 fueron varones. Los porcentajes de cada género en casos y controles se observan en la figura 4 y 5.

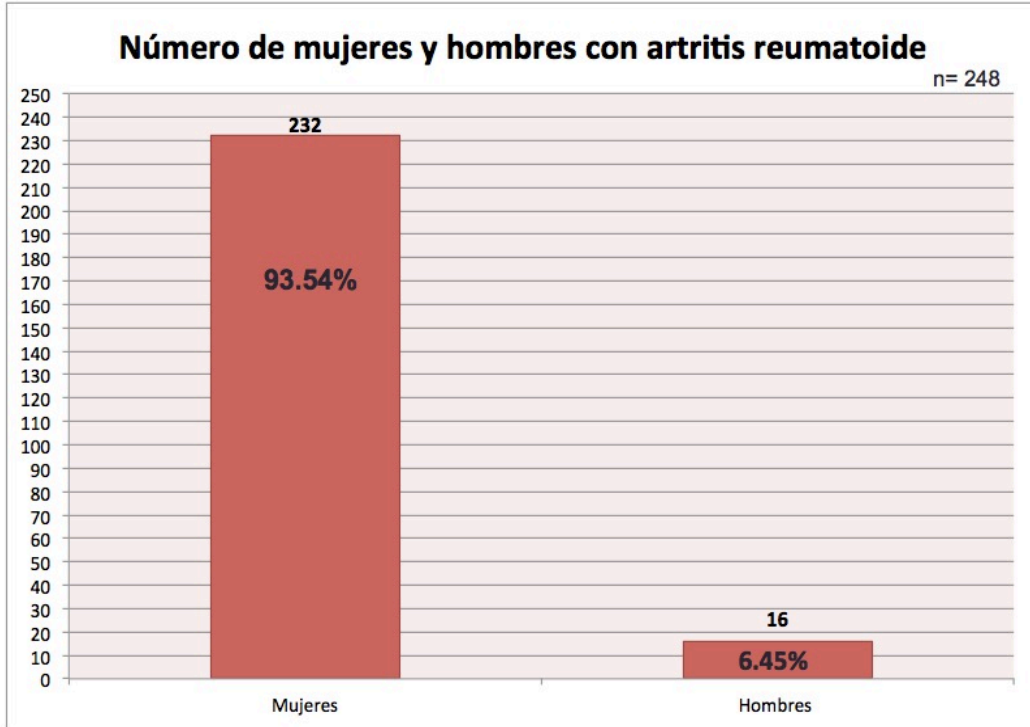


Figura 4. Número de pacientes con AR por género.

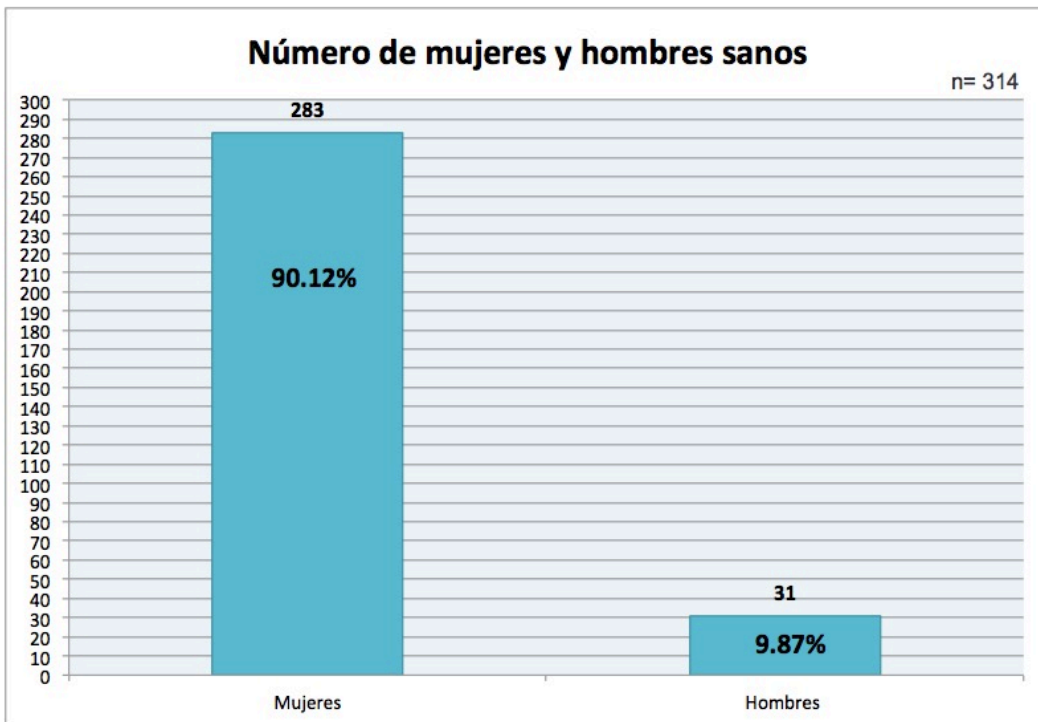


Figura 5. Número de mujeres y varones sanos.

Análisis del Equilibrio Hardy – Weinberg

Tanto los casos ($0.5 \geq p$) como los controles ($0.5 \geq p$) estuvieron en equilibrio Hardy – Weinberg para el SNP -169 T/C de *FCRL3*.

Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP –169 T/C de *FCRL3*

Las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -169 T/C de *FCRL3* mostraron pequeñas diferencias en los porcentajes en todos los casos y controles (que incluye mujeres y varones). Por ejemplo, la frecuencia del genotipo que lleva los alelos menos comunes (CC), fue del 21.4% en casos, mientras en controles fue del 27.7%. En el estudio realizado previamente en pacientes mexicanos con ARJ, la frecuencia de este genotipo en casos fue del 16.1%, un porcentaje por debajo de lo encontrado en el actual estudio, mientras en controles, el porcentaje (24.5%) fue similar a lo identificado en este estudio (27.7%). Respecto al genotipo heterocigoto, en este estudio, se identificó en el 50.4% de los casos y en el 45.5% de los controles, respectivamente. Por otro lado, este genotipo se presentó en el 40.2% de los casos y en el 50.5 % de los controles en el estudio reportado por Ramírez Bello y cols. (Ramírez-Bello et al., 2013).

Análisis de asociación

El análisis sugiere que dado que las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -169 T/C de *FCRL3* son similares en casos y controles, estas no mostraron una evidencia de asociación con susceptibilidad o protección para AR en la población de estudio (Tabla 3). El análisis de estratificación en mujeres mostró resultados similares (información no mostrada), sin embargo, no se pudo realizar el análisis de estratificación en hombres dado el bajo número de ellos identificados en los casos (16 pacientes varones). Motivo por el cual no se pudo evaluar si esta variante está asociada con protección en varones, como lo reportado previamente en el estudio de Ramírez Bello y cols., 2013.

Gen SNP <i>FCRL3</i> -169T/C	AR <i>n</i> = 248 <i>n</i> (%)	Controles <i>n</i> = 314 <i>n</i> (%)	OR	95 % IC	<i>p</i>
Genotipo					
TT	70 (28.2)	84 (26.8)	-	-	-
TC	125 (50.4)	143 (45.5)	1.05	0.71-1.56	0.81
CC	53 (21.4)	87 (27.7)	0.73	0.46-1.16	0.18
Alelo					
T	265 (53.4)	311 (49.5)	-	-	-
C	231 (46.6)	317 (50.5)	0.86	0.68-1.08	0.19

Tabla 3. Frecuencias de alelos y genotipos del polimorfismo -169 T/C de *FCRL3* y análisis de asociación en pacientes con AR y controles. (OR odds ratio, IC intervalos de confianza, *p* significativo estadístico).

DISCUSIÓN

En el actual estudio se evaluó el papel que representa la variante -169 T/C (rs7528684) de *FCRL3* con respecto a la susceptibilidad que pueda causar en pacientes mexicanos con AR. Los datos encontrados en la población de estudio, sugieren que este polimorfismo no está asociado con susceptibilidad o riesgo para desarrollar esta EA en pacientes mexicanos.

Respecto al análisis de E-HW en la población de casos y controles, mostró que la distribución de los genotipos TT/TC/CC del SNP -169 T/C de *FCRL3* está en equilibrio, lo cual sugiere que no hay diferencias estadísticas en las frecuencias de los alelos y no hay estratificación poblacional (Smith & Baldwin, 2015).

Desde el punto de vista genético, *FCRL3*, codifica para la proteína 3 parecida a la fracción cristalizable gamma (*FCRL3*), glicoproteína que pertenece a la súper familia de receptores de inmunoglobulinas, y que se expresa principalmente en los linfocitos B, células asesinas naturales y células T. *FCRL3* juega un papel importante en la diferenciación de células B y se expresa altamente en los centros germinales. *FCRL3* contiene tanto motivos ITAM e ITIM, en su dominio citoplasmático, los cuales son capaces de inhibir la señalización del BCR, dado que se ha documentado que tiene una función importante en la regulación de las células inmunes (Hu et al., 2006; Li et al., 2013). Recientemente, se identificó que la sobreexpresión de *FCRL3*, la cual correlaciona con una mayor cantidad de proteína en la superficie de las células B, puede afectar la ruta de la señal normal

y activar tanto las células T como las células B, afectando su crecimiento y diferenciación, adicionalmente, las células T reguladoras pueden liberar citocinas proinflamatorias que activan fibroblastos sinoviales y osteoclastos. Como resultado de esto, los tejidos óseos y cartilagosos se ven afectados (Lin et al., 2016).

Desde el punto de vista de variabilidad genética y salud/enfermedad, *FCRL3* presenta diversos SNPs a través de toda su organización genética. En 2005, Kochi y cols., identificaron 4 SNPs asociados con susceptibilidad para desarrollar AR, LES y TA en población japonesa, dos de ellos se encuentran en la región promotora, específicamente en las posiciones -169 T/C y -110 G/A, uno más se encuentra en un intrón 3 y el último en un exón 2, este último no lleva a cambio de aminoácido dado que se encuentra en la región 5' no traducida. El estudio de Kochi, identificó que el polimorfismo -169 T/C (rs7528684) fue la variante directa asociada con AR (OR de 2.15, $p = 0.00000085$), LES y TA, dado que está es un rSNP y afectó los niveles de expresión de la luciferasa, mediante estudios de gen reportero, además, mediante estudios de EMSA (retardamiento en gel) y REMSA (súper retardamiento en gel), se identificó que cuando se encuentra el alelo C del SNP -169 T/C este causa que se una específicamente el factor de transcripción NF-kB, por lo que este alelo lleva a una mayor expresión génica a través de la unión de esta proteína. Adicionalmente, estudios de cultivos de células de individuos sanos con los genotipos de interés del SNP -169 T/C, mostraron que los genotipos TC y CC cuando se compararon con el genotipo común (TT), estos mostraron una correlación con una mayor expresión de *FCRL3* en células B (Kochi et al., 2005). Dicha expresión alterada de *FCRL3* probablemente influye en la

señalización emitida por los motivos ITAM e ITIM provocando una activación desregulada de las células B (Golmoghaddam et al., 2013).

Por otro lado, diversos estudios genéticos han tratado de replicar el hallazgo identificado de asociación del SNP -169 T/C de *FCRL3* en pacientes con AR en otras poblaciones diferentes a la japonesa. Sin embargo, los datos sobre este polimorfismo en AR son controversiales, por ejemplo, en asiáticos, además de Kochi y cols. (2005), también en población China (Lin et al., 2016; Wu et al., 2010), así como en canadienses (Newman et al., 2006) y holandeses (Thabet et al., 2007), esta variante mostró asociación con susceptibilidad para AR. Mientras, otros investigadores han mostrado que esta variante no está asociada con AR, esto último ha sido identificado en población iraní (Golmoghaddam et al., 2013), coreana (Choi et al., 2006) y de EEUU (Hu et al., 2006). Mientras tanto, otros estudios han identificado esta variante asociada con gravedad de AR, más que con la susceptibilidad (Hu et al., 2006; Han et al., 2012).

Esta variante ha sido evaluada solo en una población Latino-Americana, y esta es la mexicana, sin embargo, esta variante fue analizada en pacientes con ARJ, no en AR (Ramírez-Bello et al., 2013). Los datos mostraron que el alelo C del SNP -169 T/C de *FCRL3* mostró asociación con protección para ARJ, pero esta fue dependiente de género, y la asociación solo fue identificada en los varones, mientras, las mujeres no mostraron ninguna asociación con susceptibilidad/protección para ARJ (Ramírez-Bello et al., 2013). A diferencia de la asociación del polimorfismo -169 T/C de *FCRL3* con protección para desarrollar

ARJ, en el presente estudio no se identificó ninguna asociación entre esta variante y AR (Rodríguez-Elías et al., 2016).

Las diferencias entre la asociación de esta variante de *FCRL3* y ARJ y la no asociación con AR en pacientes mexicanos (básicamente tanto los pacientes con ARJ y AR son del centro del país), se puede deber a lo siguiente:

- a) La AR es una enfermedad más homogénea, con diferentes manifestaciones (solo hay un tipo de AR), mientras la ARJ se clasifica en 3 subgrupos: 1. Pauciarticular u oligoarticular, 2. Poliarticular, y 3. Sistémica (Lagos et al., 2004; Khalkhali-Ellis et al., 2000).

Aunque la AR y la ARJ sean enfermedades autoinmunes y compartan características clínicas y patológicas similares, son enfermedades distintas y las principales diferencias son: la edad de aparición de la patología, para ARJ es antes de los 16 años y la AR aparece, generalmente, después de los 40; la ARJ puede afectar el desarrollo de los huesos y del crecimiento de los niños desapareciendo, en la mayoría de casos, en la edad adulta; mientras, la AR no desaparece y es una enfermedad crónico degenerativa que puede agravarse con el paso del tiempo, además cerca del 80% de los adultos con AR son positivos al FR, mientras en los niños es muy raro, sólo en la forma poliarticular se presenta, esta forma afecta principalmente a pacientes del sexo femenino y la presencia del FR puede ser un indicador de que la ARJ continuará en la etapa adulta (Garavito et al, 2003; Prahalad & Glass, 2002).

- b) Las frecuencias de los tres genotipos y de los alelos del SNP -169 T/C de *FCRL3* en controles de ARJ y AR no tienen diferencias significativas, es importante mencionar que los controles que se utilizaron en ARJ fueron n= 200 varones adultos (para garantizar que no desarrollaran ARJ), mientras que los controles con AR fueron n= 314, de los cuáles sólo 31 son varones. Esta diferencia en ambos grupos de controles pudo causar un sesgo en los resultados, provocando que no se observara una relación entre el SNP -169 T/C y protección a AR en los varones.
- c) Las frecuencias en ambos estudios se encuentran en E-HW en nuestra población por lo que las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación. Por otro lado, en los casos de pacientes con ARJ y AR las frecuencias en los tres genotipos y en los alelos son diferentes, esto puede deberse a que la muestra de pacientes varones con AR es más pequeña (16 hombres) en comparación con la muestra de pacientes con ARJ, lo que pudo haber afectado la falta de asociación entre el SNP -169 T/C de *FCRL3* y los hombres con AR.

El hecho de que el SNP -169 T/C brinde protección de manera dependiente de género en ARJ y que en AR no esté asociado a la enfermedad puede deberse también porque:

1. El alelo de susceptibilidad se encuentra en desequilibrio de ligamiento con la verdadera variante asociada con AR.

2. Este alelo o alguno de los genotipos interaccionan con diversos factores genéticos y/o ambientales así como la exposición a organismos patógenos. Estudios en gemelos han confirmado la fuerte influencia del factor genético ya que el riesgo para AR aumenta de 3 a 9 veces cuando hay un pariente de primer grado con la enfermedad. Diversos estudios de casos y controles han demostrado que fumar cigarrillos es el factor ambiental más fuerte relacionado con AR y se le atribuye el 25% de riesgo. En las mujeres, la AR se desarrolla en momentos en que los niveles de hormonas esteroides sexuales están en constante cambio, como en los periodos de postparto, perimenopáusico, ciclos menstruales irregulares, menopausia, entre otros (Karlson & Deane, 2012). Otros estudios también involucran la participación de virus (Epstein-Barr, Parvovirus B19) y bacterias (*Streptococcus*, *Mycoplasma*, *Proteus* y *E. Coli*) en el desarrollo de la patología (Rodríguez-Elías et al., 2016).

3. Es importante tener en cuenta el origen étnico en los estudios de asociación, sobre todo en poblaciones donde pudo ocurrir una mezcla étnica considerable (como nuestra población mexicana), ya que pueden existir diferencias en la asociación de la enfermedad en diferentes poblaciones (Eyre, et al., 2006).

Varias publicaciones han identificado una correlación entre el alelo C y algunos biomarcadores clínicos de AR, e incluye los péptidos anti-CC, FR y daño articular (Bajpai et al., 2012; Han et al., 2012; Kochi et al., 2005), esta correlación puede

indicar que el alelo C está implicado en la gravedad de AR, sin embargo, dado que se carece de esta información no se puede hacer alguna conclusión al respecto.

En el presente estudio la proporción mujeres–hombres es de 9:1; el número total de pacientes masculinos es de 16 (6.89%), mientras en ARJ, los varones representaron el 43% (87 pacientes hombres) de la población total, este número limita el análisis en varones ya que con esta proporción no se puede hacer ningún tipo de análisis, dado que no se cuenta con el tamaño de muestra y poder estadístico suficiente para tener una conclusión precisa.

CONCLUSIONES

- La AR se presentó en mujeres en una proporción superior a lo reportado (9:1), respecto a los varones.
- La distribución de los genotipos del SNP -169T/C de *FCRL3* se encontraron en E-HW, tanto en casos como controles.
- Se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -169 T/C del gen *FCRL3* y estas fueron similares en casos y controles.
- Este gen no está asociado con susceptibilidad para AR en población mexicana.

BIBLIOGRAFÍA

- Bajpai, U.D., Swainson, L.A., Mold, J.E., Graf, J.D., Imboden, J.B. & McCune, J.M. (2012). A functional variant in *FCRL3* is associated with higher Fc Receptor-Like 3 expression on T cell subset and Rheumatoid Arthritis disease activity. *Arthritis & Rheumatism* 2. 64(8):2451–2459.
- Beltrán-Ramírez, O., Mendoza-Rincón, J.F., Barbosa-Cobos, R.E., Alemán-Ávila, I. & Ramírez-Bello, J. (2016). STAT4 confers risk for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Mexican patients. *Immunology Letters*, 175: 40-3.
- Choi, C.B., Kang, C.P. Seong, S.S., Bae, S.C. & Kang, C. (2006). The - 169 C/T polymorphism in *FCRL3* is not associated with susceptibility to rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus in a case-control study of Koreans. *Arthritis and Rheumatology*, 54(12): 3838-3841.
- Díaz-González, J.F., Ferraz-Amaro, I. (2007). La célula B en la patogenia de la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica*, 3(4): 176–182.
- Eyre, S., Bowes, J., Potter, C., Worthington, J. & Barton, A. (2006). Association of the *FCRL3* gene with rheumatoid arthritis: a further example of population specificity? *Arthritis Research & Therapy*.
- Garavito, G., Malagón, C., Ramírez, L.A., De la cruz, O.F., Uribe, O., Navarro, E., Iglesias, A., Martínez, P. Jaraquemada, D., & Egea, E. (2003). Polimorfismo de los alelos de los antígenos de leucocitos humanos HLA-DRB1 y su asociación con la artritis reumatoidea juvenil en una muestra de niños mestizos colombianos. *Biomédica*, 23 (3), 254-262.
- Golmoghaddam, H., Amirghofran, Z., Aflaki, E., Kamali-Sarvestani, E., Shabani, M., Esmailbeig, M., & Rajabi, M. (2013). Association of

FCRL3 Genotypes with Susceptibility of Iranian Patients To Rheumatoid Arthritis. *Informa Healthcare*, 42(4), 296-306.

- Han, S.W., Sa, K.H., Kim, S.I., Lee, S.I., Park, Y.W., Lee, S.S., Yoo, W.H., Kang, J.Y., Soe, J.S., Nam, E.J., Lee, J., Park, J.Y. Kang, Y.M. (2012). FCRL3 gene polymorphisms contribute to the radiographic severity rather than susceptibility of rheumatoid arthritis. *Human Immunology*, 73(5): 537–542.
- Hu, X., Chang, M., Saiki, R.K., Cargill, M.A., Begovich, A.B., Ardlie, K.G., Criswell, L.A., Seldin, M.F., Amos, C.I., Gregersen, P.K., Kastner, D.L., Remmers, E.F. (2006). The functional -169T/C single-nucleotide polymorphism in FCRL3 is not associated with rheumatoid arthritis in white North Americans. *Arthritis & Rheumatism*, 54(3): 1022–1025.
- Kamphuis, S., Kuis, W., de Jager, W., Teklenburg, G., Massa, M., Gordon, G., Boerhof, M., Rijkers, G.T., Uiterwaal, C.S., Otten, H.G., Sette, A., Albani, S. & Prakken BJ. (2005). Tolerogenic immune responses to novel T-cell epitopes from heat-shock protein 60 in juvenile idiopathic arthritis. *Lancet*, 366, 50-56.
- Karlson, E. W., & Deane, K. (2012). Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 38(2), 405–426.
- Khalkhali-Ellis, Z., Moore, T.L., & Hendrix, M.J.C. (2000). Could hormones make a difference in the treatment of juvenile rheumatoid arthritis? *BioDrugs*. 13(2): 77-86.
- Kochi, Y., Yamada, R., Suzuki, A., Harley, J.B., Shirasawa, S., Sawada, T., Bae, S.C., Tokuhira, S., Chang, X., Sekine, A., Takahashi, A., Tsunoda, T., Ohnishi, Y., Kaufman, K.M., Kang, C.P., Kang, C., Otsubo, S., Yumura,

- W., Mimori, A., Koike, T., Nakamura, Y., Sasazuki, T. & Yamamoto K. (2005). A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nature Genetics*, 37(5), 478-85.
- Lagos, L., Aguijar, H., & Meléndez, J.H. (2004). Artritis reumatoidea juvenil. *Honduras pediátrica*. 24(2).
 - Lee, D.M., & Weinblatt, M.E. (2001). Rheumatoid arthritis, review. *The Lancet*, 358, 903-911.
 - Li, F.J., Schreeder, D.M., Li, R. Wu, J. & Davis, R.S. (2013). FCRL3 promotes TLR9-induced B cell activation and suppresses plasma cell differentiation. *European Journal of Immunology*, 43(11): 1–18.
 - Lin, X., Zhanh, Y., & Chen, Q. (2016). *FCRL3* gene polymorphisms as risk factors for rheumatoid arthritis. *Human Immunology*, 77, 223-29.
 - López-Cano D.J., Cadena-Sandoval, D., Beltrán-Ramírez, O., Barbosa-Cobos, R.E., Sánchez-Muñoz, F., Amezcua-Guerra, L.M., Juárez-Vicuña, Y., Aguilera-Cartas, M.C., Moreno, J., Bautista-Olvera, J., Valencia-Pacheco, G., López-Villanueva, R.F. & Ramírez-Bello, J. (2017). The PTPN22 R263Q polymorphism confers protection against systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis, while PTPN22 R620W confers susceptibility to Graves' disease in a Mexican population. *Inflammation Research*, 66(9): 775-781.
 - Nashi, E., Wang, Y. & Diamond, B. (2010). The Role Of B Cells in Lupus Pathogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(4): 543–550.
 - Newman, W.G., Zhang, Q., Liu, X., Walker, E., Ternan, H., Owen, J., Johnson, B., Greer, W., Mosher, D.P., Maksymowych, W.P., Keystone,

E.C., Amos, C.I. & Siminovitch, K.A. (2006). Rheumatoid arthritis association with the *FCRL3* –169C polymorphism is restricted to *PTPN22* 1858T–homozygous individuals in a Canadian population. *Arthritis and Rheumatology*, 54(12): 3820-3827.

- Nimmerjahn, F. & Ravetch, J.V. (2007). Fc-receptors as regulators of immunity. *Advances in Immunology*, 96: 179–204.
- Prahalad, S., & Glass, D.N. (2002). Is juvenile rheumatoid arthritis/juvenile idiopathic arthritis different from rheumatoid arthritis?. *Arthritis Research & Therapy*. 4(3): 303-310.
- Pratt, A.G., Isaacs J.D., & Matthey D.L.. (2009). Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 23(1), 37–48.
- Ramírez-Bello, J., Jiménez-Morales, S., Espinosa-Rosales, F., Gómez-Vera, J., Gutiérrez, A., Velázquez-Cruz, R., Baca, V. & Orozco, L. (2013). Juvenile rheumatoid arthritis and asthma, but not childhood-onset systemic lupus erythematosus are associated with *FCRL3* polymorphisms in Mexicans. *Molecular Immunology*, 53: 374–378.
- Ramírez Bello, J. Genómica estructural y funcional en las enfermedades multifactoriales. Ed. Leea. Julio 2016. México.
- Ramírez-Bello, J. & Jiménez-Morales, M. (2017). Implicaciones funcionales de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes codificantes de proteínas y no codificantes en enfermedades multifactoriales. *Gaceta Médica de México*, 153, 238-50.

- Rincón, J.F., Cano, D.L., Morales, S.J., Jiménez, M.L., Cobos, R.E. & Bello, J.R. (2016). The functional PTPN22 C1858T polymorphism confers risk for rheumatoid arthritis in patients from Central Mexico. *Clinical Rheumatology*, 35(6): 1457-1462.
- Rodríguez-Elías, A.K., Maldonado-Murillo, K., López-Mendoza, L.F. & Ramírez-Bello, J. (2016). Genética y genómica en artritis reumatoide (AR): una actualización. *Gaceta Médica de México*, 152 (2).
- Rodríguez-Elías, A.K., Fragoso, J.M. Vargas-Alarcón, G., Maldonado-Murillo, K., Rivas-Jiménez, M.L., Barbosa-Cobos, R.E., Jiménez-Morales, S., Lugo-Zamudio, G., Tovilla-Zárate, C. & Ramírez-Bello, J. (2016). MHC2TA and FCRL3 genes are not associated with rheumatoid arthritis in Mexican patients. *Rheumatology International*, 36(2): 249-254.
- Smith, M.U. & Baldwin, J.T. (2015). Making Sense of Hardy-Weinberg Equilibrium. *The American Biology Teacher*, 77 (8), 577–582.
- Stark, S.D. (2013). Rheumatoid arthritis. *Magill's Medical Guide (Online Edition)*.
- Thabet, M.M., Wesoly, J., Slagboom, P.E., Toes, R.E.M., & Huizinga, T.W.J. (2007). FCRL3 promoter 169 CC homozygosity is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in Dutch Caucasians. *Rheumatic Diseases*, 66:803-806.
- Weisman, M.H. (2011). *Rheumatoid Arthritis*. Oxford American Rheumatology Library. Oxford: Oxford University Press. Base de datos: eBook Collection.

- Wu, H., Yang, L.H., Zuo, J., Liang, Y.L., Li, P.Q., Liu, W., & Xie, X.D. (2010). Fc receptor-like 3 gene polymorphisms confer susceptibility to rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Human Immunology*, 71, 1203-1208.

ANEXOS


Anexo 1.

- Rodríguez-Elías, A.K., Fragoso, J.M. Vargas-Alarcón, G., Maldonado-Murillo, K., Rivas-Jiménez, M.L., Barbosa-Cobos, R.E., Jiménez-Morales, S., Lugo-Zamudio, G., Tovilla-Zárate, C. & Ramírez-Bello, J. (2016). *MHC2TA* and *FCRL3* genes are not associated with rheumatoid arthritis in Mexican patients. *Rheumatol. Int.* 36(2): 249-254.

Anexo 2.

- Rodríguez-Elías, A.K., Maldonado-Murillo, K., López-Mendoza, L.F. & Ramírez-Bello, J. (2016). Genética y genómica en artritis reumatoide (AR): una actualización. *Gac Med Mex*, 152 (2).

***MHC2TA* and *FCRL3* genes are not associated with rheumatoid arthritis in Mexican patients**

J. F. Mendoza Rincón¹ · A. K. Rodríguez Elias^{2,10} · J. M. Fragoso³ ·
G. Vargas Alarcón³ · K. Maldonado Murillo⁴ · M. L. Rivas Jiménez⁵ ·
R. E. Barbosa Cobos⁶ · S. Jimenez Morales⁷ · G. Lugo Zamudio⁸ · C. Tovilla Zárate⁹ ·
J. Ramírez Bello¹⁰ 

Received: 30 June 2015 / Accepted: 1 September 2015 / Published online: 8 September 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Rheumatoid arthritis (RA) is a multifactorial disease. A combination of genetic and environmental risk factors contributes to its etiology. Several genes have been reported to be associated with susceptibility to the development of RA. The *MHC2TA* and *FCRL3* genes have been associated previously with RA in Swedish and Japanese populations, respectively. In two recent reports, we show an association between *FCRL3* and juvenile rheumatoid arthritis (JRA), and *MHC2TA* and acute coronary syndrome (ACS) in Mexican population. We assessed the association between three single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *MHC2TA* (−168G/A; rs3087456, and +16G/C; rs4774) and *FCRL3* (−169T/C; rs7528684) genes and rheumatoid arthritis in Mexican population through a genotyping method using allelic discrimination assays with TaqMan probes. Our case–control study included 249 patients with RA and 314 controls. We found no evidence of an association between the *MHC2TA* −168G/A and +1614G/C or *FCRL3* −169T/C polymorphisms and RA in this Mexican population. In this cohort of Mexican patients with RA, we

observed no association between the *MHC2TA* or *FCRL3* genes and this autoimmune disease.

Keywords *MHC2TA* · *FCRL3* · Polymorphism · Rheumatoid arthritis

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune disease of the joints that affects approximately 0.5–1 % of the population worldwide [1]. RA is characterized by synovial inflammation and leads to progressive destruction of articular cartilage, bone resorption, and sometimes death [2, 3]. RA predominantly affects women, with a 3:1 female-to-male ratio [4]. Although the etiology of RA is still unknown, a growing body of evidence suggests that the pathogenesis of this autoimmune disease involves a complex interaction of genetic and environmental risk factors [5]. Through candidate

✉ J. Ramírez Bello
dr.julian.ramirez.hjm@gmail.com

¹ Laboratorio de Oncología Molecular, Unidad de Diferenciación Celular y Cáncer, FES-Zaragoza, UNAM, Mexico City, Mexico

² Programa de Maestría en Biología Experimental, UAM-I, México City, Mexico

³ Departamento de Biología Molecular, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico

⁴ Licenciatura en Biología, Facultad de Estudios Superiores, Zaragoza, UNAM, Mexico City, Mexico

⁵ Servicio de Reumatología, Hospital Lic. Adolfo López Mateos, Mexico City, Mexico

⁶ Servicio de Reumatología, Hospital Juárez de México, Mexico City, Mexico

⁷ Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico

⁸ División de Medicina, Hospital Juárez de México, Mexico City, Mexico

⁹ División Académica Multidisciplinaria de Comalcalco, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Comalcalco, Tabasco, Mexico

¹⁰ Laboratorio de Medicina Genómica, Unidad de Investigación, Hospital Juárez de México, Av. Instituto Politécnico Nacional No. 5160, Delegación Gustavo A. Madero, C.P. 07760 Mexico City, D.F, Mexico

gene or genome-wide association studies (GWAS), many genes have been shown to be associated with susceptibility to RA in different populations [6–10]. The MHC class II transactivator (*MHC2TA*) and Fc receptor-like protein 3 (*FCRL3*) genes have been associated with increased risk of RA in Swedish and Japanese populations, respectively [11, 12]. *MHC2TA* and *FCRL3* are located in regions that exhibit evidence of genetic linkage to RA and other autoimmune diseases [12, 13]. The *MHC2TA* gene is located in the 19p13 chromosomal region and encodes the CIITA protein, a non-DNA-binding coactivator, which serves as a master regulator for the expression of *MHC2TA* and other genes involved in antigen presentation [14]. In 2005, Swanberg et al. [11] reported an association of the *MHC2TA* –168G/A single nucleotide polymorphism (SNP) with increased risk of RA in the Swedish population. However, despite the work of several studies in other populations, this finding has only been reproduced in Spanish and Japanese populations [15–25].

The *FCRL3* gene is located on chromosomal region 1p21, is a member of the immunoglobulin receptor superfamily, and encodes the Fc receptor-like protein 3, which is predominantly expressed in B cells and acts in the regulation of the immune system [12, 26, 27]. In 2005, Kochi et al. [12] reported an association between the *FCRL3* –169T/C polymorphism and RA susceptibility in Japanese patients. Afterward, this finding was replicated in several Caucasian- and Asian-derived populations [28–45]. Additionally, an association between the *FCRL3* –169T/C polymorphism and the severity/activity of RA has been reported [46–48].

Interestingly, we recently identified a male-gender-dependent association between the *FCRL3* –169T/C polymorphism and protection against juvenile rheumatoid arthritis (JRA), as well as an association between the *MHC2TA* +1614G/C polymorphism and susceptibility to acute coronary syndrome (ASC) in Mexican population [49, 50]. In the present study, we analyzed genotype and allelic frequencies and assessed whether the *MHC2TA* –168G/A, +1614G/C, and *FCRL3* –169T/C SNPs are risk factors for RA in a Mexican study population.

Patients and methods

Study population

Two hundred forty-nine RA patients (232 females/17 males) and 314 healthy controls (283 females/31 males) were enrolled in the present study. Both the cases and the controls were unrelated individuals and self-reported as Mexican Mestizo ethnicity (three generations). A Mexican Mestizo is defined as a person who born in Mexico and has history ascendance of admixture ethnicity from Native

American and Caucasian or African who came to America during the sixteenth century. It is important to note that the African contribution is <5 % of the genetic background in mostly Mestizo individuals [51]. RA patients were referred from the rheumatology departments of the Hospital Juárez de México (SSA) and the Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos (ISSSTE). All RA patients were diagnosed in accordance with the 2010 revised classification criteria of the American College of Rheumatology (ACR). The control group included unrelated healthy participants with no family history of autoimmune or inflammatory disease (three generations). The cases and controls included in this study were ethnically matched. Control participants were referred from the Hospital Juárez de México and the Hospital Regional Adolfo López Mateos. The institutional Ethics, Research, and Biosecurity committees approved this study. All study participants provided written informed consent.

DNA extraction

A total of 5 ml EDTA-treated whole blood was obtained from each patient and each control. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using the Invisorb Blood Universal Kit (Strattec molecular GmbH, Berlin, Germany) according to the manufacturer's specifications. DNA was quantified, diluted, and stored at –20 °C until use.

Determination of the polymorphisms

The *MHC2TA* –168G/A (rs3087456), +1614G/C (rs4774), and *FCRL3* –169T/C (rs7528684) SNPs were genotyped using an allelic discrimination assay with 5' exonuclease TaqMan SNP genotyping assays on a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, California, USA), according to the manufacturer's instructions. Thirty percent of the samples were genotyped twice (for the three polymorphisms); the reproducibility of the results was 100 %.

Haplotype analysis

Pairwise linkage disequilibrium (LD) was measured (r^2) between the two polymorphisms of the *MHC2TA* gene. Haplotype blocks were constructed using Haploview software version 4.2 (Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA, USA).

Statistical analysis

The Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) for the three SNPs of *MHC2TA* and *FCRL3* genes was evaluated using the Chi-square test, as implemented using FINETTI

Table 1 Allele and genotype frequencies of the *MHC2TA* +1614G/C, -168G/A, and *FCRL3* -169T/C polymorphisms and association analysis in RA patients and controls

Gene SNP	RA n = 249 n (%)	Controls n = 314 n (%)	OR	95 % CI	p
<i>MHC2TA</i> +1614G/C genotype					
GG	67 (26.9)	86 (28.4)	–	–	–
GC	114 (45.8)	133 (43.9)	1.10	0.73–1.65	0.64
CC	68 (27.3)	84 (27.7)	1.03	0.66–1.63	0.87
Allele					
G	248 (49.8)	305 (50.3)	–	–	–
C	250 (50.2)	301 (49.7)	1.02	0.81–1.29	0.86
-168G/A genotype					
GG	141 (57.3)	162 (53.6)	–	–	–
GA	88 (35.8)	107 (35.4)	0.95	0.66–1.36	0.76
AA	17 (6.9)	33 (11)	0.59	0.32–1.11	0.10
Allele					
G	370 (75.2)	431 (71.4)	–	–	–
A	122 (24.8)	173 (28.6)	0.82	0.63–1.08	0.15
<i>FCRL3</i> -169T/C genotype					
TT	70 (28.2)	84 (26.8)	–	–	–
TC	125 (50.4)	143 (45.5)	1.05	0.71–1.56	0.81
CC	53 (21.4)	87 (27.7)	0.73	0.46–1.16	0.18
Allele					
T	265 (53.4)	311 (49.5)	–	–	–
C	231 (46.6)	317 (50.5)	0.86	0.68–1.08	0.19

OR odds ratio, CI confidence intervals, p statistical significant

software (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). HWE was tested independently for each SNP. We used EPIDAT 3.1 software to estimate the association between certain alleles and genotypes of *MHC2TA* and *FCRL3* genes and RA susceptibility, and to obtain the odds ratio (OR), 95 % confidence interval (95 % CI), and p value (http://www.sergas.es/MostrarContidos_N3_T01.aspx?IdPaxina=62715).

Results

The mean (±SD) age of RA patients and controls was 52.1 ± 7.8 and 49.5 ± 6.9 years, respectively. The

female-to-male ratio was 93.2 %/6.8 % (232/17) in RA patients and 90.1 %/9.9 % (283/31) in controls. All three SNPs, two of the *MHC2TA* gene and one of the *FCRL3* gene, were in HWE ($p > 0.01$, data not shown) in patients and controls. Table 1 summarizes the genotype and allele frequencies of the *MHC2TA* -168G/A, +1614G/C, and *FCRL3* -169T/C polymorphisms. The genotype and allele frequencies of the three SNPs occurred with similar frequencies in RA patients and controls, and no statistically significant differences were observed between the two groups neither after stratification by gender (data not shown). Haplotype frequency distributions of the *MHC2TA* -168G/A and +1614G/C polymorphisms are shown in Table 2, and no association between any haplotype of the *MHC2TA* gene and RA was observed. We observed no LD between the two polymorphisms of the *MCH2TA* gene in RA patients and controls ($r^2 = 0.39$).

Discussion

The *MHC2TA* and *FCRL3* genes have been associated previously with susceptibility to RA in the Swedish and Japanese populations, respectively [11, 12]. Recently, we found an association between *FCRL3* and *MHC2TA* with JRA and ACS, respectively. This study assays whether the two polymorphisms of the *MHC2TA* gene (-168G/A and +1614G/C) and the *FCRL3* -169T/C gene polymorphism are associated with RA in Mexican patients. Our results suggest that the *MHC2TA* -168G/A and +1614G/C and *FCRL3* -169T/C SNPs are not associated with RA in our population.

Swanberg et al. [11] demonstrated that the functional -168G/A SNP located in the promoter region of the *MHC2TA* gene confers risks to RA, multiple sclerosis (MS), and myocardial infarction. That study showed that the GG genotype was associated with a reduced *MHC2TA* gene expression [11]. The missense *MHC2TA* +1614G/C variant has been associated with systemic lupus erythematosus and MS. This causes an amino acid substitution from glycine to alanine at position 500. However, its functional consequence is still unknown [52]. *MHC2TA* encodes the class II transactivator (CIITA), which is referred to as the

Table 2 Haplotype analysis of the *MHC2TA* -168G/A and +1614G/C SNPs in RA patients and control subjects

MHC2TA haplotypes—168G/A/1614G/C	Frequencies		OR	95 % CI	p
	Cases n (%)	Controls n (%)			
GC	212 (0.426)	252 (0.413)	1.06	0.83–1.35	0.64
GG	163 (0.327)	184 (0.300)	1.13	0.88–1.46	0.34
AG	85 (0.170)	122 (0.200)	0.82	0.61–1.12	0.22
AC	38 (0.078)	53 (0.087)	0.87	0.56–1.34	0.53

OR odds ratio, CI confidence interval, p p value

“master regulator” for the expression of MHC class II genes and is required for MHC-II-mediated antigen presentation [14]. Our findings are consistent with those studies that have failed to replicate the association with RA in UK, Austrian, German, British, North American (European ancestry), Swedish, Argentinean, and Spanish populations [15–22, 25].

The association between the *FCRL3* –169T/C polymorphism and RA susceptibility was firstly reported in Japanese population. In this study, the functional *FCRL3* –169C risk allele increased the expression of *FCRL3* on B cells. This allele is located within the consensus sequence binding site for the NF- κ B transcription factor in the promoter of the *FCRL3* gene [12]. Several studies have evaluated the relationship between the *FCRL3* –169T/C SNP and RA susceptibility in different populations. Some studies have replicated the association between this polymorphism and RA susceptibility, while others have reported an association between the SNP and RA severity or activity [28–48]. Meanwhile, other studies have shown an integration between the *FCRL3* –169T/C SNP with other genotypes from other genes [29, 32]. Several meta-analyses have demonstrated a specific association in Asian population and a trend in the Caucasian population [41, 44, 45]. The current study suggests that the *FCRL3* –169T/C SNP is not associated with RA in Mexican patients neither after gender stratification analysis. We previously identified a male-gender-dependent association between the *FCRL3* –169T/C and protection against JRA in the Mexican population [49].

However, a major limitation of this work is the small number of male patients with RA: 17 (6.85 %) compared with our previous study (43 % patients with JRA; the sample size was 87 individuals), since the proportion of male patients with RA may affect and indeed may lead to the lack of association between the *FCRL3* –169T/C SNP and males. Another potential confounding factor is the heterogeneity of the Mexican Mestizo population, which is characterized by a very complex genetic background due to the different contribution of Native American (56 %), Caucasian (37 %), and African (5 %) populations during the conquest [51]. Hence, matching cases and controls using ancestry informative markers could reduce any possible stratification effect. Additional studies are needed to determine the role of the *FCRL3* –169T/C SNP in RA patients in other Latin American population.

Our results suggest that the *MHC2TA* –168G/A, +1416G/C, and *FCRL3* –169T/C SNPs are not associated with RA in the Mexican population, and are not genetic risk factors regarding the development of this pathology.

Acknowledgments The authors are grateful to the study participants. Institutional Review Board approval was obtained for all sample collections.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest We have no personal or financial conflicts of interest regarding this manuscript.

References

- MacGregor AJ, Silman AJ (2003) Rheumatoid arthritis and other synovial disorders: classification and epidemiology. In: Hochberg MC (ed) Rheumatology, 3rd edn. Mosby, New York, pp 757–763
- Alamanos Y, Drosos AA (2005) Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 4:130–136
- Charles-Schoeman C (2012) Cardiovascular disease and rheumatoid arthritis: an update. *Curr Rheumatol Rep* 14:455–462
- Van Vollenhoven RF (2009) Sex differences in rheumatoid arthritis: more that meets the eye. *BMC Med* 7:12
- Karlson EW, Deane K (2012) Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 38:405–426
- Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K et al (2014) Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 506:376–381
- Bax M, van Heemst J, Huizinga TW, Toes RE (2011) Genetics of rheumatoid arthritis: What have we learned? *Immunogenetics* 63:459–466
- Kurkó J, Besenyei T, Laki J, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z (2013) Genetics of rheumatoid arthritis—a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 45:170–179
- Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson B et al (2010) Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet* 42:508–514
- Eyre S, Bowes J, Diogo D, Lee A, Bartón A, Martín P et al (2012) High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 44:1336–1340
- Swanberg M, Lidman O, Padyukov L, Eriksson P, Akesson E, Jagodic M et al (2005) MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction. *Nat Genet* 37:486–494
- Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB, Shirasawa S, Sawada T et al (2005) A functional variant in *FCRL3*, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nat Genet* 37:478–485
- Eyre S, Barton A, Shephard N, Hinks A, Brintnell W, MacKay K et al (2004) Investigation of susceptibility loci identified in the UK rheumatoid arthritis whole-genome scan in a further series of 217 UK affected sibling pairs. *Arthritis Rheum* 50:729–735
- Otten LA, Leibundgut-Landmann S, Huarte J, Kos-Braun IC, Lavanchy C, Barras E et al (2006) Revisiting the specificity of the MHC class II transactivator CIITA in vivo. *Eur J Immunol* 36:1548–1558
- Eyre S, Bowes J, Spreckley K, Potter C, Ring S, Strachan D, Worthington J et al (2006) Investigation of the MHC2TA gene, associated with rheumatoid arthritis in a UK rheumatoid arthritis cohort. *Arthritis Rheum* 54:3417–3422
- Yazdani-Biuki B, Brickmann K, Wohlfahrt K, März W, Renner W, Gutjahr M et al (2006) The MHC2TA –168A>G gene polymorphism is not associated with rheumatoid arthritis in Austrian patients. *Arthritis Res Ther* 8:R97
- Akkad DA, Jagiello P, Szyld P, Goedde R, Wiczorek S, Gross WL et al (2006) Promoter polymorphism rs3087456 in the MHC class II transactivator gene is not associated with susceptibility

- for selected autoimmune diseases in German patient groups. *Int J Immunogenet* 33:59–61
18. Harrison P, Pointon JJ, Farrar C, Harin A, Wordsworth BP (2007) MHC2TA promoter polymorphism (−168*G/A, rs3087456) is not associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in British Caucasian rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology* 46:409–411
 19. Bronson PG, Ramsay PP, Seldin MF, Gregersen PK, Criswell LA, Barcellos LF (2011) CITA is not associated with risk of developing rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 12:235–238
 20. Orozco G, Robledo G, Linga Reddy MV, García A, Pascual-Salcedo D, Balsa A et al (2006) Study of the role of a functional polymorphism of MHC2TA in rheumatoid arthritis in three ethnically different populations. *Rheumatology (Oxford)* 45:1442–1444
 21. Dieguez-Gonzalez R, Akar S, Calaza M, Gonzalez Alvaro I, Fernandez Gutierrez B, Lamas JR et al (2009) Lack of association with rheumatoid arthritis of selected polymorphisms in 4 candidate genes: cFH, CD209, eotaxin-3, and MHC2TA. *J Rheumatol* 36:1590–1595
 22. Martínez A, Sánchez López M, Varadé J, Mas A, Martín MC, de Las Heras V et al (2007) Role of the MHC2TA gene in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 66:325–329
 23. Iikuni N, Ikari K, Momohara S, Tomatsu T, Hara M, Yamanaka H et al (2007) MHC2TA is associated with rheumatoid arthritis in Japanese patients. *Ann Rheum Dis* 66:274–275
 24. O'Doherty C, Hawkins S, Rooney M, Vanderbroeck K (2007) The MHC2TA −168A/G and +1614G/C polymorphisms and risk for multiple sclerosis or chronic inflammatory arthropathies. *Tissue Antigens* 70:247–251
 25. Bronson PG, Criswell LA, Barcellos LF (2008) The MHC2TA −168A/G polymorphism and risk for rheumatoid arthritis: a meta-analysis of 6861 patients and 9270 controls reveals no evidence for association. *Ann Rheum Dis* 67:933–936
 26. Chistiakov DA, Chistiakov AP (2007) Is FCRL3 a new general autoimmunity gene? *Hum Immunol* 68:375–383
 27. Kochi Y, Myouzen K, Yamada R, Suzuki A, Kurosaki T, Nakamura Y et al (2009) FCRL3, an autoimmune susceptibility gene, has inhibitory potential on B-cell receptor-mediated signaling. *J Immunol* 183:5502–5510
 28. Choi CB, Kang CP, Seong SS, Bae SC, Kang C (2006) The −169C/T polymorphism in FCRL3 is not associated with susceptibility to rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus in a case–control study of Koreans. *Arthritis Rheum* 54:3838–3841
 29. Newman WG, Zhang Q, Liu X, Walker E, Ternan H, Owen J et al (2006) Rheumatoid arthritis association with the FCRL3 −169C polymorphism is restricted to PTPN22 1858T-homozygous individuals in a Canadian population. *Arthritis Rheum* 54:3820–3827
 30. Eyre S, Bowes J, Potter C, Worthington J, Barton A (2006) Association of the FCRL3 gene with rheumatoid arthritis: a further example of population specificity? *Arthritis Res Ther* 8:R117
 31. Hu X, Chang M, Saiki RK, Cargill MA, Begovich AB, Ardlie KG et al (2006) The functional −169T→C single-nucleotide polymorphism in FCRL3 is not associated with rheumatoid arthritis in white North Americans. *Arthritis Rheum* 54:1022–1025
 32. Martínez A, Sánchez E, Valdivia A, Orozco G, López-Nevot MA, Pascual-Salcedo D et al (2006) Epistatic interaction between FCRL3 and NFκappaB1 genes in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 65:1188–1191
 33. Ikari K, Momohara S, Nakamura T, Hara M, Yamanaka H, Tomatsu T et al (2006) Supportive evidence for a genetic association of the FCRL3 promoter polymorphism with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 65:671–673
 34. Thabet MM, Wesoly J, Slagboom PE, Toes RE, Huizinga TW (2007) FCRL3 promoter 169CC homozygosity is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in Dutch Caucasians. *Ann Rheum Dis* 66:803–806
 35. Owen CJ, Kelly H, Eden JA, Merriman ME, Pearce SH, Merriman TR (2007) Analysis of the Fc receptor-like-3 (FCRL3) locus in Caucasians with autoimmune disorders suggest a complex pattern of disease association. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1106–1111
 36. Begovich AB, Chang M, Schrodi SJ (2007) Meta-analysis evidence of a differential risk of the FCRL3 −169T→C polymorphism in white and East Asian rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 56:3168–3171
 37. Takata Y, Inoue H, Sato A, Tsugawa K, Miyatake K, Hamada D et al (2008) Replication of reported genetic associations of PADI4, FCRL3, SLC22A4 and RUNX1 genes with rheumatoid arthritis: results of an independent Japanese population and evidence from meta-analysis of East Asian studies. *J Hum Genet* 53:163–173
 38. Eike MC, Nordang GB, Karlsen TH, Boberg KM, Vatn MH, Dahl-Jørgensen K et al (2008) The FCRL3-169T>C polymorphism is associated with rheumatoid arthritis and shows suggestive evidence of involvement with juvenile idiopathic arthritis in a Scandinavian panel of autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 67:1287–1291
 39. Plant D, Barton A, Thomson W, Ke X, Eyre S, Hinks A et al (2009) A re-evaluation of three putative functional single nucleotide polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 68:1373–1375
 40. Wu H, Yang LH, Zhu J, Liang YL, Li PQ, Liu W et al (2010) Fc receptor-like 3 gene polymorphisms confer susceptibility to rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Hum Immunol* 71:1203–1208
 41. Lee YH, Woo JH, Choi SJ, Ji JD, Song GG (2010) Fc receptor-like 3−169C/T polymorphism and RA susceptibility: a meta-analysis. *Rheumatol Int* 30:947–953
 42. Chen JY, Wang CM, Wu YJ, Kuo SN, Shiu CF, Chang SW et al (2011) Disease phenotypes and gender association of FCRL3 single-nucleotide polymorphism −169T/C in Taiwanese patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 38:264–270
 43. Golmoghaddam H, Amirghofran Z, Aflaki E, Kamali-Sarvestani E, Shabani M, Esmailbeig M et al (2013) Association of FCRL3 genotypes with susceptibility of Iranian patients to rheumatoid arthritis. *Immunol Invest* 42:296–306
 44. Song GG, Bae SC, Kim JH, Choi SJ, Ji JD, Lee YH (2013) Association between functional Fc receptor-like 3 (FCRL3) −169C/T polymorphism and susceptibility to seropositive rheumatoid arthritis in Asians: a meta-analysis. *Hum Immunol* 74:1206–1213
 45. Nong LM, Ren KW, Mi YY, Xu NW, Zhou D (2013) An updated meta-analysis of the Fc receptor-like 3−169T/C polymorphism and rheumatoid arthritis risk. *Scand J Rheumatol* 42:270–275
 46. Maehlen MT, Nordang GB, Syversen SW, van der Heijde DM, Kvien TK, Uhlig T et al (2011) FCRL3 −169C/C genotype is associated with anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis and with radiographic progression. *J Rheumatol* 38:2329–2335
 47. Han SW, Sa KH, Kim SI, Lee SI, Park YW, Lee SS et al (2012) FCRL3 gene polymorphisms contribute to the radiographic severity rather than susceptibility of rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 73:537–542
 48. Bajpai UD, Swainson LA, Mold JE, Graf JD, Imboden JB, McCune JM (2012) A functional variant in FCRL3 is associated with higher Fc receptor-like 3 expression on T cell

- subsets and rheumatoid arthritis disease activity. *Arthritis Rheum* 64:2451–2459
49. Ramírez Bello J, Jiménez Morales S, Espinoza Rosales F, Gómez Vera J, Gutiérrez A, Velázquez Cruz R et al (2013) Juvenile rheumatoid arthritis and asthma, but not childhood-onset systemic lupus erythematosus are associated with FCRL3 polymorphisms in Mexicans. *Mol Immunol* 53:374–378
 50. Vargas Alarcón G, Martínez Ríos MA, Peña Duque MA, Posadas Romero C, Cardoso Saldaña G, Vallejo M et al (2013) The MHC2TA 1614C> G gene polymorphism is associated with risk of developing acute coronary syndrome. *Mol Immunol* 55:424–428
 51. Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuña-Alonzo V, Quinto-Sanchez M, Jaramillo C, Arias W et al (2014) Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 Individuals. *PLoS Genet* 10:e1004572
 52. Bronson PG, Goldstein BA, Ramsay PP, Beckman KB, Noble JA, Lane JA et al (2011) The rs4774 *CIITA* missense variant is associated with risk of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 12:667–671

Genética y genómica en artritis reumatoide (AR): una actualización

Ana Karen Rodríguez-Elías^{1,3}, Karina Maldonado-Murillo^{2,3}, Luis Fernando López-Mendoza^{2,3} y Julián Ramírez-Bello^{3*}

¹Posgrado en Biología Experimental, UAM-I; ²Licenciatura en Biología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM; ³Laboratorio de Medicina Genómica, Unidad de Investigación. Hospital Juárez de México, SSA, Ciudad de México, México

Resumen

La AR, una enfermedad inflamatoria, crónica y autoinmune, afecta aproximadamente al 1% de la población general. Se caracteriza por presentar inflamación, dolor, destrucción del cartilago y erosión del hueso. La AR pertenece al grupo de enfermedades multifactoriales, en cuyo desarrollo influyen diversos factores de riesgo ambientales y genéticos. Los estudios en familias indican que el desarrollo de la AR está fuertemente influenciado por el componente genético. Actualmente, conocemos aproximadamente 100 loci asociados no sólo con la susceptibilidad, sino también con la gravedad, la actividad y la respuesta al tratamiento de la AR; entre ellos se encuentran genes que codifican para el antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II, PTPN22, STAT4, CTLA4, TRAF1, PADI4, FCRL3, TNFIP3, TNF- α y miARN, entre otros. Esta revisión tiene como objetivo describir el papel de diversos genes involucrados en la regulación del sistema inmunológico innata y adaptativa que han mostrado asociación con la susceptibilidad a la AR, en diversas poblaciones, incluida la mexicana.

PALABRAS CLAVE: Gen. Genética. Genómica. Susceptibilidad.

Abstract

Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory autoimmune disease that affects approximately 0.5-1% of the general population and leads to chronic synovial inflammation, destruction of cartilage and bone, and disability. The heritability of rheumatoid arthritis has been estimated to be about 60%, while the contribution of HLA to heritability has been estimated to be 11-37%. Other genes, such as PTPN22, STAT4, CTLA4, TRAF1, PADI4, IRF5, FCRL3, TNFIP3, TNF- α , miRNAs, CD28, CD40, TYK2, etc., have been associated with susceptibility, severity, activity, and treatment response of rheumatoid arthritis. The aim of this review is to describe the role of gene variants located in immune system genes associated with susceptibility to rheumatoid arthritis. (Gac Med Mex. 2016;152:218-27)

Corresponding author: Julián Ramírez Bello, dr.julian.ramirez.hjm@gmail.com

KEY WORDS: Gene. Genetics. Genomics. Rheumatoid arthritis. Susceptibility.

Correspondencia:

*Julián Ramírez-Bello
Laboratorio de Medicina Genómica
Unidad de Investigación
Hospital Juárez de México
Av. Politécnico Nacional, 5160
Del. Gustavo A. Madero México,
C.P. 07760, Ciudad de México, México
E-mail: dr.julian.ramirez.hjm@gmail.com

Fecha de recepción en versión modificada: 26-06-2015
Fecha de aceptación: 06-07-2015

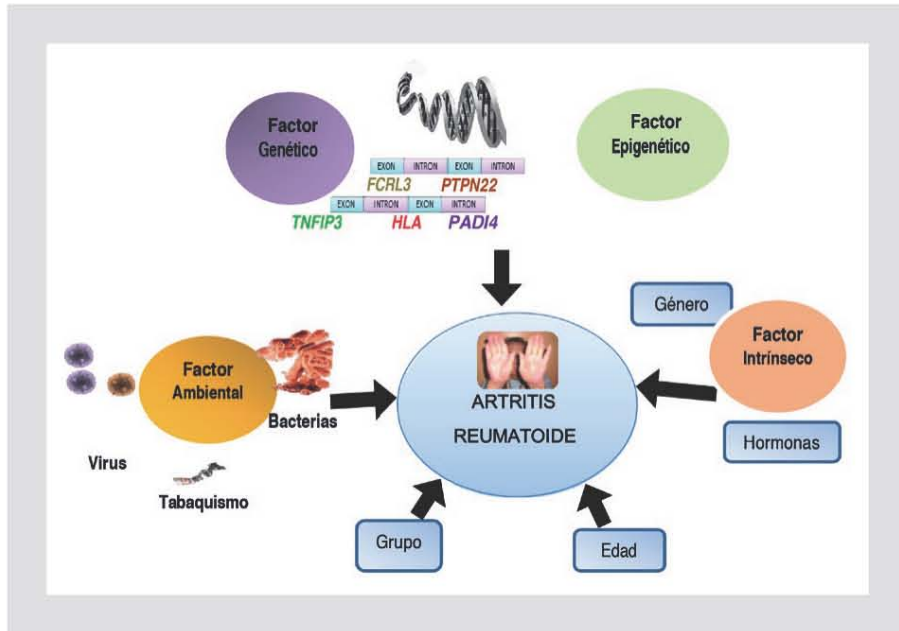


Figura 1. La AR, una enfermedad multifactorial.

Introducción

La AR representa el prototipo de las enfermedades crónicas inflamatorias; se caracteriza por presentar inflamación en la membrana sinovial, destrucción del cartílago, erosión del hueso, deformidad articular e incapacidad funcional del individuo afectado^{1,2}. Está bien documentado que la AR no tratada a tiempo causa pérdida del trabajo, disminuye la calidad de vida y se asocia con una muerte prematura debido a la enfermedad cardiovascular^{2,3}. Diferentes células del sistema inmunológico innato y adaptativo presentan alteraciones en la expresión de diversos genes que codifican para proteínas, como citocinas, quimiocinas, receptores, moléculas de adhesión y genes que sintetizan ARN no codificantes, específicamente micro-ARN (miARN), los cuales tienen una expresión diferencial en esta enfermedad^{4,5}. Aunque la etiología de la AR no se conoce completamente, se ha documentado que la interacción entre diferentes factores genéticos de baja penetrancia y diversos factores ambientales,

como hormonas sexuales y agentes que disparan la respuesta inmunológica, como virus y bacterias, influye en su patogénesis⁶. Diversas evidencias han mostrado que las alteraciones genéticas, principalmente del tipo polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) localizados en genes que producen proteínas y ARN no codificantes (específicamente miARN), y que regulan la respuesta inmunológica innata y adaptativa, son el principal factor de riesgo genético involucrado en la AR⁷. Los estudios de asociación de gen candidato o los del genoma completo (GWAS) han identificado diversos *loci* de riesgo asociados con la etiología de la AR^{7,8}. Actualmente, en AR, se han descrito unos 100 genes asociados con susceptibilidad, protección, gravedad, actividad y respuesta a tratamiento⁹; entre ellos, se encuentran genes que codifican para el HLA de clase II y varios genes no HLA, como *STAT4*, *CTLA4*, *TRAF1*, *PADI4*, *FCRL3*, *TNFIP3* y *TNF-α*, y mi-ARN, principalmente *miR-146a* y *miR-499*⁷⁻¹⁰. Estos genes influyen importantemente en la patogénesis de la AR; en esta revisión se darán detalles de esas asociaciones genéticas con esta enfermedad autoinmune (EA).

Epidemiología

La AR afecta aproximadamente al 1% de la población general¹. Se han reportado diferencias en la prevalencia en los países industrializados: llega a afectar al 0.5-2%, con una incidencia de 12-200 casos por cada 100,000 habitantes. La relación mujer: hombre es de 2-3:1 y la edad pico de aparición, entre los 30 y los 55 años, aunque puede presentarse a cualquier edad¹¹. En México, esta entidad afecta al 1.6% de la población¹².

Etiología

La etiología de la AR no se conoce completamente, pero se sabe que, como en todas las enfermedades multifactoriales, su desarrollo está fuertemente influenciado por factores genéticos (de baja penetrancia), ambientales e intrínsecos, como la edad, el género y el grupo étnico (Fig. 1)¹³. Diferentes factores ambientales han sido involucrados en su patogénesis: virus (Epstein-Barr, parvovirus B19), bacterias (*Streptococcus*, *Mycoplasma*, *Proteus* y *E. coli*), cigarro, sílice y hormonas, entre otros^{13,14}. Está bien documentado que tanto el cigarro como el sílice contribuyen fuertemente al desarrollo de esta EA¹⁴.

Por otro lado, entre los principales factores genéticos de riesgo para AR se encuentran diversos alelos de *HLA II*, *PTPN22*, *STAT4*, *CTLA4*, *TRAF1*, *PADI4*, *FCRL3*, *TNFAIP3*, *TNF-α* y miARN, entre otros^{5,7,10}.

Fisiopatología

La AR involucra varias cascadas de inflamación que conducen a un daño persistente del tejido sinovial, a la destrucción del cartilago articular y a la erosión del hueso¹⁵. Diversas células, como los linfocitos B y T y los macrófagos, desempeñan un papel regulador del sistema inmunológico innato y adaptativo; también varias citocinas, quimiocinas, receptores de citocinas y quimiocinas, moléculas de adhesión y adaptadoras, entre otros, han sido involucrados en la fisiopatología de la AR¹⁶⁻²⁰. Una de las principales citocinas proinflamatorias involucradas en la patogénesis de la AR es el factor de necrosis tumoral α (*TNF-α*)²¹. En un modelo murino se demostró que la sobreexpresión de *TNF-α* es suficiente para inducir AR²². Otro estudio mostró que el *TNF-α* puede inducir la expresión de otras citocinas proinflamatorias, tales como interleucina 1 (*IL-1*) e interleucina 6 (*IL-6*), las cuales tienen un papel fundamental en la gravedad y actividad de la AR. Por otro

lado, se ha demostrado que tanto el *TNF-α* como la *IL-1B* y la *IL-6* pueden inducir el desarrollo de AR^{23,24}. El *TNF-α* además puede inducir la expresión de genes que codifican para moléculas de adhesión intracelular y vascular (*ICAM* y *VCAM*, respectivamente), importantes en la comunicación entre células, y metaloproteasas de matriz, fundamentales en la destrucción del cartilago y la erosión del hueso, además de inducir la síntesis de autoanticuerpos, los cuales son un factor de gravedad y mal pronóstico en la AR²¹⁻²⁵. Dada la importancia del *TNF-α* en la AR, se ha desarrollado un set de anticuerpos dirigidos contra esta *TNF-α* (terapia biológica)^{20,21,25}. Por otro lado, la interleucina proinflamatoria 17, producida primariamente por las células Th17, ha sido involucrada en todos los estados de desarrollo de la enfermedad; se ha demostrado que es un factor de riesgo importante que contribuye a la cronicidad de la AR, ya que induce la producción de diversas citocinas inflamatorias en el sinovio de los pacientes con AR, tiene una función sinérgica con otras citocinas, las cuales dañan el tejido sinovial, promueve la sobrevivencia de los sinoviocitos y células inflamatorias, y está involucrada en su maduración; de esta manera, esta citocina conlleva un incremento del número de sinoviocitos y células inflamatorias, hiperplasia y la inflamación exacerbada observada en las articulaciones de los pacientes con AR²⁶.

Genética en la AR

Estudios realizados en familias y gemelos han mostrado la importancia que juegan los genes en la AR. La prevalencia de esta enfermedad en familiares de primer grado (donde hay un afectado con AR) es considerablemente mayor que en la población general, aun cuando la AR no se transmite en las familias con alta frecuencia^{27,28}. Aunque la concordancia es relativamente baja en comparación con otras EA (30%), no deja de tener una concordancia de aproximadamente el 12-15%^{27,28}. Los estudios de riesgo relativo para hermanos de individuos afectados (λ) comparado con la población general (individuos no relacionados) es de 2-10 veces mayor²⁷. Se ha estimado que la heredabilidad en la AR es del 60-70%^{26,28,29}.

Se han asociado diversos genes que codifican proteínas, así como ARN no codificantes (específicamente miARN) y que participan en la respuesta inmunológica innata y adaptativa, en la patogénesis de la AR. Entre estos genes se encuentran diversos alelos del *HLA* de clase I, II y III, citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y adaptadoras, metaloproteasas,

Tabla 1. Genes que han mostrado asociación con susceptibilidad y protección en AR

Gen	Localización	SNP	OR	Valor de p	Referencias
<i>HLA-DRB1</i>	6p21.3	rs6910071	2.88	1.0×10^{-299}	Stahl EA, et al. ³⁴
<i>PTPN22</i>	1p13.3-13.1	R620W	1.91	9.1×10^{-74}	Stahl EA, et al. ³⁴
<i>PADI4</i>	1p36	rs2240340	1.14	7.5×10^{-5}	Hou S, et al. ⁴⁷ ; Too CL, et al. ⁴⁸ ; Iwamoto T, et al. ⁴⁹
		rs10818488	1.28	1.40×10^{-8}	Kurreeman FA, et al. ⁵¹
<i>TRAF1-C5</i>	9q33-34	rs3761847	1.13	0.001	Plenge RM, et al. ⁵²
					Zhang X, et al. ⁵⁴
		rs3087243	0.44	1×10^{-8}	Stahl EA, et al. ³⁴
<i>CTLA4</i>	2q33	rs231775	1.16	0.002	Li X, et al. ⁵⁷ ; Lee YH, et al. ⁵⁸
<i>STAT4</i>	2q32.2	rs7574865	1.32	2.81×10^{-7}	Remmers EF, et al. ⁵¹
		rs13426947	1.15	7.2×10^{-10}	Eyre S, et al. ⁶² ; Gu E, et al. ⁶³ ; Zheng J, et al. ⁶⁴ ; Liang YL, et al. ⁶⁵
		rs2004640	1.14	0.003	Lien C, et al. ⁶⁶
<i>IRF5</i>	7q32	rs10488631	1.19	1.2×10^{-6}	Stahl EA, et al. ³⁴
		rs2004640	1.14	0.003	Jia X, et al. ⁷⁰
<i>FCRL3</i>	1q21-23	rs7528684	1.10	0.002	Song GG, et al. ⁷⁵
<i>TNFAIP3</i>	6q32	rs6920220	1.22	1×10^{-9}	Lee YH, et al. ⁸⁰
		rs10499194	1.25	6.7×10^{-4}	
<i>TNF-α</i>	6p21	-308G/A	1.62	3.6×10^{-5}	Song GG, et al. ⁸⁶
<i>miR-499</i>	20q11.22	rs3746444	1.62	0.001	Li K, et al. ¹⁰⁰
<i>CD28</i>	2q33	rs1980422	1.11	1.3×10^{-9}	Raychaudhuri S, et al. ¹⁰³
<i>CD40</i>	20q12-q13.2	rs4810485	0.87	8.2×10^{-9}	Raychaudhuri S, et al. ¹⁰⁴
<i>FCGR3A</i>	1q23	158V/F	1.25	0.01	Eyre S, et al. ³³
<i>TYK2</i>	19p13.2	rs34536443	0.62	2.3×10^{-14}	Eyre S, et al. ³³
<i>IRAK1</i>	Xq28	rs13397	1.27	1.2×10^{-12}	Eyre S, et al. ³³

receptores de citocinas, quimiocinas, receptores de tipo Fc, integrinas, transductores de señales (quinasas, entre otros), *miR-146a* y *miR-499*, entre otros, de los cuales se darán mayores detalles más adelante (Tabla 1)^{5,7-10,21,28,29}.

Genes asociados a AR

HLA de clase II

El principal factor de riesgo genético asociado a AR se localiza en la citobanda 6p21. Esta región comprende 3.6 Mb y se divide en diversos genes del HLA de clase I, II y III (los genes del HLA de clase III no codifican moléculas presentadoras de antígenos)^{29,30}. Se

ha documentado que el HLA-II contribuye hasta en una tercera parte de componente genético asociado con la susceptibilidad a AR. Los estudios recientes indican que este porcentaje está sobreestimado. Los datos indican que el *HLA-DRB1* contribuye sólo en un 11%²⁸⁻³⁰. Los genes de HLA-I y II son altamente polimórficos, codifican para proteínas de superficie celular heterodiméricas y tienen como función primaria unirse a péptidos propios o extraños cortos y presentarlos a los linfocitos T CD8+ y CD4+, respectivamente³¹. En ambos casos, la unión de los péptidos y su presentación en la superficie celular por medio del HLA son un requerimiento indispensable para la formación del complejo trimolecular péptido-HLA-receptor de células

T (TCR), el cual lleva a la activación de las células T³¹. En 1978, Stastny P. identificó, a través de un estudio de gen candidato, que el 78% de los pacientes con AR fueron positivos al HLA-DRw4 en comparación con el 28% de los controles sanos; posteriormente, se identificaron múltiples alelos dentro del *HLA-DRB1* compartidos en pacientes con AR; a nivel de secuencia de aminoácidos, tuvo como resultado un epítipo compartido³². Esta secuencia de aminoácidos localizada en las posiciones 70-74 de los aminoácidos QKRAA, QRRAA o RRRAA de la tercera región hipervariable de la cadena DR-β1 se asocia con alto riesgo a AR³². La *odds ratio* (OR) para el este epítipo es de 4.37³². Por otro lado, varios GWAS y metaanálisis han identificado y confirmado, respectivamente, la asociación de varios SNP del *HLA-DRB1* con AR; uno de ellos, el rs6910071A/G confiere un riesgo de 2.88, y una asociación genética de 1×10^{-299} , mientras que el rs17878703, localizado en la posición 11 de la secuencia peptídica del *HLA-DRB1*, muestra una asociación de $p < 10^{-677}$ ^{33,34}.

PTPN22

El gen *PTPN22*, localizado en la citobanda 1p13.3-13.1, representa el segundo *loci* de susceptibilidad de mayor importancia que se asocia con la AR (sólo después del *HLA-II*)³⁵. El *PTPN22* (conocida también como proteína LYP), o proteína tirosina fosfatasa no receptor 22, pertenece a la familia de proteínas tirosinas fosfatasa (PTP), implicadas en la regulación negativa de la señalización mediada por el TCR^{35,36}. Las tirosinas cinasas y las PTP regulan la transducción de señales de un amplio grupo de procesos fisiológicos, incluida la respuesta inmunológica³⁷. Las alteraciones en las PTP provocan anomalías inmunológicas y diversas enfermedades humanas³⁵⁻³⁷.

Un estudio de gen candidato y un GWAS realizados en 2004 identificaron un SNP no sinónimo C1858T en el codón R620W (cambia el aminoácido arginina por triptófano) y se localiza en el exón 14) de *PTPN22* que se asociaba con diabetes *mellitus* tipo 1, AR y lupus eritematoso sistémico (LES)³⁸. Estudios posteriores mostraron una asociación entre este SNP y otras EA³⁷. La sustitución de este aminoácido se localiza en el dominio de poliprolina; se localiza en el dominio de poliprolina (involucrado en la unión de Pep-Csk) de LYP, como consecuencia, la variante 620W muestra una reducida interacción con Csk³⁷. Un estudio reciente muestra que el alelo T del SNP 1858 genera una pérdida de función y lleva a una expansión de células T de memoria, efectoras, y a una predisposición a desarrollar autoinmunidad³⁹.

Múltiples estudios en diferentes grupos étnicos han reportado la asociación de esta variante con la AR; los valores de OR van desde 1.3 hasta 2.13. El alelo T se presenta con mayor frecuencia en pacientes con factor reumatoide (RF) positivo que en pacientes con RF negativo. En población europea este alelo presenta valores de OR de 1.423 y un valor de $p = 1.0 \times 10^{-8}$, y los no europeos tienen una OR de 1.902 y un valor de $p = 2.8 \times 10^{-8}$ ^{37,40,41}. Un metaanálisis confirmó rotundamente la asociación del alelo T con susceptibilidad a AR (OR: 1.94; $p = 91 \times 10^{-74}$)³⁴. En la población mexicana, el alelo T se asoció con susceptibilidad a AR: OR: 2.83 y $p = 0.001$; asimismo, se observó que los pacientes cero positivos para anticuerpos antipeptidos cíclicos citrulinados (anti-CCP) tenían un mayor riesgo para AR: OR: 2.5 y $p = 0.008$ ⁴².

PADI4

El gen *PADI4*, localizado en la región 1p36 (región previamente ligada a AR), codifica para la enzima peptidil arginina deaminasa 4, que cataliza la conversión proteica de residuos de arginina a citrulina, generando proteínas citrulinadas⁴³. Este fenómeno puede causar la pérdida de tolerancia inmunológica y originar la síntesis de anti-CCP. La identificación de anti-CCP ha servido para proporcionar un diagnóstico y pronóstico certero en la AR^{44,45}. Esta enzima se ha observado sobreexpresada en el líquido sinovial y el tejido sinovial de pacientes con AR⁴⁴. Un estudio de gen candidato identificó varios SNP (*PADI4_89*, *PADI4_90*, *PADI4_92* y *PADI4_104*) de *PADI4* involucrados con riesgo de AR. Además, se identificó un haplotipo de *PADI4* (se asoció con susceptibilidad) que afectaba a la estabilidad del transcrito y se asoció con altos niveles de anticuerpos contra péptidos citrulinados en el suero de individuos con AR⁴⁶. El SNP de *PADI4* que mostró una fuerte asociación con AR en japoneses fue el rs2240340A/G ($p = 0.000008$). Otros GWAS o metaanálisis han identificado y confirmado la asociación de este gen con AR en asiáticos, pero no en europeos (OR: 1.14; $p = 0.000075$)^{28,33,47-49}. Un estudio en México no mostró asociación entre este gen y AR⁵⁰. De esta manera, este gen confiere riesgo a AR, de una manera dependiente del grupo étnico, y sólo las poblaciones asiáticas muestran una asociación entre este gen y la AR.

TRAF1-C5

Un estudio de gen candidato realizado en 2007 identificó la región genómica donde se encuentra

TRAF1 (factor asociado 1 al receptor del factor de necrosis tumoral)-*C5* (componente del complemento 5) asociado con AR⁵¹. *TRAF1* codifica una proteína intracelular que media la transducción de señal del TNF- α y que está involucrada en la proliferación y activación de células T^{51,52}. C5 es un miembro clave de la vía del complemento; algunos estudios han mostrado que la inflamación sostenida se correlaciona con niveles aumentados de C5 en el fluido sinovial de los pacientes con AR⁵¹⁻⁵³.

El primer SNP de la región donde se localiza *TRAF1-C5* en asociación con AR fue el rs10818488G/A. El estudio mostró que el alelo A confería susceptibilidad y se asociaba con la gravedad de la enfermedad (OR: 1.28; $p = 1.40 \times 10^{-8}$). El alelo A crea un sitio de unión para EP300, una proteína que regula la transcripción a través de la remodelación de la cromatina⁵¹. Posteriormente, un GWAS identificó otros SNP localizados en esta región que se asociaban con la AR. El SNP principalmente asociado con la AR fue el rs3761847A/G ($p = 1 \times 10^{-14}$)⁵². La asociación de varios polimorfismos de esta región con la AR ha sido inmensamente replicada en las poblaciones europeas, asiáticas, norteamericanas y africanas. Un metaanálisis reciente, que incluye datos de asiáticos, caucásicos, africanos y suramericanos, ha arrojado una OR de 1.13 y un valor de $p < 0.001$ ⁵⁴.

CTLA4

Otro gen que ha mostrado asociación con AR es *CTLA4*; este *locus* se localiza en la región 2q33 y codifica para el antígeno 4 del linfocito T citotóxico. La función de la proteína CTLA4 es regular negativamente la activación de células T mediante dos mecanismos: la señalización negativa y el antagonismo competitivo de la vía de la coestimulación mediada por CD28/B7; incluso se ha desarrollado una terapia anti-CTLA4 cuyo objetivo es unirse a la B7 (molécula coestimuladora) y evitar la señal de activación de las células T⁵⁵.

Mediante estudios de gen candidato y posteriormente GWAS, se identificaron diferentes SNP asociados con la AR, principalmente en caucásicos^{52,56}. Un metaanálisis de GWAS identificó rotundamente la asociación del SNP rs3087243 (CT60) de *CTLA4* con la AR (OR: 0.44; $p = 1 \times 10^{-8}$)³⁴. Otro SNP de *CTLA4* que ha sido analizado constantemente en diferentes poblaciones es el 49A/G (rs231775). Los datos indican que el SNP 49A/G se asocia con riesgo de AR en asiáticos (OR: 1.16; $p = 0.002$), pero no en europeos^{57,58}. Dos

estudios realizados en pacientes con AR del Occidente de México identificaron que el alelo A del SNP +49A/G confiere riesgo de desarrollar AR (OR: 1.45; $p = 0.01$), mientras que el SNP CT60 se ha asociado con protección (OR: 0.61; $p = 0.024$)^{59,60}.

STAT4

STAT4, localizado en la citobanda genética 2q32.2, codifica para el factor de transcripción denominado transductor de señales y activador de la transcripción 4, el cual transmite señales inducidas por varias citocinas, incluidas la interleucina 12, la interleucina 23 y el interferón 1. *STAT4* está implicado en la diferenciación y proliferación de células Th1 y Th7, cruciales en el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes⁶¹. Un estudio de gen candidato identificó cuatro SNP (todos con un alto desequilibrio de ligamiento) localizados en el intrón 3 de *STAT4* que se asociaban con AR y LES⁶¹. El SNP que mostró mayor evidencia de asociación con AR fue el rs7574865G/T (OR: 1.32; $p = 2.81 \times 10^{-7}$)⁶¹. Éste y otros SNP (por ejemplo, el SNP rs13426994A/G confiere un OR de 1.15, $p = 7.2 \times 10^{-10}$) de *STAT4* se han asociado con AR, LES, esclerosis sistémica y síndrome de Sjögren; y, mediante GWAS y metaanálisis, se ha confirmado su asociación con la AR en diversas poblaciones⁶²⁻⁶⁵. Un metaanálisis realizado en 2013 identificó que el SNP rs7574865G/T se asociaba con AR en latinoamericanos (OR: 1.36; $p = 0.008$)⁶⁶.

IRF5

Este gen, localizado en la citobanda genómica 7q32, codifica para el factor regulador del interferón 5 (IRF-5), el cual pertenece a la familia de factores de regulación de interferón. Entre sus funciones se encuentran regular el ciclo celular, la apoptosis y la respuesta inmunológica e inflamatoria mediante la inducción de diferentes citocinas proinflamatorias, que son fundamentales en la fisiopatología de la AR⁶⁷⁻⁶⁹.

IRF5 contiene varios polimorfismos; algunos de ellos son el rs2004640T/G, el rs729302A/C y el rs752637A/G (todos son funcionales). Varios de ellos han sido identificados y asociados, mediante estudios de gen candidato o GWAS, con AR y otras EA, principalmente LES y EM^{28,70,71}.

El genotipo G/G del SNP rs2004640T/G se correlaciona con una isoforma de IRF-5 que incluye los exones 1A y 1C, mientras que los que llevan el alelo T se correlacionan con un transcrito que lleva los exones

1A, 1B y 1C; los transcritos constitutivos son los que llevan los exones 1A y 1B, y se expresan en las células dendríticas plasmacitoides y las células B, mientras que los transcritos que llevan el exón 1C son inducibles por el interferón de tipo 1. Se ha propuesto que las anomalías en los transcritos de *IRF5* debido a estas variantes pueden conferir riesgo de desarrollar AR⁷⁰. Este SNP se ha analizado mediante un metaanálisis cuyos resultados muestran a esta variante con riesgo de AR (OR: 1.14; $p = 0.003$)⁷⁰. Un segundo metaanálisis en AR, donde se evaluaron los SNP rs-2004640T/G, rs729302A/C y rs752637A/G de *IRF5*, mostró una asociación con susceptibilidad de cada uno de ellos en diferentes grupos étnicos, especialmente en europeos y asiáticos⁶⁹. Otro SNP de *IRF5* identificado a través de un metaanálisis de GWAS reportó una asociación entre el rs10488631T/C y la AR (OR: 1.19; $p = 1.2 \times 10^{-6}$)³⁴.

FCRL3

FCRL3 está localizado en la citobanda genómica 1q21-23 y codifica para la proteína 3 parecida al receptor γ de la fracción cristalizable de inmunoglobulinas; su función es regular la activación de las células B a través de dos motivos: la activación o la inhibición basada en tirosinas⁷². Kochi, et al., en 2005, realizaron un mapeo fino de la región 1q21-23, por medio de marcadores genéticos de tipo SNP, en pacientes japoneses con AR, LES y tiroiditis autoinmune. Los resultados mostraron que el SNP -169T/C (rs7528684) se asociaba con susceptibilidad a desarrollar estas tres EA; en AR mostró una OR de 2.15 y un valor de $p = 0.00000085$ ⁷³. A pesar del resultado robusto de la asociación genética en esta población, otras poblaciones no replicaron la asociación entre este SNP funcional que altera la afinidad de unión al factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) y se asocia con mayores niveles de expresión de *FCRL3* y AR, excepto las poblaciones asiáticas. Dos metaanálisis recientemente publicados muestran que el SNP -169T/C se asocia de manera específica en las poblaciones asiáticas (OR: 1.101; $p = 0.002$)^{74,75}. Un estudio publicado en 2013, en nuestra población, mostró que el alelo C del SNP -169T/C se asociaba con la protección a desarrollar artritis reumatoide juvenil (ARJ), y tal asociación fue dependiente del género (en varones, OR: 0.57; $p = 0.003$)⁷⁶. Es necesario evaluar el papel del alelo C del SNP -169T/C de *FCRL3* en nuestra población, para determinar si está asociado con AR, ya sea con susceptibilidad o protección.

TNFAIP3

El gen *TNFAIP3*, que se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6, en la banda citogenética q23, codifica para la proteína 3 inducida por el TNF- α (*TNFAIP3*, también conocida como A20); y su función es regular negativamente la señalización de NF- κ B en respuesta a múltiples estímulos, e inhibe la inflamación y apoptosis inducida por TNF- α ⁷⁷. Un estudio mostró la expresión de *TNFAIP3* en la membrana sinovial de humanos y en varios tipos celulares que desempeñan papeles importantes en la fisiopatología de la AR, como los sinoviocitos, los linfocitos y los fibroblastos⁷⁸.

Diversos estudios genéticos han identificado que el gen *TNFAIP3* se asocia con AR y otras EA⁷⁹⁻⁸². Un metaanálisis realizado en pacientes con AR muestra que el SNP rs6920220A/G se asocia con susceptibilidad (OR: 1.22; $p = 1 \times 10^{-9}$). Los datos en población europea muestran a este mismo SNP asociado con susceptibilidad (OR: 1.23; $p = 1 \times 10^{-9}$). Este mismo metaanálisis muestra que el SNP rs10499194C/T se asocia con AR, específicamente en población asiática (OR: 1.25; $p = 6.7 \times 10^{-4}$)⁸⁰.

TNF- α

El TNF- α es probablemente la citocina multifuncional más importante en la AR²¹. Esta proteína es producida por el gen *TNF- α* , el cual se localiza en la banda citogenética 6p21, región ligada a diversas EA²¹. Esta citocina regula diversos efectos biológicos, entre los que se incluyen los siguientes: expresión de diversos genes, como IL-1, IL-6, metaloproteasas y moléculas de adhesión, proliferación, regulación de la apoptosis, activación celular e inducción de anticuerpos, que se asocian con la inflamación, la destrucción del cartilago y la erosión del hueso de los individuos con AR²¹. Los pacientes con AR presentan niveles elevados de esta citocina en las células mononucleares, el líquido sinovial, la membrana sinovial, el plasma y el suero, entre otros fluidos, cuando se comparan con individuos sanos²¹.

Los estudios de gen candidato han identificado que hay variantes genéticas localizadas en la región promotora de este gen que se asocian con la susceptibilidad, la gravedad y la respuesta al tratamiento en pacientes con AR, como el SNP funcional -308G/A^{21,83}. En nuestra población este SNP no se ha asociado con la susceptibilidad a AR, pero sí con la gravedad⁸⁴. Por otro lado, esta variante se asocia con la susceptibilidad a ARJ; la estratificación por género mostró en mujeres una OR mayor a 4 y un valor de $p = 0.0002$ ⁸⁵. Un metaanálisis publicado este año mostró que el

alelo A del rSNP -308G/A de *TNF- α* no se asocia con la susceptibilidad en europeos y asiáticos, pero sí en latinoamericanos (OR: 1.62; $p = 3.6 \times 10^{-5}$)⁹⁶.

miARN

Actualmente, los microARN (miARN) han sido blanco de estudio en diversas enfermedades, como diferentes tipos de cánceres, enfermedades cardiovasculares y EA, incluida la AR⁸⁷⁻⁹². Los miARN se producen del ADN, como ARN no codificantes largos, y se denominan primarios (pri-miARN); posteriormente, diversas ARNsas en el núcleo producen miARN precursores de aproximadamente 70 nucleótidos, y, finalmente, otras ARNsas localizadas en el citoplasma producen las formas maduras de los miARN, de 18-22 nucleótidos de longitud, entre cuyas funciones principales se encuentra regular la represión de la traducción y la degradación de diversos miARN; de esta manera, los miARN regulan importantemente procesos inflamatorios, apoptóticos, de activación del sistema inmunológico y otros eventos biológicos⁹⁷⁻⁹⁹. Se han reportado alteraciones de tipo SNP en estos genes; dichas variantes pueden afectar a su estructura y al procesamiento de pri-miARN a miARN, alterando, en última instancia, la unión con sus miARN blanco y su función biológica⁹⁴⁻⁹⁶. Algunos SNP localizados en *miR-146a* y *miR-499* se han asociado con AR en diferentes poblaciones⁹⁷⁻⁹⁹. Dos metaanálisis evaluaron la importancia de dos SNP en los miR-146a (rs2910164G/C) y miR-499 (rs3746444G/A) en AR. El primer metaanálisis reportó que el SNP rs2910164G/C no mostró asociación con AR, mientras que el SNP rs3746444G/A del *miR-499* se asoció con susceptibilidad (G vs. A; OR: 1.62; $p = 0.01$). El segundo metaanálisis mostró una asociación entre el SNP rs3746444G/A de *miR-499* y la AR, sobre todo en poblaciones asiáticas^{100,101}. Un estudio realizado en población mexicana con ARJ reportó que el SNP rs2910164G/C del *miR-146a* no se asoció con esta enfermedad, pero sí con asma pediátrico. Es necesario evaluar esta variante genética en pacientes con AR de nuestra población para determinar si es un factor de susceptibilidad importante en la patogénesis de esta EA¹⁰².

Otros genes que han mostrado asociación genética con AR

Otros GWAS han identificado la asociación de diferentes *loci* que regulan el sistema inmunológico innato y adaptativo con AR, pero aún no hay muchos estudios

que evalúen la asociación y la repliquen en otras poblaciones. Entre estos genes se incluyen los siguientes: *CD28* (rs1980422C/T; OR: 1.11; $p = 1.3 \times 10^{-9}$)¹⁰³, *CD40* (rs4810485G/T; OR: 0.87; $p = 8.2 \times 10^{-9}$)¹⁰⁴, *FCGR3A* (el SNP funcional del codón 158V/F, valina por fenilalanina; OR: 1.25; $p = 0.01$)¹⁰⁵, *TYK2* (rs34536443C/G; OR: 0.62; $p = 2.3 \times 10^{-14}$) e *IRAK1* (rs13397A/G; OR: 1.27; $p = 1.2 \times 10^{-12}$), entre otros³³.

Conclusiones

El desarrollo de la AR está fuertemente influenciado por múltiples factores ambientales y genéticos de riesgo. Los avances en genética y genómica de la última década han sido impresionantes; los estudios de gen candidato o GWAS han ayudado a identificar diversos *loci* de susceptibilidad implicados en la patogénesis de esta EA. Diversas variantes genéticas, principalmente de tipo SNP, localizadas en diferentes genes que producen proteínas o ARN no codificantes y que regulan el sistema inmunológico innato y adaptativo, se han asociado con la susceptibilidad de la AR. Entre los genes identificados que causan susceptibilidad a AR se encuentran el *HLA* de clase II, *PTPN22*, *STAT4*, *PADI4*, *FCRL3*, *TNFAIP3*, *CTLA4*, *TRAF1-C5*, *TNF- α* y miARN, entre otros. Por otro lado, los estudios genéticos/genómicos nos han ayudado a comprender mejor la distribución de ciertos alelos, genotipos y haplotipos, y cómo éstos se asocian con la susceptibilidad y/o protección a AR en diversas poblaciones. Finalmente, los estudios funcionales en genes que producen proteínas y ARN no codificantes y que regulan la respuesta inmunológica innata y adaptativa nos han ayudado a comprender mejor el efecto de dichos alelos de diversos SNP en la expresión génica, la traducción, el *splicing* alternativo y la estabilidad y degradación de los miARN o la unión de éstos con sus blancos. Es importante evaluar la distribución alélica y genotípica de los diferentes SNP en los genes que aún no han sido analizados en nuestra población, para determinar su papel en la susceptibilidad de la AR.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Hospital Juárez de México las facilidades proporcionadas para realizar este trabajo.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses respecto a esta revisión.

Bibliografía

1. Holmdahl R, Malmström V, Burkhardt H. Autoimmune priming, tissue attack and chronic inflammation – the three stages of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 2014;44(6):1593-9.
2. De Hair MJ, Landewé RB, van de Sande MG, et al. Smoking and overweight determine the likelihood of developing rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(10):1654-8.
3. Bispoendial RJ, Stroes ES, Tak PP. Critical determinants of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des*. 2011;17(1):21-6.
4. Gorman CL, Cope AP. Immune-mediated pathways in chronic inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008;22(2):221-38.
5. Ceribelli A, Nahid MA, Satoh M, Chan EK. MicroRNAs in rheumatoid arthritis. *FEBS Lett*. 2011;585(23):3667-74.
6. Cope A. Rheumatoid arthritis. En: Rich R, et al., eds. *Clinical Immunology*. Nueva York: Elsevier; 2007. p. 52.1-52.21.
7. Barton A, Worthington J. Genetic susceptibility to rheumatoid arthritis: an emerging picture. *Arthritis Rheum*. 2009;61(10):1441-6.
8. Gregersen PK. Susceptibility genes for rheumatoid arthritis—a rapid expanding harvest. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2010;68(3):179-82.
9. Okada Y, Wu D, Trynka G, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature*. 2014;506(7488):376-81.
10. Hashemi M, Eskandari-Nasab E, Zakeri Z, et al. Association of pr-miRNA-146a rs2910164 and pre-miRNA-499 rs3746444 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Mol Med Rep*. 2013;7(1):287-91.
11. Gabriel SE. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2001;27(2):269-81.
12. Peláez-Ballesteros I, Sanin LH, Moreno-Montoya J, et al. Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *J Rheumatol Suppl*. 2011;86:3-8.
13. Karlson EW, Deane K. Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2012;38(2):405-26.
14. Colebatch AN, Edwards CJ. The influence of early life factors on the risk of developing rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2011;163(1):11-6.
15. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010;376(9746):1094-108.
16. Marston B, Palanichamy A, Anolik JH. B cells in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2010;22(3):307-15.
17. Wang Q, Ma Y, Liu D, Zhang L, Wei W. The roles of B cells and their interactions with fibroblast-like synoviocytes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;155(3):205-11.
18. Lowin T, Straub RH. Integrins and their ligands in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(5):244.
19. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51 Suppl 5:v3-11.
20. Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients. *FEBS J*. 2008;275(18):4448-55.
21. Fragoso JM, Vargas Alarcón G, Jiménez Morales S, Reyes Hernández OD, Ramírez Bello J. [Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune diseases (AIDs): molecular biology and genetics]. *Gac Med Mex*. 2014;150(4):334-44.
22. Keffler J, Probert L, Czaizaris H, et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J*. 1991;10(13):4025-31.
23. Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet*. 1989;2(8567):244-7.
24. Ferraccioli G, Bracci-Laudiero L, Alivernini S, Gremese E, Tolusso B, De Benedetti F. Interleukin-1 β and interleukin-6 in arthritis animal models: role in the early phase of transition from acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis. *Mol Med*. 2010;16(11-12):552-7.
25. Müller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2005;1(2):102-10.
26. Benedetti G, Miossec P. Interleukin 17 contributes to the chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 2014;44(2):339-47.
27. Jarvinen P, Aho K. Twin studies in rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum*. 1994;24(1):19-28.
28. Kurkó J, Besenyi T, Laki J, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z. Genetics of rheumatoid arthritis – a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;45(2):170-9.
29. Balsa A, Cabezon A, Orozco G, et al. Influence of HLA DRB1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid factor. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(2):R62.
30. Bowes J, Barton A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(4):399-402.
31. Taylor M, Hussain A, Urayama K, et al. The human major histocompatibility complex and childhood leukemia: an etiological hypothesis based on molecular mimicry. *Blood Cells Mol Dis*. 2009;42(2):129-35.
32. Bax M, van Heemst J, Huizinga TW, Toes RE. Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Immunogenetics*. 2011;63(8):459-66.
33. Eyre S, Bowes J, Diogo D, et al. High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2012;44(12):1336-40.
34. Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet*. 2010;42(6):508-14.
35. Fouteri G, Lioussis SN, Battaglia M. Roles of the protein tyrosine phosphatase PTPN22 in immunity and autoimmunity. *Clin Immunol*. 2013;149(3):556-65.
36. Alonso A, Sasin J, Bottini N, et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. 2004;117(6):699-711.
37. Burn GL, Svensson L, Sánchez-Blanco C, Saini M, Cope AP. Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? *FEBS Lett*. 2011;585(23):3689-98.
38. Stanford SM, Mustelin TM, Bottini N. Lymphoid tyrosine phosphatase and autoimmunity: human genetics rediscovered tyrosine phosphatases. *Semin Immunopathol*. 2010;32(2):127-36.
39. Salmond RJ, Brownlie RJ, Morrison VL, Zamovska R. The tyrosine phosphatase PTPN22 discriminates weak self peptides from strong agonist TCR signals. *Nat Immunol*. 2014;15(9):875-83.
40. Song GG, Bae SC, Kim JH, Lee YH. The PTPN22 C1858T polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2013;33(8):1991-9.
41. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. The association between the PTPN22 C1858T polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis update. *Mol Biol Rep*. 2012;39(4):3453-60.
42. Torres-Carrillo NM, Ruiz-Noa Y, Martínez-Bonilla GE, et al. The +1858C/T PTPN22 gene polymorphism confers genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in Mexican population from the Western Mexico. *Immunol Lett*. 2012;147(1-2):41-6.
43. Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij, Pruijn GJ. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays*. 2003;25(11):1106-18.
44. Quirke AM, Fisher BA, Kinloch AJ, Venables PJ. Citrullination of autoantigens: upstream of TNF α in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *FEBS Lett*. 2011;585(23):3681-8.
45. Harney SM, Meisel C, Sims AM, Woon PY, Wordsworth BP, Brown MA. Genetic and genomic studies of PADI4 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44(7):869-72.
46. Suzuki A, Yamada R, Chang X, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2003;34(4):395-402.
47. Hou S, Gao GP, Zhang XJ, et al. PADI4 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mod Rheumatol*. 2013;23(1):50-60.
48. Too CL, Murad S, Dhaliwal JS, et al. Polymorphisms in peptidylarginine deiminase associate with rheumatoid arthritis in diverse Asian populations: evidence from MyEIRA study and meta-analysis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(6):R250.
49. Iwamoto T, Ikari K, Nakamura M, et al. Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45(7):804-7.
50. Zavala-Cerna MG, Gonzalez-Montoya NG, Nava A, et al. PADI4 haplotypes in association with RA Mexican patients, a new prospect for antigen modulation. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:383681.
51. Kurreeman FA, Padyukov L, Marquies RB, et al. A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Med*. 2007;4(9):e278.
52. Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, et al. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis—a genome wide study. *N Engl J Med*. 2007;357(12):1199-209.
53. Arron JR, Pewzner Jung Y, Walsh MC, Kobayashi T, Choi Y. Regulation of the subcellular localization of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)2 by TRAF1 reveals mechanisms of TRAF2 signaling. *J Exp Med*. 2002;196(7):923-34.
54. Zhang X, Li W, Zhang X, et al. Association between polymorphism in TRAF1/C5 gene and risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2014;41(1):317-24.
55. Watanabe N, Nakajima H. Coinhibitory molecules in autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:269756.
56. Viatte S, Plant D, Raychaudhuri S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9(3):141-53.
57. Li X, Zhang C, Zhang J, et al. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis. *J Clin Immunol*. 2012;32(3):530-9.
58. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Association between the CTLA-4 +49A/G polymorphism and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2012;39(5):5599-605.

59. Muñoz-Valle JF, Valle Y, Padilla-Gutiérrez JR, et al. The +49A>G CTLA-4 polymorphism is associated with rheumatoid arthritis in Mexican population. *Clin Chim Acta*. 2010;411(9-10):725-8.
60. Torres-Carrillo N, Ontiveros-Mercado H, Torres-Carrillo NM, et al. The -319C/+49G/CT60G haplotype of CTLA-4 gene confers susceptibility to rheumatoid arthritis in Mexican population. *Cell Biochem Biophys*. 2013;67(3):1217-28.
61. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2007;357(10):977-86.
62. Eyre S, Bowes J, Diogo D, et al. High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2012;44(12):1336-40.
63. Gu E, Lu J, Xing D, et al. Rs7574865 polymorphism in signal transducers and activators of transcription 4 gene and rheumatoid arthritis: an update meta-analysis of 28 case-control comparisons. *Int J Rheum Dis*. 2015;18(1):3-16.
64. Zheng J, Yin J, Huang R, Petersen F, Yu X. Meta-analysis reveals an association of STAT4 polymorphisms with systemic autoimmune disorders and anti-dsDNA antibody. *Hum Immunol*. 2013;74(8):986-92.
65. Liang YL, Wu H, Shen X, et al. Association of STAT4 rs7574865 polymorphism with autoimmune diseases: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2012;39(9):8873-82.
66. Lien C, Fang CM, Huso D, Livak F, Lu R, Pitha PM. Critical role of IRF5 in regulation of B-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(10):4664-8.
67. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol*. 2011;12(3):231-8.
68. Barnes BJ, Kellum MJ, Pinder KE, Frisanco JA, Pitha PM. Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death. *Cancer Res*. 2003;63(19):6424-31.
69. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Association between interferon regulatory factor 5 polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2013;40(2):1791-9.
70. Jia X, Hu M, Lin Q, Ren H. Association of the IRF5 rs2004640 polymorphism with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2013;33(11):2757-61.
71. Carmona FD, Martin JE, Beretta L, et al. The systemic lupus erythematosus IRF5 risk haplotype is associated with systemic sclerosis. *PLoS One*. 2013;8(1):e54419.
72. Chistiakov DA, Chistiakov AP. Is FCRL3 a new general autoimmunity gene? *Hum Immunol*. 2007;68(5):375-83.
73. Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, et al. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nat Genet*. 2005;37(5):478-85.
74. Lee YH, Woo JH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Fc receptor-like 3-169C/T polymorphism and RA susceptibility: a meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2010;30(7):947-53.
75. Song GG, Bae SC, Kim JH, et al. Association between functional Fc receptor-like 3 (FCRL3) -169C/T polymorphism and susceptibility to seropositive rheumatoid arthritis in Asian: a meta-analysis. *Hum Immunol*. 2013;74(9):1206-13.
76. Ramírez Bello J, Jiménez Morales S, Espinosa Rosales F, et al. Juvenile rheumatoid arthritis and asthma, but not childhood-onset systemic lupus erythematosus are associated with FCRL3 polymorphisms in Mexicans. *Mol Immunol*. 2013;53(4):374-8.
77. Verecke L, Beyaert R, van Loo G. The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends Immunol*. 2009;30(8):383-91.
78. Elsbly LM, Orozco G, Denton J, Worthington J, Ray DW, Donn RP. Functional evaluation of TNFAIP3 (A20) in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28(5):708-14.
79. Zhang X, Li W, Zhang X, et al. Single nucleotide polymorphisms in TNFAIP3 were associated with the risks of rheumatoid arthritis in northern Chinese Han population. *BMC Med Genet*. 2014;15:56.
80. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between TNFAIP3 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Inflamm Res*. 2012;61(6):635-41.
81. Lee YH, Song GG. Associations between TNFAIP3 gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012;16(9):1105-10.
82. Musone SL, Taylor KE, Nilitham J, et al. Sequencing of TNFAIP3 and association of variants with multiple autoimmune diseases. *Genes Immun*. 2011;12(3):176-82.
83. Ramírez Bello J, Vargas Alarcón G, Tovilla Zárate C, Fragoso JM. [Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rSNP) and structural RNA (srSNPs) in complex diseases]. *Gac Med Mex*. 2013;149(2):220-8.
84. Rodríguez Carreón AA, Zúñiga J, Hernández Pacheco G, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. *J Autoimmun*. 2005;24(1):63-8.
85. Jiménez Morales S, Velázquez Cruz R, Ramírez Bello J, et al. Tumor necrosis factor-alpha is a common genetic risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population. *Hum Immunol*. 2009;70(4):251-6.
86. Song GG, Bae SC, Kim JH, Lee YH. Association between TNF-alpha promoter -308A/G polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2014;34(4):465-71.
87. Velu VK, Ramesh R, Srinivasan AR. Circulating microRNAs as biomarkers in health and disease. *J Clin Diagn Res*. 2012;6(10):1791-5.
88. Chen LJ, Lim SH, Yeh YT, Lien SC, Chiu JJ. Roles of microRNAs in atherosclerosis and restenosis. *J Biomed Sci*. 2012;19(1):79.
89. Zare-Shahabadi A, Renaudineau Y, Rezaei N. MicroRNAs and multiple sclerosis: from pathophysiology toward therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2013;17(12):1497-507.
90. Igaz I, Szönyi M, Varga P, Topa L. [Potential relevance of microRNAs in the diagnostics of inflammatory bowel diseases]. *Orv Hetil*. 2014;155(13):487-91.
91. Yan S, Yim LY, Lu L, Lau CS, Chan VS. MicroRNA regulation in systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Immune Netw*. 2014;14(3):138-48.
92. Filková M, Jüngel A, Gay RE, Gay S. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: potential role in diagnosis and therapy. *Bio Drugs*. 2012;26(3):131-41.
93. Ul-Hussain M. Micro-RNAs (miRNAs): genomic organization, biogenesis and mode of action. *Cell Tissue Res*. 2012;349(2):405-13.
94. Slaby O, Bienertova-Vascu J, Svoboda M, Vyzula R. Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer. *J Cell Mol Med*. 2012;16(1):8-21.
95. Song FJ, Chen KK. Single-nucleotide polymorphisms among microRNA: big effects on cancer. *Chin J Cancer*. 2011;30(6):381-91.
96. Georges M, Coppieters W, Charlier C. Polymorphic miRNA-mediates gene regulation: contribution to phenotypic variation and disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2007;17(3):166-76.
97. El-Shal AS, Aly NM, Gallil SM, Moustafa MA, Kandel WA. Association of microRNAs genes polymorphisms with rheumatoid arthritis in Egyptian female patients. *Joint Bone Spine*. 2013;80(6):626-31.
98. Hashemi M, Eskandari-Nasab E, Zakeri Z, et al. Association of pre-miRNA-146a rs2910164 and pre-miRNA-499 rs376444 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Mol Med Rep*. 2013;7(1):287-91.
99. Chatzkyriakidou A, Voulgari PV, Georgiou I, Drosos AA. miRNAs and related polymorphisms in rheumatoid arthritis susceptibility. *Autoimmun Rev*. 2012;11(9):636-41.
100. Li K, Tie H, Hu N, et al. Association of two polymorphisms rs2910164 in miRNA-146a and rs3746444 in miRNA-499 with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Hum Immunol*. 2014;75(7):602-8.
101. Fu L, Jin L, Yan L, et al. Comprehensive review of genetic association studies and meta-analysis on miRNA polymorphisms and rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus susceptibility. *Hum Immunol*. 2016;77(1):1-6.
102. Jiménez-Morales S, Gamboa-Becerra R, Baca V, et al. MiR-146a polymorphism is associated with asthma but not with systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis in Mexican patients. *Tissue Antigens*. 2012;80(4):317-21.
103. Raychaudhuri S, Thompson BP, Remmers EF, et al. Genetic variants at CD28, PRDM1 and CD2/CD58 are associated with rheumatoid arthritis risk. *Nat Genet*. 2009;41(12):1313-8.
104. Raychaudhuri S, Remmers EF, Lee AT, et al. Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2008;40(10):1216-23.
105. Lee YH, Ji JD, Song GG. Associations between FCGR3A polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *J Rheumatol*. 2008;35(11):2129-35.