

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA**



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“EVALUACIÓN DE POLIMORFISMO rs59110799 DEL GEN *IRF5* Y LA
SUSCEPTIBILIDAD PARA PRESENTAR SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO
EN PACIENTES MEXICANOS”**

T E S I S

PRESENTA:

DRA. CINTHIA JAHOSKA SAMURIA FLORES

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
REUMATOLOGÍA**

TUTORES DE TESIS:

DRA. ROSA ELDA BARBOSA COBOS

DRA. ISELA MONTÚFAR ROBLES

DR. JULIÁN RAMÍREZ BELLO

**NÚMERO DE REGISTRO DE PROTOCOLO HJM 198/21-R
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX, 2022**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

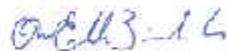
AUTORIZACIÓN DE TESIS

**"EVALUACIÓN DE POLIMORFISMO rs59110799 DEL GEN /RF5 Y LA
SUSCEPTIBILIDAD PARA PRESENTAR SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO
EN PACIENTES MEXICANOS"**

HJM 198/21- R



**DRA. CINTHIA JAHOSKA SAMURIA FLORES
TESISTA**



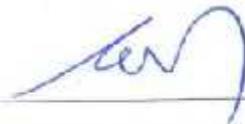
**DRA. ROSA ELDA BARBOSA COBOS
DIRECTORA DE TESIS**



**DRA. ISELA MONTÚFAR ROBLES
DIRECTORA DE TESIS**



**DRA. ERIKA GÓMEZ ZAMORA
SUBDIRECTORA DE ENSEÑANZA**



**DR. ERIK EFRAÍN SOSA DURÁN
JEFE DE POSGRADO**

DEDICATORIA

A mi madre, Manuela Flores Pozo quien ha estado en todo momento de mi vida junto a mí, apoyándome de forma incondicional, tu bendición a lo largo de toda mi carrera siempre me ha protegido, por tu paciencia y amor, gracias madre.

A mi esposo Elvin Omar Rizo porque un día prometimos reencontrarnos y este paso nos acerca cada vez más, porque no ha sido nada fácil pero siempre estuviste apoyándome aún a la distancia; por cada momento de altos y bajos, con todo mi corazón este trabajo es para ti.

A mis hermanos, por cada momento de lucha que supimos sobrellevar, este trabajo es para ustedes, los amo.

AGRADECIMIENTO

A mis maestros Dra. Rosa Elda Barbosa, Dra. Lucía Maya, Dra. Anna Sofía Vargas y Dr. Ricardo Sabido. De quienes aprendí no sólo reumatología, sino calidad humana y cómo ser un excelente profesional. Gracias por compartir conmigo sus conocimientos y consejos de vida.

A toda mi familia que siempre tuvo palabras de aliento durante esta etapa.

A todas las personas que creyeron en mí y me apoyaron para poder cumplir este sueño.

A cada uno de mis pacientes, por todos sus detalles, sus palabras y la confianza puesta en mí.

A mis compañeros y amigos de residencia, gracias por cada día vivido, por sus consejos y apoyo en momentos difíciles.

A mis tutores de tesis Dra. Rosa Elda Barbosa y Dra. Isela Montúfar Robles, por su entrega y dedicación a este trabajo; gracias por compartir sus conocimientos.

INDICE

1. Introducción	1
2. Justificación	8
3. Pregunta de investigación	9
4. Hipótesis	9
5. Objetivos	9
6. Metodología	9
7. Análisis e interpretación de resultados	13
8. Recursos	14
9. Aspectos éticos	14
10. Aspectos de bioseguridad	14
11. Resultados	14
12. Discusión	17

13. Conclusiones	19
14. Recomendaciones	20
15. Bibliografía	20
16. Anexos	24

3. Antecedentes o marco teórico

3.1. Síndrome de Sjögren primario

3.1.1. Introducción

Definición

El Síndrome de Sjögren primario (SSp) es una enfermedad autoinmune (EA) caracterizada por disfunción de glándulas salivales y lagrimales asociada a múltiples manifestaciones sistémicas.¹

Henri Gougerot, dermatólogo francés describió por primera vez en 1925 la presencia de sequedad progresiva de los ojos como un componente de una condición generalizada que podía incluir a su vez sequedad de boca, nariz, laringe y vulva. Sin embargo, fue Henrik Sjögren, quien a través de su estudio con 19 pacientes en los cuales documentó a su vez presencia concomitante de artritis, la describió en 1933 como una patología generalizada que comprometía ojos y glándulas salivales.²

Entre 1965 y 2012 se propusieron una serie de criterios de clasificación para el SSp.

En 1965, mediante la definición de una triada de queratoconjuntivitis, xerostomía y artritis reumatoide (AR) se establecieron los primeros criterios diagnósticos al cumplirse dos de tres de los antes mencionados.

Los criterios de San Francisco en 1972 determinaron la necesidad de criterios objetivos para diagnosticar SS, por lo que se realizaron pruebas específicas para los componentes salivales y oculares. La xerostomía se valoró por biopsia de glándula salival labial, con infiltrado de linfocitos > 1 foco / 4 mm^2 , la queratoconjuntivitis seca se definió por tinción difusa, punteada o manchada del epitelio corneal y conjuntival a través de rosa de bengala, y la prueba de Schirmer $< 10 \text{ mm} / 5 \text{ min}$.²

Durante este periodo se comenzó a utilizar el término SICCA para referirse a pacientes que presentaban compromiso ocular y salival, sin otra enfermedad del tejido conectivo concomitante.²

En 2002, la American-European Consensus Group (AECG), aprobó los criterios clínicos para SS, donde además de los síntomas subjetivos de ojos y boca secos, debían estar presentes signos oculares, según la prueba de Schirmer y la puntuación

de rosa de bengala, sialoadenitis focal por histopatología y autoanticuerpos de especificidad anti-Ro y / o anti-La.

Por lo que, tomando en cuenta que el criterio histológico podría modificarse en condiciones como el tabaquismo o uso crónico de esteroides y la presencia de anticuerpos no siempre podrían estar presentes, fueron propuestos nuevos criterios en 2012.³

El Colegio Americano de Reumatología (ACR, del inglés American Collage of Rheumatology) aprobó criterios de clasificación que consisten en la presencia de al menos dos de las siguientes tres características: tener en suero anticuerpos anti-SSA/Ro y/o anti-SSB/La, o factor reumatoide y título de ANA 1:320; biopsia de glándula salival labial que muestra sialoadenitis con linfocitos con puntaje focal 1 foco/4mm²; queratoconjuntivitis seca con puntaje de tinción ocular 3 (suponiendo que el individuo no está usando tratamiento para glaucoma, no ha tenido cirugía corneal o cirugía estética de párpados en los últimos 5 años). Con exclusión de antecedentes de radioterapia en la cabeza y el cuello, infección por hepatitis C, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, sarcoidosis, amiloidosis, enfermedad de injerto contra huésped o enfermedad relacionada con IgG4.²

Posteriormente se publicaron los criterios de clasificación por el ACR / EULAR (del inglés, European League Against Rheumatism) en el año 2016, actualmente vigentes.⁴

El término de SSp hace referencia aquellos pacientes en los cuales no se detecta otra EA, mientras, en pacientes con SS se presentan EA sistémicas.⁵

3.1.2. Epidemiología

La enfermedad tiene predominio de mujeres a hombres en una proporción de 9:1, respectivamente, con una incidencia máxima a los 50 años. Constituye una exocrinopatía que resulta en sequedad de boca y ojos, asociado a fatiga. Estos síntomas están presentes en más del 80% de los pacientes.⁶

En la actualidad, no existen estudios epidemiológicos realizados en población latinoamericana, un artículo reciente en esta población reportó características clínicas distintivas en comparación con lo reportado en el resto del mundo. Concluyendo que

el espectro clínico del SSp difiere entre países y continentes, teniendo factores ambientales como probables determinantes en el desarrollo de esta EA.⁷

3.1.3. Manifestaciones clínicas

La sensación subjetiva de ojo y boca seca son las características claves en el diagnóstico. La afectación ocular debe evaluarse más cuidadosamente en los hombres ya que estos tienen más probabilidad de complicaciones oculares graves. La historia de inflamación crónica o episódica de las salivales mayores es una presentación frecuente que suele afectar a la glándula parótida de manera unilateral o bilateral. Según una publicación reciente en 940 pacientes, el 82% tenían afectación glandular en el momento del diagnóstico. Un gran porcentaje de mujeres presenta la triada clásica de sequedad, fatiga y dolor.⁸

Hasta el 30-50% de los pacientes con SS pueden presentar una enfermedad sistémica que se manifiesta en diversos órganos y sistemas, a nivel articular (50%), neurológico (10-25%), pulmonar (9-12%), gastrointestinal (5-25%), cutáneo (10%) o renal (5%).⁹ La principal complicación de esta enfermedad es el incremento del riesgo de hasta 44 veces para desarrollar linfoma no Hodgkin, más frecuente de células B, comparado con la población general.¹⁰

3.1.4. Diagnóstico

El ACR propuso en 2016 nuevos criterios de inclusión y de exclusión de clasificación para esta EA, clasificando como SS con puntaje 4 de los 5 criterios (Tabla 1). La sensibilidad de éstos es de 96% y la especificidad de 95%.¹¹

Criterios de inclusión reportados por la ACR/EULAR 2016 para SS.

Se aplica para pacientes que presenten al menos 1 síntoma de sequedad ocular, definida como una respuesta positiva mínimo para una de las siguientes preguntas:

- 1) ¿Ha tenido problemas de ojo seco diariamente, persistente, por más de 3 meses?
- 2) ¿Ha tenido sensación recurrente de arena o polvo en los ojos?
- 3) ¿Utiliza sustitutos de lágrimas más de 3 veces al día?

4) ¿Ha tenido la sensación de boca seca por más de 3 meses?

5) ¿Frecuentemente ingiere líquidos para ayudar a deglutir alimentos?

Criterios de exclusión reportados por la ACR/EULAR 2016 para SS.

Previo al diagnóstico se debe descartar cualquiera de las siguientes condiciones, ya que excluyen el diagnóstico de SS y la participación en estudios o ensayos terapéuticos de esta enfermedad, porque superponen manifestaciones clínicas.

1) Antecedente de tratamiento con radiación en cabeza y cuello

2) Infección por hepatitis B activa (confirmada por reacción en cadena de polimerasa)

3) Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

4) Sarkoidosis

5) Amiloidosis

Tabla 1. Criterios de clasificación ACR/EULAR 2016 para síndrome de Sjögren.

<i>Ítem</i>	Descripción	Puntaje
<i>Focus score 1</i>	Puntaje determinado por el número de infiltrados de células mononucleares que contienen 50 células inflamatorias por 4 mm ² de glándula salival labial menor obtenidas en la biopsia	3
<i>Presencia de anticuerpos anti-SSA*</i>	Medido en suero; solo se deben tener en cuenta los anticuerpos anti-Ro60; los anticuerpos aislados anti-Ro52 no son específicos para síndrome de Sjögren	3
<i>Puntuación de tinción ocular SICCA de 5</i>	Una puntuación determinada por un oftalmólogo sobre la base del examen con fluoresceína y tinción con verde de lisamina; las puntuaciones oscilan entre 0 y 12, y las puntuaciones más altas indican una mayor gravedad	1
<i>Prueba de Schirmer de 5 mm por 5 min</i>	Una prueba para medir la producción de lágrimas mediante la inserción de papel de filtro en la conjuntiva del párpado inferior y la evaluación de la cantidad de humedad en el papel	1
<i>Flujo salival total no estimulado de 0.1 ml por min</i>	Una prueba para medir el flujo salival recogiendo este líquido en un tubo durante al menos 5 minutos después de que el paciente haya deglutido	1
<i>Puntaje total</i>		9

3.2. Genética

3.2.1. Generalidades

La genética en SS ha sido poco estudiada en comparación con otras EA sistémicas. La concordancia entre hermanos varía entre un 8 a 30%, mientras, en gemelos dicigóticos es de 2 a 4%.

El principal factor de riesgo para SS es ser mujer, la identificación de alteraciones en el cromosoma X sugiere que algunos genes de riesgo pueden localizarse en este cromosoma.¹²

Como en la mayoría de las EA, las asociaciones genéticas más fuertes se encuentran dentro de la región del antígeno leucocitario humano (HLA) clase I o II, y las variantes de riesgo difieren en algunos casos de acuerdo al grupo étnico.

Las asociaciones más documentadas establecidas son con polimorfismos de un solo nucleótido el cual es una variante de un solo nucleótido (SNV) localizadas en los loci DR2 y DR3 en DRB1 en población caucásica.

También han sido identificadas asociaciones muy fuertes con anti-Ro/SSA y/o anti-La/SSB en pacientes que portan diversos alelos de riesgo tales como DRB1*03 y DQB1*02.^{12,13} Un estudio de asociación amplio del genoma (GWAS) reportado por Lessard et al., encontró que el HLA-DQB1 porta diversos alelos de riesgo para SSp. También se han realizado estudios en población europea y asiática en los cuales se han encontrado fuertes asociaciones con HLA-DRB1/HLA –DQA1 y HLA-DPB1.¹⁴

Por otro lado, se han documentado genes asociados no-HLA ser factores de riesgo para SSp, entre ellos se encuentra IRF5 (que codifica para la proteína factor regulador del interferón5), cuya función es regular la señalización inducida mediante IFN (interferón) y por TLR (receptores tipo Toll), involucradas en la producción de diversas citosinas y STAT4 (transductor de señal y activador de transcripción, esta última involucrada en las vías de IFN de tipo I y II).¹⁵

La susceptibilidad genética a la desregulación de la inmunidad innata se ejemplifica por las asociaciones de SSp con diferentes SNV localizados en los genes IRF5, STAT4, interleucina (IL)-12A (IL-12A) y oligoadenilato sintetasa 1 (OEA1). Todos involucrados en la señalización de IFN tipo I, lo cual se observa de manera

predominante en pacientes con SSp positivos para anti-Ro / SSA y / o anti-La. De los mencionados, IRF5 juega un papel sumamente importante al actuar como regulador de la expresión de IFN.

3.2.2 Vía de señalización mediada por IRF5

La asociación genética más fuertemente fuera del HLA se encuentra en IRF 5, un gen que produce la proteína IRF5 involucrada en la vía de señalización de INF y en la diferenciación de células B. La región del HLA contiene cientos de genes responsables en la presentación de antígenos y funciones de las células inmunitarias. Las moléculas del HLA de clase I se expresan en todas las células nucleadas, en cambio, los genes HLA clase II transmiten la mayor predisposición genética en las EA. Algunos haplotipos y alelos de riesgo tales como DRB1 *0301, DQA*0501, DQB1*0201 y DRB1, han sido identificados ser factores de riesgo para esta EA.¹⁶ En un estudio de asociación realizado en europeos se reportaron algunas mutaciones en *RFX5*. La expresión de INF correlaciona con la producción de auto anticuerpos anti Ro/SSA y anti –La/SSB en pacientes con SS.¹⁷

Los genes asociados con SS pueden asignarse a la vía NF-κB, la vía de señalización de IFN, la señalización de linfocitos y la presentación de antígenos.¹⁸

Aunque prácticamente todas las células pueden producir IFN de tipo I en respuesta a una infección viral y bacteriana, las células presentadoras de antígenos son las células productoras de IFN más potentes produciendo hasta 100 veces más cantidad en comparación con otras células. En las glándulas salivales, su producción puede promover la formación de focos inflamatorios. Se ha documentado que a pesar de haber poca cantidad de células presentadoras plasmáticas en sangre estas migran a regiones periféricas, esto por probable expresión de factores de transcripción proinflamatorios, como IRF5 e IRF7, en pacientes con SS. Los IFN de tipo I son inducidos transitoriamente por una infección viral. Se desconoce la contribución de la infección viral a la señalización elevada de IFN en SS; sin embargo, se ha propuesto que varios virus contribuyen a la patogénesis de SS, incluidos el de Epstein-Barr (EBV), el citomegalovirus (CMV), el de la hepatitis B (VHB) y C (VHC). Se pueden generar anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con autoantígenos asociados a SS, como anti-Ro / SSA. Se han detectado autoanticuerpos y células B específicas

de autoantígeno en las glándulas salivales de pacientes con SS y puede implicar en la producción de IFN de tipo I mediante la formación de inmunocomplejos.^{19,20}

3.2.3 IRF5 y SS

IRF5 es un factor de transcripción que actúa mediante el efecto de los TLR y del receptor del INF tipo I para promover la expresión de proteínas antivirales y proinflamatorias. Este se asocia con SSp con un polimorfismo del tipo inserción/delección de CGGGG en la región promotora de este gen.¹⁰

El IRF5 induce las respuestas de IFN de tipo I en varias células relacionadas con el sistema inmunitario tras la infección viral e induce la transcripción de IFN y otras citosinas pro inflamatorias. ²¹Se ha documentado que entre los polimorfismos asociados con *IFN* y SS, destaca el rs2004640.¹⁹

Se han realizado estudios epigenéticos con diferentes tipos de células implicadas en la patogenia del SS como linfocitos TCD4+, TCD8+, linfocitos B y células epiteliales de glándulas salivales en las que se observa infiltración focal en conjunto con células dendríticas y macrófagos presentes en formaciones similares a centros germinales. Las células epiteliales expresan HLA de clase I y II, moléculas de adhesión, citocinas y quimiocinas que pueden actuar como células presentadoras de antígenos y atraer linfocitos T. Las modificaciones de estos preceden a la activación inmunitaria. Se ha demostrado regulación positiva de transcripción de genes inducidos por IFN e diferentes células mononucleares de pacientes con SSp. Otro punto fundamental es la regulación genética de la metilación de DNA, cuyas variantes genéticas en diferentes *loci* determinan asociaciones genéticas y susceptibilidad.²⁰

4. Justificación

El polimorfismo **rs59110799** del gen **IRF5** asociados con síndrome de Sjögren han sido poco evaluados en poblaciones con diferente fondo genético al caucásico, sin embargo, se desconoce hasta el momento si variantes en este gen causan susceptibilidad en pacientes latinoamericanos, quienes tienen un fondo genético diferentes a los caucásicos o asiáticos. No se encuentran estudios con latinoamericanos, donde se incluye población mexicana, ni se ha evaluado la frecuencia alélica y/o genotípica de esta variante por lo que este estudio representará

un avance de estudio genético en pacientes mexicanos para determinar si existe susceptibilidad conferida por **IRF5** para SSp.

5. Pregunta de Investigación

¿La variante **rs59110799** localizadas en el gen **IRF5** confieren susceptibilidad para síndrome de Sjögren primario en pacientes mexicanos?

6. Hipótesis

El polimorfismo **rs59110799** localizado en el gen **IRF5** están asociados con la susceptibilidad para presentar síndrome de Sjögren primario en pacientes mexicanos.

7. Objetivos

7.1 Objetivo primario

Identificar si el polimorfismo **rs59110799** localizado en el gen **IRF5**, está asociados con susceptibilidad para presentar síndrome de Sjögren primario en pacientes mexicanos y con la gravedad de la enfermedad.

7.2 Objetivos secundarios

7.2.1. Determinar la frecuencia del polimorfismo **rs59110799** localizado en el gen **TNF IRF5** en pacientes mexicanos con síndrome de Sjögren primario y en individuos controles no relacionados.

7.2.2. Identificar si hay asociación entre el polimorfismo **rs59110799** localizado en el gen **IRF5** con susceptibilidad para presentar síndrome de Sjögren primario.

8. Metodología

8.1. Diseño de la investigación

Estudio de casos y controles

8.2. Tipo de estudio

Observacional, transversal, comparativo y retrospectivo

8.3. Ubicación temporal y espacial

Fecha de inicio: 01/08/2021

Fecha de término: 01/08/2022

Servicio de Reumatología, Hospital Juárez de México.

Unidad de Investigación. Hospital Juárez de México.

8.4. Población

Casos

Criterios de inclusión

- Diagnóstico de SSp de acuerdo a los criterios de clasificación ACR/EULAR 2002
- Género femenino
- Nacidos en México, y que sus padres y abuelos hayan nacido en México
- Edad mayor o igual 18 años
- Atendidos en el Hospital Juárez de México en el servicio de Reumatología
- Consentimiento informado firmado

Criterios de exclusión

- Otra enfermedad reumatológica autoinmune

Criterios de eliminación

- Revocación del consentimiento

Controles

Criterios de inclusión

- Género femenino
- Nacidos en México, y que sus padres y abuelos hayan nacido en México
- Edad mayor o igual a 18 años
- Consentimiento informado firmado

Criterios de exclusión

- Enfermedad autoinmune

- Otra enfermedad crónica

Criterios de eliminación

- Revocación del consentimiento

8.5. Operacionalización de variables

Independiente	Tipo	Unidad de medida	Definición conceptual	Definición operacional
Síndrome de Sjögren	Cualitativa dicotómica nominal	Ausencia	Sin criterios de clasificación de SS	Sin criterios de clasificación de SS
		Presencia	Con criterios de clasificación de SS	Con criterios de clasificación de SS
Dependiente	Tipo	Unidad de medida	Definición conceptual	Definición operacional
<i>TNF IRF5</i>	Cualitativa dicotómica nominal	Ausencia Presencia	Gen que codifica a la proteína <i>TNF IRF5</i>	Gen que codifica a la proteína <i>TNF IRF5</i>

8.6 Cálculo del tamaño de la muestra

Se realizó con el uso del programa QUANTO, con un error alfa de 0.05; error beta de 0.20; potencia de la muestra de 0.80; intervalo de confianza del 95%; un valor de p menor a 0.05, y tomando en cuenta una prevalencia de SSp de 0.2% y un modelo genético, el tamaño de la muestra corresponde a 200 pacientes con SSp y 200 controles sanos.

8.7 Descripción operativa

8.7.1 Detección de pacientes

Fueron incluidos pacientes que cumplan con los criterios de clasificación 2016 descritos por ACR / EULAR

Fueron identificados aquellos pacientes que cumplan los criterios de inclusión en la clínica de SSp de la consulta externa de reumatología de los días viernes. Se invitaron a los pacientes detectados a participar en el protocolo de investigación, si aceptaba, se procedía a obtener la firma del consentimiento informado y toma de muestra.

8.7.2 Toma de muestras

Se procedió a tomar una muestra de sangre periférica de 5 ml, en tubos vacutainer que contiene EDTA como anticoagulante.

8.7.3 Extracción de ADN

1. Las muestras contenidas en tubos con EDTA fueron centrifugadas a 3000 r.p.m durante 10 minutos.
2. Se tomó la capa de leucocitos y se colocaron en un tubo limpio de 15 ml para iniciar el procedimiento de extracción del ADN.
3. Se agregó a cada tubo de 15 ml, 6 ml de buffer de lavado
4. Nuevamente, fue centrifugada la muestra obtenida de la mezcla durante 5 minutos a 3500 r.p.m.
5. Fué descartado el sobrenadante.
6. Se agregaron 6 ml de buffer de lisis de células
7. Se decantó el sobrenadante y se colocó buffer y proteinasa K (30 microlitros) a la muestra, posteriormente; se incubó la muestra con la mezcla de reactivos durante 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Se agregó isopropanol (3 ml) a la mezcla de reacción, posteriormente se centrifugó la muestra a 3500 rpm durante 5 minutos.
9. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se agregaron 3 ml de alcohol etílico al 70%, nuevamente se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 5 minutos.
10. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar el ADN a temperatura ambiente por 5 minutos
11. Finalmente, se agregó buffer de elusión de ADN (600 microlitros), se cuantificó el ADN y se realizaron diluciones a 5 ng/microlitro

8.7.4 Genotipificación de TNF *IRF5*

Para determinar los genotipos de esta variante en ambos grupos (casos-controles), se emplearon sondas TaqMan fluorescentes de genotipificación, las cuales procedieron adquirir con Applied Biosystems (parte de Thermo Scientific). Cada vial de reactivo contuvo un par de sondas, las cuales fueron identificadas (dado que la sonda es 100% complementaria a la secuencia de DNA donde se encuentra el polimorfismo) un alelo de esta variante bialélica. Los genotipos se obtuvieron mediante el equipo de tiempo real Bio-Rad CFX1000, en el cual se incluyó un detector de fluorescencia.

El equipo se mostró en un plot de discriminación alélica, los tres genotipos de esta variante, para ello se emplearon 10 nanogramos de DNA nuclear de cada caso-control y se procedió a realizar los ensayos de amplificación del DNA, el cual incluía lo siguiente:

- a) 1 ciclo de inicio de 2 minutos a 50 grados centígrados, y 10 minutos a 95 °C.
- b) 40 ciclos de PCR subsecuentes, que incluirá 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C, así como una extensión final de 4°C por cinco minutos.
- c) La liberación de la fluorescencia fué escaneada por el programa del equipo denominado CFX manager 3.1.

9. Análisis estadístico e interpretación de resultados

La estadística descriptiva de las variables cuantitativas se expresó con medidas de tendencia central y dispersión, con el software IBM SPSS versión 25. La estadística analítica fue realizada mediante la prueba de chi cuadrada, considerando significancia estadística con $p < 0.05$ e intervalo de confianza del 95%, con el software Finetti. El equilibrio de Hardy-Weinberg para casos y controles se obtuvo mediante este mismo programa.

8. Recursos

Equipo médico del servicio de reumatología, auxiliares e investigadores de la Unidad de Investigación en Enfermedades Metabólicas y Endocrinas.

9. Aspectos éticos

La presente tesis de investigación se realizó de acuerdo con lo dispuesto en la Ley General de Salud, en materia de investigación en salud y en materia del genoma humano que se publicó en el diario oficial de la federación del 16 de noviembre 2011. El estudio se apegó a los principios de la asamblea médica mundial para la investigación en seres humanos establecidos en la declaración de Helsinki. Se presentó el proyecto al Comité de ética, investigación y bioseguridad del Hospital Juárez de México para su aprobación.

10. Aspectos de Bioseguridad.

Esta investigación se categorizó con un riesgo mínimo debido a que se extrajo un volumen de sangre de 12 mililitros por punción venosa en adultos hemodinámicamente estables en una ocasión. Este estudio requirió consentimiento informado por escrito.

11. Resultados

El grupo de estudio fue de 200 mujeres con diagnóstico de SSp con una mediana de edad de 57.69 años (RIQ 23-83) y una mediana de duración de la enfermedad de 87 meses (RIQ 5-275), y el grupo de control fue de 200 mujeres sanas con una mediana de edad de 50.67 años (RIQ 42-60). Las características y tratamiento de las pacientes con SSp se muestra en la Tabla 1.

Se realizó un análisis de genotipos para frecuencias genotípicas y alélicas de la variante **rs59110799** de *IRF 5* encontrándose asociación de la variante alélica T (tabla 2)

Tabla 1 Características y tratamiento de 200 mujeres con síndrome de Sjögren primario

	%
Síntomas secos	
xeroftalmia	100
xerostomía	71
sequedad nasal	27
Tos no productiva	8.5
sequedad vaginal	18.6
Sequedad cutánea	28.8
Pruebas de sequedad ocular	
Prueba de schirmer-1 positiva	50.8
Puntuación de tinción ocular	55.9
Tiempo de rotura lagrimal	94.9
Pruebas de sequedad oral	
Tasa de flujo de saliva total no estimulada	59.3
Manifestaciones sistémicas	
Fatiga	23.7
Fiebre	1.7
Sudores nocturnos	22
Pérdida de peso involuntaria	8.5
Artralgias	22
sinovitis	8.5
fenómeno de Raynaud	5.1
Anti-SSA (Ro)+	86
Anti-SSB (La)+	52.5
Biopsia de glándulas salivales labiales‡	
Positivo	84.7
Negativo	5.3
No realizado	10
Tratamiento sintomático	
Ocular	98

Oral	28.8
Vaginal	22
Cutáneo	64
Comorbilidad	
Tabaquismo	13.6
Diabetes	3.4
Hipertensión	15.3
Dislipidemia	27.1
Hipotiroidismo	23.7

Tabla 2. Frecuencias genóticas y alélicas de las variantes de *IRF5* y análisis de asociación en pacientes con Síndrome de Sjögren primario y sujetos sanos.

SNVs	Modelo					
<i>IRF5</i> rs59110799G/T	Codominante	GG	96 (48.0)	123 (61.5)		
		GT	80 (40.0)	77 (38.5)	1.3 (0.88 - 2.0)	NS
		TT	24 (12.0)	0 (0)		
	Alélico	G	272 (68.0)	323 (80.8)		
		T	128 (32.0)	77 (19.2)	1.97 (1.42 - 2.73)	0.00004

SNVs: Variante de un solo nucleótido; OR: odds ratio; IC: Intervalo de confianza

SSp: Síndrome de sjögren primario; * $p < 0.05$: significancia estadística.

12. Discusión

Resumen

En este estudio se evaluó la asociación entre la variante **rs59110799** localizada en el gen *IRF5* y la susceptibilidad para desarrollar SSp en pacientes mexicanos.

Nuestro estudio demostró asociación de la variante alélica T cuya correlación se estableció mediante OR de 1.97.

Fortalezas y limitaciones

La principal limitación la constituye el hecho de ser un estudio retrospectivo y la proporción de casos:controles de 1:1

La fortaleza principal del estudio es ser el primero en evaluar la relación de SNV **rs2004640** del gen *IRF5* en pacientes con SSp en población latinoamericana.

Comparación de la literatura existente

Diversos estudios han reportado variantes genéticas como factores de susceptibilidad para desarrollo de SSp sin embargo, son muy pocos los que han evaluado SNV del gen *IRF* resultados son contradictorios con variación geográfica y étnica.

Miceli C, et al evaluó asociación genética en pacientes caucásicos siendo el primero en demostrar una asociación significativa entre el SSp y el *IRF5* **rs2004640** alelo T (18).

Imgenberg J, et al en su publicación sobre cambios genéticos y epigenéticos en SSp en las diferentes cohortes evaluadas hasta el año 2021 no reporta las SNV **rs2004640/rs10488631** de *IRF5* como las más asociadas, sin embargo, este factor puede deberse a razones étnicas (12).

Nogard et al en su estudio de asociación de genes *IRF5* y *STAT 4* con SSp también encontró **rs2004640** y **rs10488631** de *IRF5* asociado a manifestaciones SICCA y positividad de anticuerpos Ro y La en población caucásica. (6)

Con respecto a la variante **rs59110799** de *IRF5*, hasta la fecha sólo se ha realizado un estudio multiétnico publicado por Taylor et al en el cual se incluyó a población americana nativa. Este estudio reportó asociación de la variante con un OR de 1.72, para todas las etnias, pero cabe destacar que la mayor población estudiada era de origen europeo y asiático (14).

De acuerdo al conocimiento de los investigadores, este es el primer estudio realizado de la variante **rs59110799** de *IRF5* en población de Latinoamérica y correspondió con los datos reportados previamente en población caucásica.

La evidente inconsistencia en los resultados publicados hasta la fecha podría atribuirse a diversos factores como los dependientes del estudio (diseño, tamaño de muestra, métodos de laboratorio y análisis) y los genéticos (heterogeneidad genética de la población estudiada secundaria a diversidad de razas y etnias en la población mexicana).

Implicaciones para la investigación y/o la práctica

Nuestro trabajo sugiere que el análisis de material genético puede incluirse como parte de la detección de rutina para pacientes con enfermedades reumáticas como SSp, ya que de esta manera se podría establecer riesgo para desarrollo de estas entidades clínicas y de morbi-mortalidad, de tal manera que esto nos permita impactar en la evolución y pronóstico de nuestros pacientes mediante tratamiento oportuno.

Fondos: esta investigación no recibió financiación externa.

Declaración de la junta de revisión Institucional: el estudio se realizó según las directrices del Hospital Juárez de México.

Declaración de consentimiento informado: todos los datos de los pacientes de este estudio están disponibles previa solicitud al autor correspondiente.

Expresiones de gratitud: a todos los pacientes y profesionales de la salud que participaron en el estudio.

Conflictos de interés: los autores declaran no tener conflicto de intereses.

13. Conclusiones

La SNV **rs59110799** localizada en el gen *IRF5* para el alelo T con un OR de 1.97 se asocia con la susceptibilidad para desarrollar SSp en pacientes mexicanos.

14. Recomendaciones

Este estudio se realizó con una proporción de casos y controles de 1:1, en futuras investigaciones se recomienda incrementar el número de controles para aumentar el poder estadístico en reporte genético.

15. Bibliografía

1. Smolen S, Aletaha, D, Barton, A. Rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Disease Primers*.2018;4(1):1-23.
2. Safiri S, Kolahi A, Hoy D, Smith E, Bettampadi D, Mansournia MA, et al. Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990-2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease study 2017. *Ann Rheum Dis*. 2019;78(11):1463-71.
3. Almutairi K, Nossent J, Preen D, Keen H, Inderjeeth C. The global prevalence of rheumatoid arthritis: a meta-analysis based on a systematic review. *Rheumatol Int*. 2021;41(5):863-877.
4. Silva-Fernández L, Macía-Villa C, Seoane-Mato D, Cortés-Verdú R, Romero-Pérez A, Quevedo-Vila V, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in Spain. *Sci Rep*. 2020;10(1):1-9.
5. Rossini M, Rossi E, Bernardi D, Viapiana O, Gatti D, Idolazzi L, et al. Prevalence and incidence of rheumatoid arthritis in Italy. *Rheumatol Int*. 2014;34(5):659-64.
6. Myasoedova E, Davis J, Matteson EL, Crowson CS. Is the epidemiology of rheumatoid arthritis changing? Results from a population-based incidence study, 1985-2014. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(4):440-444.
7. Peláez I, Sanin L, Moreno J, Alvarez J, Burgos R, Garza M, et al. Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *J Rheumatol*.2011;38 (86):3-6.
8. Nevares A, Raut R, Libman B, Haj R. Noninfectious Autoimmune Scleritis: Recognition, Systemic Associations, and Therapy. *Curr Rheumatol Rep*. 2020;22(4):11.
9. Watson P, Romano A. The impact of new methods of investigation and treatment on the understanding of the pathology of scleral inflammation. *Eye*. 2014;28(8):915-930.

10. Wakefield D, Di Girolamo N, Thureau S, Wildner G, McCluskey P. Scleritis: Immunopathogenesis and molecular basis for therapy. *Prog Retin Eye Res.* 2013; 35:44-62.
11. Gao Y, Du L, Li F, et al. The haplotypes of various TNF related genes associated with scleritis in Chinese Han. *Human Genomics.* 2020; 4(1):1-9.
12. Bhamra M, Gondal I, Amarnani A, Betesh S, Zhyvotovska A, Scott W, et al. Ocular Manifestations of Rheumatoid Arthritis: Implications of Recent Clinical Trials. *Int J Clin Res Trials.* 2019;4(2):139.
13. Artifoni M, Rothschild PR, Brézin A, Guillevin L, Puéchal X. Ocular inflammatory diseases associated with rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2014;10(2):108-16.
14. Murray PI, Rauz S. The eye and inflammatory rheumatic diseases: The eye and rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2016;30(5):802-825.
15. Caspi RR. In This issue: Immunology of the eye-inside and out. *Int Rev Immunol.* 2013;32(1):1-3.
16. Victor L, Caspi R. Immune mechanisms in inflammatory and degenerative eye disease. *Trends in Immunology.* 2015;36 (6):354-363.
17. Song J, Huang YF, Zhang WJ, Chen XF, Guo YM. Ocular diseases: Immunological and molecular mechanisms. *Int J Ophthalmol.* 2016;9(5):780-788.
18. Cunningham ET, McCluskey P, Pavesio C, Wakefield D, Zierhut M. Scleritis. *Ocul Immunol Inflamm.* 2016;24(1):2-5.
19. Wu Y, He X, Huang N, Yu J, Shao B. A20: A master regulator of arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2020;22(1):1-15.
20. Zhang L, Yuan X, Zhou Q, Shi J, Song Z, Quan R, et al. Associations Between *TNFAIP3* Gene Polymorphisms and Rheumatoid Arthritis Risk: A Meta-analysis. 2017;48(4):386-92.

21. Ciccacci C, Latini A, Perricone C, Conigliaro P, Colafrancesco S, Ceccarelli F, et al. *TNFAIP3* gene polymorphisms in three common autoimmune diseases: Systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and primary sjogren syndrome - association with disease susceptibility and clinical phenotypes in Italian patients. *J Immunol Res.* 2019;20(4): 102-1018.
22. Das UN. Molecular pathobiology of scleritis and its therapeutic implications. *Int J Ophthalmol.* 2020;13(1):163-75.
23. Das T, Chen Z, Hendriks RW, Kool M. A20/tumor necrosis factor α -induced protein 3 in immune cells controls development of autoinflammation and autoimmunity: Lessons from mouse models. *Front Immunol.* 2018;9(2) :101- 104.
24. Elsbey LM, Orozco G, Denton J, Worthington J, Ray DW, Donn RP. Europe PMC Funders Group Functional evaluation of *TNFAIP3* (A20) in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2010;28(5):708-714.
25. Karami J, Aslani S, Jamshidi A, Garshasbi M, Mahmoudi M. Genetic implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis; an updated review. 2019;70 :8-16.
26. Vergouwen D, Rothova A., Berge J ,Verdijk R, et al. Current insights in the pathogenesis of scleritis. *Experimental Eye Research.*2020;197:1-20.
27. Li F, Ma X, Du L, Shi L, Cao Q, Li N, et al. Identification of susceptibility SNPs in CTLA-4 and PTPN22 for scleritis in Han Chinese. *Clin Exp Immunol.* 2019;197(2):230-236.
28. Yarwood A, Huizinga T, Worthington J. The genetics of rheumatoid arthritis: Risk and protection in different stages of the evolution of RA. *Rheumatology.* 2015;55(2):199-209.
29. Shen N, Ruan Y, Lu Y, Jiang X, Sun H, Gao G, et al. Three single nucleotide polymorphisms of *TNFAIP3* gene increase the risk of rheumatoid arthritis. *Oncotarget.* 2017;8(13):20784-93.
30. Shimane K, Kochi Y, Horita T, Ikari K, Amano H, Hirakata M, et al. The association of a nonsynonymous single-nucleotide polymorphism in *TNFAIP3* with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in the japanese population. *Arthritis Rheum.* 2010;62(2):574-579.

31. Zhu L, Wang L, Wang X, Zhou L, Liao Z, Xu L, et al. Characteristics of A20 gene polymorphisms and clinical significance in patients with rheumatoid arthritis. *J Transl Med.* 2015;13(1):1-10.
32. Moaaz M, Mohannad N. Association of the polymorphisms of TRAF1 (rs10818488) and *TNFAIP3* (rs2230926) with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus and their relationship to disease activity among Egyptian patients. *Cent Eur J Immunol.* 2016;41(2):165-75.
33. Wang MJ, Yang HY, Zhang H, Zhou X, Liu RP, Mi YY. *TNFAIP3* gene rs10499194, rs13207033 polymorphisms decrease the risk of rheumatoid arthritis. *Oncotarget.* 2016;7(50):82933-82942.
34. Rodríguez A, Maldonado K, López L, Ramírez J. Genética y genómica en artritis reumatoide (AR): una actualización. *Gac Med Mex.* 2016; 152(2):218-227.

16. Anexos



HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO

Dirección de Investigación y

SURPRCTEM/POSGRADO

Lista de Cotejo de Validación de Tesis de Especialidades Médicas

Fecha	01	julio	2022
	día	mes	año

INFORMACIÓN GENERAL (Para ser llenada por el área de Posgrado)					
No. de Registro del área de protocolos	SI	X	NO	Numero de Registro	HJM198/21-R
Titulo del Proyecto "EVALUACIÓN DE POLIMORFISMO rs59110799 DEL GEN IRF5 Y LA SUSCEPTIBILIDAD PARA PRESENTAR SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO EN PACIENTES MEXICANOS".					
Nombre Residente	DRA. CINTHIA JAHOSKA SAMURIA FLORES				
Director de tesis	DRA. ROSA ELDA BARBOSA COBOS				
Director metodológico	DRA. ISELA MONTUFAR ROBLES, DR. JULIÁN RAMÍREZ BELLO				
Ciclo escolar que pertenece	2021-2022	ESPECIALIDAD	REUMATOLOGIA		
INFORMACIÓN SOBRE PROTOCOLO/TESIS (Para ser validado por la División de Investigación/SURPRCTEM)					
VERIFICACIÓN DE ORIGINALIDAD	HERRAMIENTA	PLAGSCAN	PORCENTAJE	1%	
COINCIDE TÍTULO DE PROYECTO CON TESIS	SI	X	NO		
COINCIDEN OBJETIVOS PLANTEADOS CON LOS REALIZADOS	SI	X	NO		
RESPONDE PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	SI	X	NO		
RESULTADOS DE ACUERDO A ANALISIS PLANTEADO	SI	X	NO		
CONCLUSIONES RESPONDEN PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	SI	X	NO		
PRETENDE PUBLICAR SUS RESULTADOS	SI	X	NO		
VALIDACIÓN (Para ser llenada por el área de Posgrado)					
SI	X	Comentarios			
NO		MODIFICADO EL PROTOCOLO A UN SOLO POLIMORFISMO EN LUGAR DE LOS 3 INCLUIDOS EN EL PROTOCOLO INICIAL FERO ENTREGO ENMIENDA DE LAS MODIFICACIONES POR QUE FUERON ACEPTADAS			

Al Instituto Foridense de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, Col. Magdalena de las Salinas, CP. 07160, Alcá. Cuernavaca A.

