



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

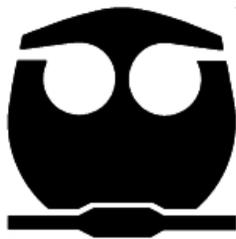
FACULTAD DE QUÍMICA

**“POLIMORFISMOS EN LOS GENES *PTPN22* Y *PDCD1* Y
SU ASOCIACIÓN CON LA SUSCEPTIBILIDAD A
DESARROLLAR ARTRITIS REUMATOIDE JUVENIL EN
POBLACIÓN MEXICANA”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

MIRNA EDITH MORALES MARIN



México, D.F.

2008.



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.

DEDICATORIA

A MIS PADRES, Gloria y Rodolfo, por siempre estar apoyándome incondicionalmente, sin ustedes no podría haber llegado hasta donde estoy, por ser mi motor para seguir adelante, por creer en mí y por su amor infinito, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por ser lo más grande que tengo.

A MIS HERMANAS, Aura y Anahi, por siempre dar lata y animarme cuando las cosas no iban tan bien, por escucharme en mis momentos de desesperación, por su cariño.

A MIS ABUELOS, por darme ánimo y por los buenos ratos.

A Carlos, por su apoyo y por ser mi compañero.

A MIS AMIGAS, Alma Liliana y Joanna, por su amistad incondicional.

A MIS MAESTROS.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lorena, mi más sincero agradecimiento por haberme dado la oportunidad de ser su alumna y ser mi guía, por su gran apoyo y por sacrificar un poco de su tiempo.

A Rafael, por ser mi maestro y ser el culpable de que haya llegado a este laboratorio.

A Emilio y Federico, por su gran apoyo, sus consejos y por hacerme ver mis errores.

A Yolanda, Lupita, Silvia, Julián, Tere V., Cesárea, Adriana, Karol, Lyssia, Humberto G. y Humberto G. Malacatt, por sus consejos, por tantos momentos amenos, por aceptarme y aguantarme.

A mis compañeros y amigos Velia, Jaime, Edgar, Katy H., Jessica, Arcelia, Adriana, y a todos los que en algún momento convivimos, por tantos momentos inolvidables en la Facultad.

A la Dra. Marisol López y la Dra. Alicia Cervantes por ser mis maestras y a todos los que fueron mis profesores.

A los integrantes del jurado por su apoyo y enseñanzas.

A la UNAM, por permitirme estudiar en la mejor escuela de Química en Latinoamérica.

INDICE

Dedicatoria	III
Agradecimientos	IV
Abreviaturas	VIII
Lista de figuras	IX
Lista de tablas	X
Resumen	1
Introducción	3
Enfermedades autoinmunes	3
Artritis reumatoide juvenil	3
Clasificación	3
ARJ sistémica	4
ARJ poliarticular	6
ARJ oligoarticular	6
Etiología y fisiopatología	7
Epidemiología	10
Diagnóstico	10
Tratamiento	11
ARJ y AR en adultos	11
Genética de enfermedades complejas	13
Bases genómicas	15
Polimorfismos en la región HLA	16
Otros genes dentro de la región HLA involucrados con ARJ	16
Polimorfismos no HLA	17
Proteínas tirosín-fosfatasas y la respuesta inmune	19
Estructura de las PTPs	21
PTPN22	21

	PDCD1	25
Justificación		31
Objetivo general		32
Objetivos		
particulares		32
Hipótesis		33
Materiales y		
métodos		34
	Población de estudio	34
	Muestras	34
	Extracción de DNA	36
	Verificación de la DNA	36
	Repurificación del DNA	36
	Cuantificación del DNA con el instrumento	
	Nanodrop	37
	Análisis molecular	38
	Genotipificación de SNPs	38
	Análisis por RFLPs	38
	Método fluorescente de 5' exonucleasa Taqman	
	42
	Diseño de oligonucleótidos y sondas específicas	
	47
	Análisis estadístico	48
	Ubicación del estudio	48
Resultados		49
	Pacientes y controles	49
	Integridad del DNA	49

	Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg	52
	Análisis de los SNPs de los genes <i>PTPN22</i> y <i>PDCD1</i>	52 53
Discusión		56
Conclusiones		65
Lista de reactivos		68
Bibliografía		69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Articulación normal y articualción con ARJ-----	9
Figura 2.	Regulación de la activación de Lck -----	23
Figura 3.	Estructura y localización de la proteína <i>PD-1</i> -----	27
Figura 4.	Estructura del gen <i>PDCD1</i> -----	30
Figura 5.	Esquema del análisis por RFLPs -----	37
Figura 6.	Reacción Taqman -----	43
Figura 7.	Gráfica de discriminación alélica -----	44
Figura 8.	Representación del número de pacientes femeninos y masculinos-----	48
Figura 9.	Integridad del DNA en geles de agarosa -----	49
Figura 10.	Identificación del genotipo por RFLPs -----	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación de la artritis crónica en niños por las diferentes escuelas-----	5
Tabla 2.	Incidencia y prevalencia de ARJ en diferentes poblaciones -----	12
Tabla 3.	SNPs de los genes <i>PTPN22</i> y <i>PDCD1</i> analizados ---	51
Tabla 4.	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C1858T de <i>PTPN22</i> encontradas en la muestra -----	52
Tabla 5.	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo PD1.1 (G/A) de <i>PDCD1</i> encontradas en los casos y en los controles -----	54
Tabla 6.	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo PD1.3 (G/A) de <i>PDCD1</i> encontradas en la muestra -	54
Tabla 7.	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo PD1.5 (C/T) de <i>PDCD1</i> encontradas en la muestra --	56
Tabla 8.	Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo PD1.6 (G/A) de <i>PDCD1</i> encontradas en la muestra --	56
Tabla 9.	Enfermedades asociadas con <i>PTPN22</i> en diferentes poblaciones -----	60
Tabla 10.	Enfermedades asociadas con los SNPs presentes en <i>PDCD1</i> en diferentes poblaciones -----	62

RESUMEN

Las enfermedades autoinmunes son un serio problema de salud pública por su alto costo socio-económico al afectar alrededor del 4-5% de la población mundial. La Artritis Reumatoide Juvenil (ARJ) es la enfermedad reumática más común en la infancia, afectando al 1% de los niños, con una prevalencia de 80-100 / 100 000 y una incidencia de 8-10 / 100 000. La podemos definir como una inflamación de las articulaciones caracterizada por dolor, hinchazón y aumento de la temperatura. Es una enfermedad autoinmune donde se producen citocinas tipo Th-1 y autoanticuerpos en los tejidos afectados, lo que desencadena una artropatía destructiva. A diferencia de la artritis en el adulto (AR), la cual tiene un comportamiento clínico más homogéneo, la ARJ aparece antes de los 16 años de edad y presenta gran heterogeneidad clínica.

Aunque las causas de la enfermedad son desconocidas, se sabe que su etiología se debe tanto a factores genéticos complejos que involucran la participación de múltiples genes relacionados con la inmunidad y la inflamación como a factores ambientales. Diversos estudios en pares de hermanos afectados apoyan la existencia del componente genético en la etiología de la enfermedad. Entre los genes que han sido estudiados y asociados a la ARJ se encuentran principalmente dos grupos, los del primero relacionados con el Antígeno Leucocitario Humano (HLA) y los del segundo grupo que incluyen diversos genes (no HLA) como los de citocinas pro y antiinflamatorias, moléculas coestimuladoras, entre otros. Sin embargo, algunas de estas asociaciones no han sido reproducidas en todas las poblaciones debido probablemente a la heterogeneidad genética, a la estratificación de la población que puede

presentarse en estudios de casos y controles o por que el tamaño de la muestra es insuficiente.

La relevancia de estos estudios estriba en el hecho de que permiten conocer los factores que participan en la etiología de esta enfermedad para entender su patogénesis y mejorar las estrategias preventivas de diagnóstico y tratamiento para mejorar la calidad de vida del paciente con ARJ.

En este trabajo, se estudiaron dos genes *PTPN22* Y *PD-1*, que se ha reportado tienen diferentes polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) a lo largo de su secuencia y que se ha visto desempeñan un papel importante en la etiología de diversas enfermedades autoinmunes. El SNP de *PTPN22* estudiado que produce el cambio de un aminoácido en la proteína, en este estudio, no se encuentra asociado a ARJ. Los cuatro SNPs del gen *PD-1* tampoco muestran una asociación con ARJ en niños mexicanos.

INTRODUCCIÓN

ENFERMEDADES AUTOINMUNES

En la actualidad las enfermedades autoinmunes son un serio problema de salud pública ya que afectan alrededor del 4-5% de la población general (Wandstrat y Wakeland, 2001).

El inicio de la autoinmunidad ocurre cuando se pierde la tolerancia a antígenos propios. En la mayoría de las enfermedades autoinmunes no se conoce con certeza su etiología, ya que el origen es multifactorial, es decir, participan tanto factores genéticos y factores ambientales, lo que hace más complejo su estudio (Christen y von Herrath, 2004).

ARTRITIS REUMATOIDE JUVENIL

La Artritis Reumatoide Juvenil (ARJ) es la enfermedad reumática más común de la infancia caracterizada por inflamación articular persistente (crónica), artralgiás, edema y limitación de la movilidad de la articulación que comienza antes de los 16 años de edad (Gare et al, 1999).

Clasificación

Actualmente se utilizan tres clasificaciones para los pacientes de menos de 16 años con artritis crónica (tabla 1): la del Colegio Americano de Reumatología (American College of Rheumatology, ACR) (Brewer *et al*,

1977), la de la Liga Europea Contra el Reumatismo (European League Against Rheumatism, EULAR) y la de la Liga Internacional de Asociaciones de Reumatología (International League of Associations for Rheumatology, ILAR) (Petty *et al*, 1998). Ninguna de las clasificaciones incluye todas las características, ya que algunos pacientes cumplen los criterios para más de un subtipo, mientras que otros son difíciles de clasificar dentro de un subgrupo específico.

En este trabajo se clasificaron los pacientes por los criterios de la ACR, la cual divide a la ARJ en artritis sistémica, artritis poliarticular y artritis oligoarticular, según sus características clínicas. La diferencia entre ellas consiste en la persistencia o ausencia de síntomas sistémicos como la fiebre, erupción en la piel y pericarditis (sistémica); en el número de articulaciones afectadas (oligoarticular y poliarticular).

ARJ sistémica

La ARJ sistémica afecta a varios órganos del paciente y el número de articulaciones implicadas puede ser variable. Las características de esta son hipertermia en picos, frecuentemente acompañada de una erupción cutánea color asalmonado, mialgias, hepato-esplenomagalia, el crecimiento de los ganglios linfáticos, así como pericarditis y pleuritis. Afecta a niños de cualquier edad.

En aproximadamente la mitad de los pacientes, los síntomas más característicos son sistémicos, el pronóstico a largo plazo tiende a ser bueno. En la otra mitad los síntomas sistémicos tienden a desaparecer con el tiempo, pero la afección de las articulaciones se hace más importante.

Tabla 1. Clasificación de la artritis crónica en niños por las diferentes escuelas (Weiss y Ilowite, 2005).

ACR JRA (1977)	EULAR JCA (1978)	ILAR JIA (1997)
Sistémica Poliarticular Pauciarticular	Sistémica Poliarticular JRA Pauciarticular Artritis con Psoriasis	Sistémica Poliarticular RF-negativo Poliarticular RF-positivo Pauciarticular: persistente extendida Artritis relacionada con psoriasis Artritis relacionada con entesitis Otras

En la minoría de los pacientes, los síntomas sistémicos persisten a la vez que la artritis.

La forma sistémica comprende del 10 al 20% de todos los casos de ARJ (Weiss y Ilowite, 2005).

ARJ poliarticular

Se caracteriza por la presencia de artritis en 5 o más articulaciones y por la ausencia de los síntomas sistémicos en los 6 primeros meses de la enfermedad. La forma poliarticular con factor reumatoide (FR) positivo no es muy común, se presenta en menos del 5% de todos los niños con ARJ. En varios casos se manifiesta como artritis simétrica que afecta principalmente a las articulaciones pequeñas de las manos y de los pies para luego extenderse a otras y por lo regular comienza después de los 10 años de edad.

ARJ oligoarticular

Se caracteriza por la presencia de artritis en menos de 5 articulaciones y la ausencia de síntomas sistémicos en los primeros seis meses de la enfermedad. Afecta a las grandes articulaciones como las rodillas y los tobillos de forma asimétrica. Algunas veces sólo afecta una articulación (forma monoarticular). En algunos pacientes el número de articulaciones afectadas aumenta a 5 o más después de los primeros 6 meses, lo que se denomina oligoartritis extendida.

La oligoartritis aparece generalmente antes de los 6 años de edad, el pronóstico suele ser bueno cuando la enfermedad se limita a pocas articulaciones, pero es variable cuando la enfermedad se extiende a más articulaciones.

Una proporción considerable de estos pacientes desarrolla una complicación ocular importante, uveítis, que es la inflamación de la parte anterior de la úvea. La úvea es una capa que tapiza el interior del ojo y contiene los vasos sanguíneos que le aportan la sangre. Dado que la parte anterior de la úvea está formada por el iris y el cuerpo ciliar, esta complicación se denomina tanto uveítis anterior crónica como iridociclitis crónica. Este padecimiento se debe diagnosticar y tratar adecuadamente evaluando al paciente cada 3 meses por el oftalmólogo, ya que puede progresar y dañar el ojo, pues no puede ser detectada ya que el ojo no se pone rojo y el paciente no se queja de visión borrosa.

La oligoartritis es la forma más frecuente de ARJ (50% de los casos totales). La forma de anticuerpos antinucleares (ANA) positivo combinada con uveítis es una enfermedad característica de niños que no se observa en adultos (Weiss y Ilowite, 2005).

Etiología y fisiopatología

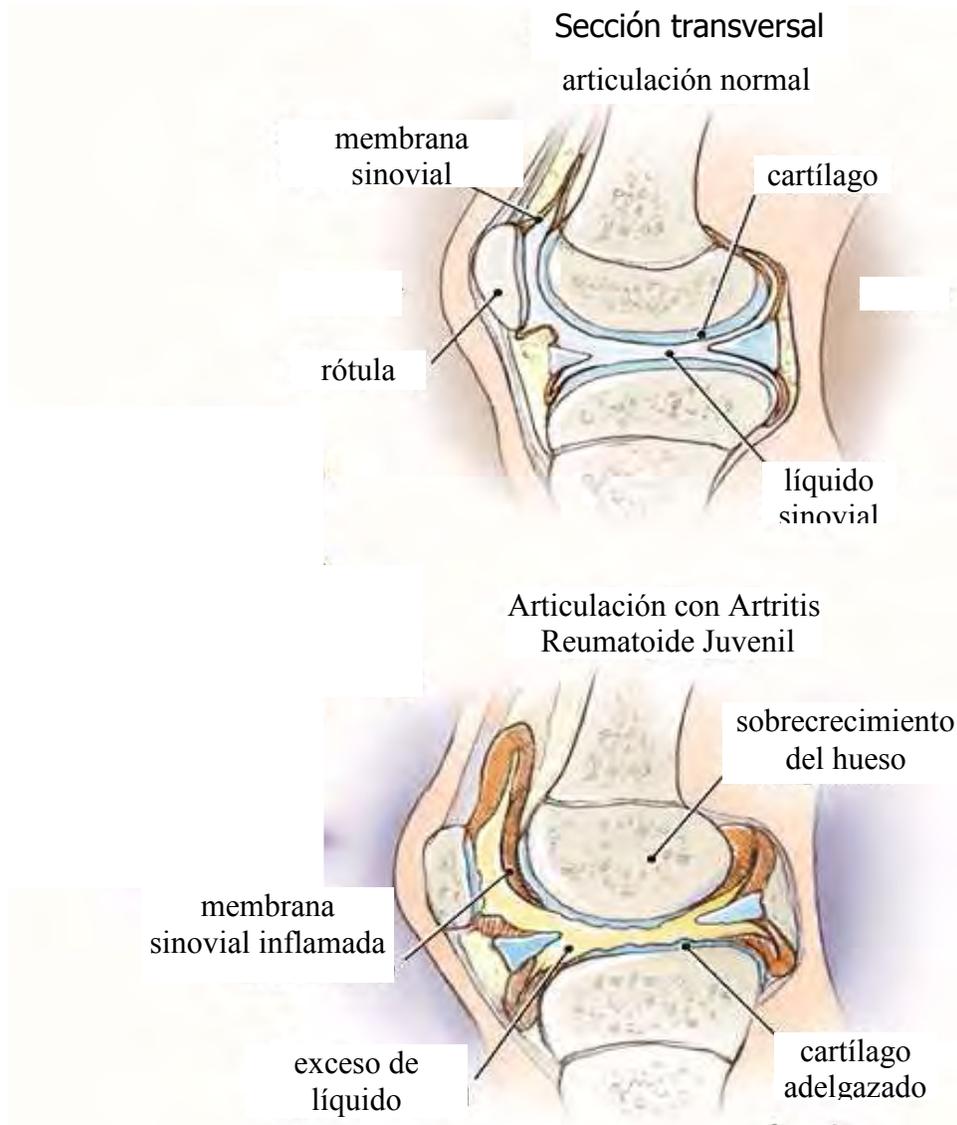
Aunque las causas de esta enfermedad son desconocidas, la ARJ es una patología compleja que involucra la participación tanto de múltiples genes relacionados con la inmunidad y la inflamación como del medio ambiente. Algunas hipótesis indican que la artritis puede ser disparada en un individuo predispuesto genéticamente por factores tales como el estrés psicológico, niveles anormales de hormonas, traumatismos de articulaciones o infecciones tanto virales como bacterianas. Varios estudios (Whitton y Fujinami, 1999) han implicado a la rubéola, virus de

Epstein-Barr, retrovirus, virus de la hepatitis C, parvovirus B19, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma*, *Proteus* y *Helicobacter pilori* como posibles causas de ARJ. Por ejemplo, el virus de la rubéola persiste en los linfocitos y establece un foco de infección persistente en el sinovio dando como resultado una inflamación crónica, aunque estas hipótesis no han sido comprobadas en la etiología de la enfermedad.

En las articulaciones la membrana sinovial que cubre el interior de la articulación habitualmente es muy delgada. Al inflamarse se engrosa y se llena de células inflamatorias, por lo que aumenta la cantidad de líquido sinovial produciendo inflamación, dolor y reducción de la movilidad. Esto provoca rigidez con largos periodos de inmovilidad. A largo plazo esto puede causar la liberación de distintas sustancias que causan la erosión destructiva del cartílago y del hueso. Los pacientes con ARJ suelen tomar la posición antiálgica, que es semiflexionada para reducir el dolor. A la larga puede causar atrofia muscular y estiramiento o retracción de los músculos y tejidos blandos alrededor de la articulación y una deformidad en la flexión (Figura 1).

Existen evidencias de una desregulación inmunológica en ARJ. La activación del complemento y su consumo promueven la inflamación y los niveles incrementados de inmunocomplejos circulantes en suero están asociados con la enfermedad activa. Los anticuerpos antinucleares (ANA) se encuentran en aproximadamente 40% de los pacientes con ARJ, especialmente en mujeres jóvenes con artritis pauciarticular (Petty *et al*, 1973). Aproximadamente del 5 al 10% de los pacientes con ARJ son FR positivo (Lang y Shore, 1990).

Los linfocitos T mediadores de la respuesta inmune están involucrados en la inflamación crónica y las células T son las células mononucleares predominantes en el líquido sinovial (Mangge y Schauenstein, 1998). Los pacientes con ARJ tienen niveles elevados en suero de interleucina (IL)-1, IL-2, IL-6 y del receptor-IL-2 ® y niveles elevados



Tomado y modificado de www.adam.com, 2005

Figura 1. Arriba: sección transversal de la articulación normal de un infante. Abajo: sección transversal de una articulación de un infante con ARJ.

de IL-1 β , IL-6 e IL-2R en el fluido sinovial, lo que sugiere un perfil Th1 (Moore, 1999). Niveles incrementados en suero de IL-6, IL-2R y receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) correlacionan con parámetros inflamatorios, como la proteína C- reactiva en pacientes ARJ con enfermedad activa (Mangge y Schauenstein, 1998).

Epidemiología

El diagnóstico de ARJ se realiza en niños menores de 16 años de edad que presentan inflamación de las articulaciones al menos por seis semanas.

La incidencia de ARJ es de 3.5-22.6 por cada 100,000 individuos con una prevalencia de 20 a 400 por cada 100,000 individuos, estas cifras son variables entre poblaciones (tabla 2) (Gare BA 1999; Prieur AM et al 1987; Moe N et al 1988).

Diagnóstico

El diagnóstico se realiza cuando la artritis se manifiesta antes de los 16 años por más de seis semanas. El diagnóstico se realiza principalmente al evaluar las manifestaciones clínicas mediante historia clínica y exploración física para clasificar el tipo de ARJ y se complementa con algunas pruebas de laboratorio principalmente como son el factor reumatoide, anticuerpos antinucleares y HLA-B27; otras pruebas que pueden ser útiles son la velocidad de sedimentación globular, proteína C reactiva, biometría hemática, enzimas hepáticas, examen general de orina y exámenes radiológicos.

Tratamiento

El manejo del niño que padece artritis en cualquiera de sus variantes debe ser dirigido para cumplir los siguientes objetivos:

- Aliviar el dolor
- Mantener una buena función articular
- Prevenir las complicaciones y deformaciones por medio de rehabilitación
- Asegurar un desarrollo psicológico y físico normales

Los fármacos ahora utilizados para el tratamiento de la enfermedad se dividen en cinco grupos:

1. Ácido acetilsalicílico y otros antiinflamatorios no esteroideos
2. Corticoides
3. Fármacos antirreumáticos
4. Inmunosupresores
5. Terapias experimentales

Artritis reumatoide juvenil y artritis reumatoide (AR) en adultos

Las artropatías crónicas en la infancia comparten características clínicas y patológicas con la AR en adultos, como el daño articular persistente y erosión ósea, la producción de autoanticuerpos y citocinas de tipo Th1 en los tejidos afectados, lo que conlleva a una artropatía destructiva (Vyse y Todd, 1996). Las dos comparten marcadores genéticos en común con otras enfermedades autoinmunes, que han mostrado ligamiento y asociación con HLA (del inglés human leucocyte antigen). La ARJ se caracteriza por diferentes subtipos, mientras que la AR es más

Tabla 2. Incidencia y prevalencia de ARJ en diferentes poblaciones.

Población	Incidencia (por cada 100,000 habitantes)	Prevalencia (por cada 100,000 habitantes)	Referencia
Japonesa	83	No descrita	Fujicawa y Okuni, 1997
Finlandesa	19.5	No descrita	Kaipianen Seppanen, 1995
Noruega	22.6	148.1	Moe y Rygg, 1998
Turca	No descrita	64	Ozen 1998
Alemana	3.5	20	Klessling et al, 1988
Australiana	No descrita	400	Manners et al, 1998
Costarricense	6.8	34.9	Arguedas, 1998
Estadounidense	11.7	86.1	Peterson et al, 1993

homogénea pues se dice que es una sola enfermedad con diferentes manifestaciones. Los pacientes con AR tienen una historia familiar más común, pudiéndose encontrar en pedigríes extensos con hermanos afectados mientras que en ARJ estos pedigríes son raros, aunque ambas comparten una frecuencia alta en cuanto a otros padecimientos autoinmunes. Los marcadores genéticos para los diferentes subtipos de ARJ difieren considerablemente de los de AR, principalmente los de HLA, demostrándose así que los factores inmunogenéticos involucrados en la susceptibilidad para estas dos enfermedades son diferentes. Con respecto a otros genes estudiados sucede algo similar (Prahalad *et al*, 2000a).

Numerosos estudios han reportado una incrementada mortalidad en pacientes con AR presentando infecciones, enfermedades pulmonares y renales, sangrado gastrointestinal como principales causas de muerte. Los pacientes con ARJ aparentemente tienen un mejor curso de la enfermedad que los pacientes con AR (Pincus y Callahan, 1992).

La ARJ es mucho menos frecuente que la AR, en Estados Unidos se reporta una prevalencia de AR de 10/1000, mientras que en ARJ apenas de 0.86/1000.

GENÉTICA DE ENFERMEDADES COMPLEJAS

La mayoría de las malformaciones congénitas y enfermedades comunes son el resultado de la interacción de un conjunto de genes y factores ambientales. En las enfermedades autoinmunes, se ha visto que el MHC tiene un efecto importante sobre su etiopatogenia, sin embargo, hasta la fecha se han descrito pocos genes no HLA y su contribución individual

es muy pequeña. Por esta razón se han ideado estrategias para poder estudiarlos. Para el mapeo genético de las enfermedades complejas se utilizan dos estrategias, el análisis de ligamiento y los estudios de asociación, que nos sirven para identificar tanto regiones genéticas específicas como genes involucrados en la patología.

Los estudios de asociación comparan las frecuencias de un marcador entre casos no relacionados y controles e investigan su co-ocurrencia simultánea con la enfermedad a nivel de la población. Una asociación significativa del marcador con la enfermedad sugiere un gen candidato en la etiología de la misma.

En estos estudios los marcadores genéticos de elección para el mapeo de genes son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Estos son la fuente más común de variación genética en el ser humano y se estima que en promedio existe un SNP cada 500 nucleótidos (Kim y Misra, 2007).

La estrategia más eficaz en el mapeo de genes está enfocada al análisis de polimorfismos en genes candidatos que codifican para proteínas cuya función es conocida y tienen un efecto potencial en el fenotipo de la enfermedad.

En el estudio de los SNPs debemos tomar en cuenta su efecto potencial. Se pueden clasificar en dos: los SNPs codificantes y los SNPs no codificantes. Los codificantes (cSNP) pueden ser subdivididos de acuerdo al efecto que provocan, ya sea en la secuencia o la estructura de una proteína. Los no codificantes (ncSNP) pueden subdividirse de acuerdo a si se localizan o no en regiones reguladoras de los genes. Si sumamos los efectos de los cSNP y de los ncSNP en conjunto producen variaciones genéticas con un efecto potencial en el fenotipo (Kim y Misra, 2007).

BASES GENÓMICAS

Los estudios de asociación y ligamiento son utilizados para identificar las variantes genéticas que influyen en las enfermedades complejas. Los estudios de asociación comparan individuos afectados no relacionados e individuos no afectados dentro una población. De este modo, un alelo en un locus de interés se encuentra asociado con un rasgo si este aparece en una frecuencia significativamente más alta entre los individuos afectados (casos) comparado con los individuos control (Lander y Schork, 1994).

La ARJ es un padecimiento poco común y los estudios en gemelos y en familias han sido muy valiosos para determinar el componente genético de la enfermedad. En estos estudios se ha determinado una alta concordancia en gemelos monocigotos comparada con los gemelos dicogotos (Prahalad *et al*, 2000b). Se ha propuesto que la concordancia es del 30-40% en gemelos monocigotos y el riesgo estimado es de 250-400 veces más que la población en general (Baum y Fink, 1968). Así también el riesgo de recurrencia de los hermanos (λ_s) es de 15, similar a lo reportado para la diabetes tipo-1 y la esclerosis múltiple, aunque este valor es probablemente variable entre los subgrupos. Por lo tanto, los hermanos de un paciente con ARJ usualmente debutan con el mismo tipo de ARJ, respaldando una base genética para la enfermedad; diferentes tipos del inicio de ARJ entre hermanos quizá representan diferentes enfermedades (Prahalad *et al*, 2000b).

Un análisis extenso del genoma reportado para ARJ donde se utilizaron 121 familias multiplex y 384 microsatélites, permitió la identificación de múltiples regiones de susceptibilidad, en donde las regiones con un LOD score >1.0 fueron reportadas. De éstas, 17 loci resultaron de

interés ($LOD > 1.5$), las cuales posteriormente fueron descritos y relacionados con ARJ (Thompson *et al*, 2004).

En Finlandia se realizó un estudio con 41 familias con 88 hermanos afectados, cuyas muestras fueron colectadas durante 15 años. Se estimó un $\lambda_s 20$ (Savolainen *et al*, 2000). Estas son evidencias contundentes acerca de la participación de los factores genéticos en esta enfermedad compleja.

Polimorfismos en la región HLA

Varios estudios genéticos se han enfocado en entender la contribución de los polimorfismos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la susceptibilidad de la ARJ. La región MHC localizada en el cromosoma 6, contiene más de 200 genes (The MHC Sequencing Consortium), muchos de los cuales son esenciales en el sistema inmune, incluyendo genes codificando el HLA. Estudios de asociación y ligamiento entre variantes HLA y AIJ son bien reconocidos y se ha observado que, la ARJ es influenciada tanto por alelos de HLA clase I como por alelos clase II.

Otros genes dentro de la región HLA involucrados en la ARJ

Los genes *TAP* codifican para la proteína transportadora que libera péptidos desde el citosol a través del retículo endoplásmico membranoso a las moléculas HLA clase I. Se ha encontrado que en pacientes con ARJ hay un incremento de los alelos TAP1b y TAP2c en comparación con individuos controles (Ploski *et al*, 1994).

Los genes *LMP* codifican para una subunidad proteosómica, la cual se encuentra involucrada en la degradación de proteínas citoplasmáticas en péptidos que se unen a las moléculas HLA clase I. En algunas poblaciones se ha encontrado que los polimorfismos de *LMP2* contribuyen al desarrollo de uveitis anterior aguda (Maksymowych *et al*, 1997).

Los genes del factor de necrosis tumoral (TNF) se localizan en la región HLA clase III. El TNF es una citosina proinflamatoria que participa en la patogénesis de ARJ (Grom *et al*, 1996). Los polimorfismos en la región promotora del gen de TNF, parecen ser un factor de predisposición para desarrollar ARJ sistémica.

Polimorfismos no-HLA

Además de las numerosas asociaciones entre ARJ y las variantes HLA, se han asociado otros polimorfismos no-HLA, es decir, loci dentro y fuera de la región del MHC influyen en el riesgo genético para la ARJ.

Así, genes involucrados en la respuesta inmune fueron analizados en 200 pacientes con AR y ARJ y 400 controles (Milterski *et al*, 2004). Uno de los SNPs que se encontró asociado con AR y ARJ fue el -318 (G/T) del gen *CTLA4*, después de la corrección para múltiples comparaciones. Este SNP también se ha visto asociado con granulomatosis de Wegener y diabetes mellitus tipo I (McCormack *et al*, 2001; Giscoombe *et al*, 2002).

Otro gen que juega un papel fundamental en el desarrollo de autoinmunidad inducida experimentalmente, es el factor de inhibición de migración de macrófagos (*MIF*). En este gen se ha descrito un SNP en la posición -173 G/C asociado con ARJ (Donn *et al*, 2001). La

relevancia funcional del polimorfismo fue analizado en 136 pacientes con ARJ sistémica. Los pacientes portadores del alelo *MIF* -173C tienen significativamente niveles aumentados de *MIF* en el suero y líquido sinovial, en comparación con los pacientes con el genotipo GG. Estos pacientes portadores del alelo *MIF* -173C requieren corticosteroides en altas dosis y por largos periodos, presentan una respuesta más corta a los corticosteroide intra-articulares y tienen varias articulaciones con artritis activa, sugiriendo que el alelo *MIF*-173C es un marcador de pobre pronóstico en ARJ sistémica (McDowell *et al*, 1995).

La interleucina-6 (IL-6) es otra citosina proinflamatoria que se encuentra elevada en pacientes pediátricos con ARJ sistémica (Fishman D *et al* 1998). Se ha encontrado una asociación de la variante -174 con ARJ sistémica, en tres diferentes poblaciones (Estados Unidos, Inglaterra y Francia) (Ogilvie *et al*, 2003).

A las diferentes isoformas de IL-1, se les encontró un polimorfismo relacionado fuertemente con la ARJ pauciarticular temprana en pacientes noruegos (McDowell TL *et al* 1995). La IL-10 es la que más se ha relacionado con la forma más grave de ARJ con un inicio pauciarticular que más adelante se extiende y se torna poliarticular.

Existe un polimorfismo funcional de repetidos en la región promotora (<150 kb) en el gen 1 de la proteína natural resistente asociada a macrófago (*NRAMP1*) da susceptibilidad para ARJ y se reporta que tiene un efecto aditivo con los genes *HLA-DQ* (Sanjeevi *et al*, 2000).

El factor 1 regulador de interferón (IRF-1) presenta un polimorfismo en la región 3' no traducible (3'UTR) relacionada con ARJ de etiología viral (Donn *et al*, 2001).

Otros marcadores que han sido estudiados por medio de la tipificación de SNPs, sin haberse encontrado asociación exceptuando el primero son TNFa (microsatélite), *TNFA* (-238A/G, -308A/G, -857C/T), *TNFR1* (-609G/T, P12P), *TNFR2* (del15), *PTPRC* (P57P), *IFN-γ* (microsatélite),

D17S795, D17S807, D17S1821, *IL-13* (R110Q), AnTn tracto en ARJ sistémica. Estos estudios se han realizado en población alemana, turca, kuwaiti, estadounidense, inglesa y francesa, pero no en latinoamericana (Haas *et al*, 1994; Prahalad *et al*, 2004).

La extensión de y cuales genes no-HLA contribuyen a la patogénesis de ARJ aún no está clara. En general, el riesgo relativo que otorgan estos genes para padecer ARJ son bajos, por lo que ha sido complicado establecer la relación de estas asociaciones con la patogénesis de la enfermedad. De hecho, algunos estudios de asociación caso-control no han sido tan reproducibles como los estudios de asociación con HLA. Por lo tanto, estudios con pacientes con un cuadro clínico más homogéneo son necesarios para confirmar la importancia de los genes no-HLA en la patogénesis de la ARJ.

El conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad es una herramienta para buscar genes candidatos. También los estudios de ligamiento pueden identificar regiones cromosómicas que frecuentemente contienen varios genes.

Proteínas tirosín-fosfatasa y la respuesta inmune

Los genes de las proteínas-tirosin-fosfatasa (PTPs) codifican para distintas proteínas que defosforilan diversas moléculas involucradas en mecanismos regulatorios para numerosos aspectos importantes de la fisiología de células eucariontes (Mustelin, 2005). Estas proteínas pueden tener diversas funciones, como son transducción de señales y regulación de diversos procesos entre los que se puede mencionar proliferación, diferenciación, muerte, activación de la transcripción, motilidad celular y morfología, transporte de moléculas dentro y fuera

de la célula, entre otros. La fosforilación puede también determinar la duración de los procesos y su coordinación entre células vecinas a través de mediadores solubles y directamente por contacto célula-célula, por ejemplo como en el sistema inmune (Mustelin *et al*, 2003). Las PTPs defosforilan residuos de tirosina, mientras que las protein-tirosin-cinasas (PTKs) los fosforilan. La modificación que realizan las PTPs en sus proteínas blanco es la fosforilación de serina-treonina o residuos de tirosina. La fosforilación puede regular la actividad catalítica, localización subcelular, asociación física con sustratos o reguladores o su estabilidad (Mustelin *et al*, 2005).

Las células del sistema inmune (SI) son las que más han mostrado actividad en cuanto a fosforilación de proteínas en sus residuos de tirosinas. Se ha descrito que cambios drásticos en la fosforilación de tirosinas, afectan la activación del antígeno-receptor de linfocitos, la expresión de citocinas y respuesta a otros estímulos se ven afectados.

Las PTPs tienen dos papeles fundamentales importantes: 1) el mantenimiento del fenotipo del linfocito y 2) la verificación de linfocitos activados para pasar a un estado de reposo después de la terminación de una respuesta inmune (Earp *et al*, 1984). Adicionalmente se ha visto que las PTPs se encuentran en la membrana de los linfocitos o muy cerca de ella y participan en la regulación de señalización transmembranal (Gjorloff-Wingren *et al*, 2000).

Ya que la fosforilación de proteínas está involucrada en muchos y diversos procesos fisiológicos, parece claro que numerosas PTPs encontradas en células inmunes participan en la regulación de estos procesos (señalización de receptores para inmunoglobulinas, complemento, componentes de la matriz extracelular y citocinas) (Mustelin *et al*, 2005).

Estructura de PTPs

Cada PTP tiene un dominio catalítico para una secuencia de aminoácidos en particular de cada sustrato, la cual genera la topografía y la distribución de la carga que interactúa con la superficie de la PTP y rodea al sitio catalítico. Se ha observado que las regiones no catalíticas de las PTPs participan en la regulación de la actividad de fosfatasa mediante mecanismos de plegamiento impidiendo la unión del sustrato (Hof *et al*, 1998). A su vez, la activación de las PTPs es a través de la fosforilación de residuos de serina-treonina o tirosina. La fosforilación en estas moléculas puede regular su actividad catalítica, localización subcelular, asociación física con sustratos o reguladores, y su estabilidad (Mustelin *et al*, 2005).

PTPN22

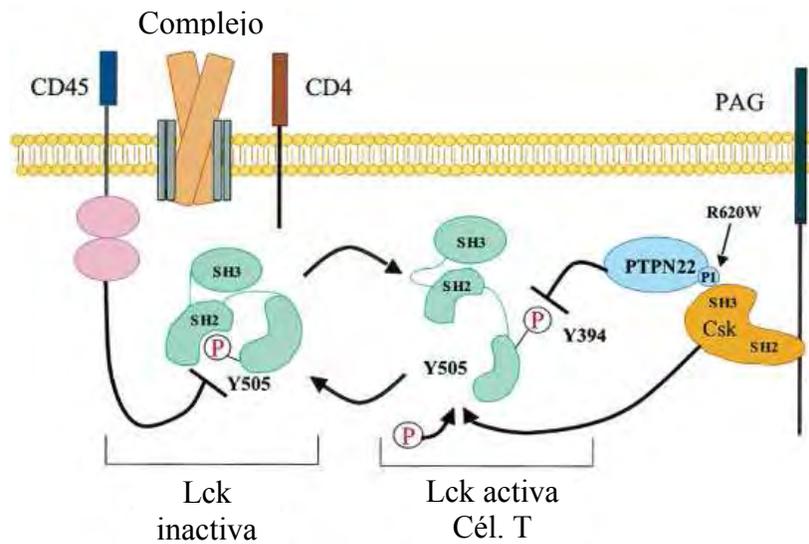
Después del MHC esta tirosín-fosfatasa intracelular ha emergido como la propuesta más fuerte para conferir riesgo genético para autoinmunidad (diabetes tipo I, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y enfermedad de Graves) principalmente en poblaciones con ancestros europeos (Gregersen, 2005).

Esta proteína se expresa en tejidos hematopoyéticos, timo, riñón y médula ósea. Diversos trabajos muestran que PTPN22 se encuentra principalmente en el interior de las células T, también se ha descrito su presencia en otros tipos celulares como células B, monocitos, células NK y neutrófilos (Cohen *et al*, 1999).

El gen *PTPN22* se encuentra en el brazo corto del cromosoma 1 en la región 1p13.1-p13.3. Está compuesto por 38.75 kb y 16 exones y codifica para una proteína tirosin-fosfatasa no-receptora tipo-22, llamada LYP (fosfatasa de linfocitos), la cual contiene un dominio con actividad de fosfatasa N-terminal y un dominio no catalítico C-terminal rico en prolina. Dentro de los diversos SNPs contenidos en el gen *PTPN22* se encuentra el SNP C1858T el cual conduce al cambio de una arginina por un triptofano en la posición 620 (Arg620Trp) de la proteína. No se sabe claramente como este SNP puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de auto-anticuerpos *per se* o confiere riesgo para la progresión de la enfermedad después de la aparición de los mismos. No se asocia con enfermedades en las cuales los auto-anticuerpos no son una característica prominente. A continuación se explicará cuál es la función de esta proteína a nivel molecular.

Se ha visto que *PTPN22* se une a una tirosín-cinasa intracelular (Csk). Esta unión ocurre en un sitio SH3 rico en prolina de *PTPN22*, interactuando con el dominio SH3 de Csk. Estas moléculas actúan en conjunto para inactivar a Lck, una familia de cinasas Src, que está involucrada en eventos de señalización temprana de células T. Csk actúa para fosforilar a la tirosina 505 (un fosfato inhibitorio para Lck), mientras que *PTPN22* actúa para remover el fosfato activado en la tirosina 394. El efecto combinado de estas dos actividades es convertir Lck a una configuración inactiva y de esta manera inhibir la activación del linfocito T. Esta se piensa es la función de *PTPN22* en condiciones normales como se muestra en la figura 2 (Gregersen y Batliwalla, 2005).

El polimorfismo R620W se localiza en el sitio de unión de SH3 de *PTPN22*. Se ha observado que el triptófano rompe la unión de *PTPN22* con la Csk. Por lo tanto, este alelo puede ser el responsable de causar



Tomado y modificado de *Arthritis and Rheumatism*
(Gregersen y Batliwalla, 2005)

Figura 2. Regulación de la activación de Lck. Lck (en verde) está involucrada en eventos de señalización temprana de células T y se mantiene en estado inactivo por la fosforilación (P) de la tirosina C-terminal 505 (Y505), lado izquierdo. En este modelo, la defosforilación de Y505 causa un cambio conformacional en Lck, resultando en la fosforilación de un residuo activador de tirosina Y394, lo que activa a Lck, lado derecho. *PTPN22* une a la tirosina cinasa Csk vía un sitio rico en prolina SH3. Esta unión se piensa que permite la colocalización de *PTPN22* a Lck, defosforilación de Lck Y394 y regresa a Lck a un estado inactivo, con la refosforilación de Y505 por Csk.

cambios en la regulación de Lck y por lo tanto provocar una deficiencia en la regulación negativa de la señalización del receptor de células T. Es preciso aclarar que este polimorfismo no elimina por completo las funciones de PTPN22, pues incluso los homocigotos no presentan un fenotipo como los de los ratones *knock-out*. Es posible que este polimorfismo produzca un cambio en nivel de efectividad de PTPN22 en compartimientos celulares particulares. Con todo esto podemos decir que una unión defectuosa de Lyp a Csk dará como resultado menores umbrales para la activación de células T, y en conjunto una actividad incrementada del sistema inmune y por lo tanto un mayor potencial para desarrollar una respuesta autoinmune (Hinks *et al*, 2006).

En estudios donde se utilizan ratones *knock-out* para este gen se ha observado que tienen anomalías como la elevación de autoanticuerpos y expansión de un subconjunto de células T de memoria (Hasegawa *et al*, 2004). Esta elevada actividad del SI se acompaña con cambios en la fosforilación de las PTPs que regulan los eventos próximos a los receptores de células T señalizando y reflejando en parte los blancos de PTPN22 conocidos. En años anteriores se relacionaba el SNP ya mencionado con la pérdida de la función de la proteína, pero ahora se propone que esta actividad está incrementada y esto es lo que confiere riesgo a desarrollar autoinmunidad (Gregersen, 2005) En un estudio realizado por (Vang *et al*, 2005), se documenta que la variante de LYP con Trp620, produce una ganancia de función de la PTP. Esto sugirió que en un modelo simple de autoinmunidad las células T con defectos que aumentan la señalización del receptor de células T (TCR) probablemente, causarían la enfermedad. Además la actividad incrementada de LYP-Trp620 para inhibir la señalización de TCR, podría desencadenar en una señalización más débil y por lo tanto una falla para eliminar células T autorreactivas durante la selección tímica o una actividad insuficiente de células T reguladoras (T_{reg}).

Se han planteado dos hipótesis acerca de la función de PTPN22: 1) cambios en el umbral de selección tímica y producción de células T maduras con un elevado potencial de autorreactividad, así un incremento en la actividad de *PTPN22* aumentará el umbral requerido para una adecuada señalización de TCR en el desarrollo de timocitos, resultando en una pobre selección negativa (deleción) de células T autorreactivas, y 2) una posible desregulación de células T_{reg}. Estas células son el mecanismo regulatorio mayor para prevenir la emergencia de autoinmunidad al no dejar que haya un número mayor de células T autorreactivas en el organismo. No se ha podido establecer directamente el papel que juega un incremento de PTPN22 en las células T_{reg}, pero se ha dicho que hay una señalización reducida de TCR en dichas células y por lo tanto una reducida función regulatoria.

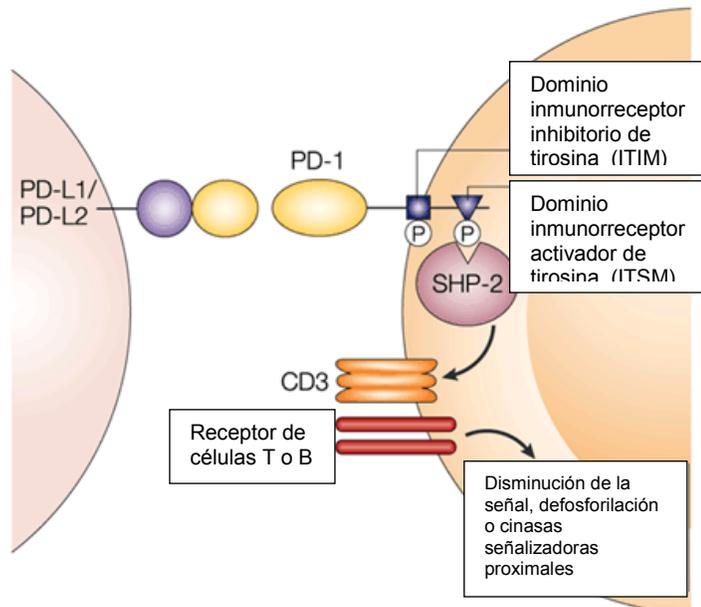
PD-1

El SI tiene la capacidad de producir moléculas (anticuerpos) contra agentes externos que pueden ser dañinos para el organismo. Estas inevitablemente pueden producir anticuerpos que reaccionen contra componentes del propio cuerpo. Por esta razón el SI ha creado mecanismos para prevenir el desarrollo de clonas linfoides autorreactivas potenciales. A esto se le ha llamado tolerancia inmunológica, la cual tiene mecanismos centrales y periféricas para eliminarlas. Un mecanismo es la tolerancia central, donde las células T y B autorreactivas son eliminadas en el timo y la médula espinal respectivamente. El otro es la tolerancia periférica en donde la deleción clonal y la anergia negativa regulan las clonas autorreactivas que han

escapado de la deleción en el timo y la médula espinal, especialmente aquellas contra antígenos específicos de tejidos periféricos.

Se han propuesto dos señales para explicar la activación de los linfocitos y la tolerancia y discriminar lo propio de lo no propio. De acuerdo a este modelo, la señal uno corresponde a un reconocimiento del antígeno por el linfocito y la dos corresponde a señales adicionales o coestimuladoras. En la ausencia de la señal dos, los linfocitos no responden efectivamente y caen en un estado de anergia. La señal uno se lleva a cabo por el MHC en interacción con el TCR. La señal dos es llevada a cabo por moléculas en la superficie de las células T expresadas en las células presentadoras de antígeno (CPA). La coestimulación es de interés terapéutico ya que la manipulación de señales coestimuladoras pueden proveer el significado de el potenciamiento o la terminación de la respuesta inmune (RI) (Freeman *et al*, 2000; Sharpe y Freeman, 2002).

Se cree que el balance entre las señalizaciones estimulatorias e inhibitorias son importantes para mantener la tolerancia y su rompimiento está involucrado en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes. Las segundas señales negativas son necesarias para inducir la tolerancia de células T, mientras que las segundas señales positivas promueven su activación. El gran número de moléculas coestimuladoras de células T y la dinámica natural de la RI indican que debe existir una jerarquía para regular las respuestas de los linfocitos T. El gen *PD-1* codifica para una proteína receptora transmembranal tipo I de la superfamilia de las inmunoglobulinas, de 55 kDa, con una región extracelular que contiene un dominio similar a V (V-like). Esta proteína también tiene dos residuos de tirosina en la región citoplasmática, una tirosina N-terminal localizada en un dominio



Tomado y modificado de *Nature Reviews Immunology*
(Sharpe et al, 2002)

Figura 3. *PD1* contiene dos tirosinas en la parte que se encuentra en el citoplasma, formando los dominios ITIM e ITSM. El contacto del TCR y *PD1* pueden provocar la fosforilación (P) de una tirosina y por lo tanto la activación de SHP-2, resultando en la defosforilación de moléculas señalizadoras y reduciendo la síntesis de mRNA de citocinas. La ligación de *PD1* como del receptor de células B (BCR) pueden inhibir la fosforilación de la tirosina de las moléculas efectoras de la señalización.

inmunorreceptor inhibitorio de tirosina (ITIM, del inglés immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) y el otro residuo correspondiente a un inmunorreceptor activador de tirosina (ITSM, del inglés immunoreceptor tyrosine-based switch motif) (Figura 3). Se expresa en células T, B (después de su activación) y macrófagos (Nishimura y Honjo, 2001). PD-1 fue aislado de un hibridoma de células T en muerte celular programada, de ahí el nombre de PD-1 (del inglés programmed death 1). Es importante señalar que diversos estudios realizados muestran la expresión asociada con activación, no muerte celular (Sharpe y Freeman, 2002).

El mecanismo de señalización por el cual se sugiere que actúa PD-1 aun no está bien dilucidado. Para este efecto se realizó un experimento en células T Jurkat, donde el ligamiento a la par de TCR y PD-1 resulta en una rápida fosforilación de tirosina en ITSM y activación de SHP-2, que a su vez defosforila moléculas señalizadoras de la cascada de señalización de TCR proximales a la membrana, resultando todos estos eventos en una disminución de señal y una reducida síntesis de mRNA de citocinas (Figura 3). Por lo tanto se sugiere que una mutación en la tirosina de ITSM impide la actividad inhibitoria de PD-1 (Sharpe y Freeman, 2002). Así el gen *PD-1* está involucrado en la regulación negativa de algunas respuestas inmunes y juega un papel importante en la regulación de la tolerancia periférica, ya que su deficiencia conduce a glomerulonefritis similar a lupus ("lupus-like"), artritis y cardiomiopatía dilatada autoinmune, en articulaciones de las extremidades con inflamación granulomatosa y erosiones en los huesos en ratones knock out (ko) (Nishimura y Honjo, 2001). En exámenes histológicos se observa infiltración de linfocitos en tejidos cardiacos, observándose también depósitos de IgG en la superficie de los miocitos. Por otra parte, también se encontraron autoanticuerpos específicos para una proteína de 33 kDa que se expresan en la superficie de un corazón normal; estos

anticuerpos fueron detectados en el suero de ratones enfermos pero no de ratones sanos con el mismo respaldo genético (Nishimura H. et al. 1998). Con todo lo anterior, se sugiere que PD-1 tiene función de regulador negativo de la RI, indicando que las células T potencialmente autorreactivas en la periferia se pueden activar en la ausencia de PD-1, implicándolo en la regulación de la tolerancia celular periférica, aunque su mecanismo todavía no se conoce con certeza.

En este gen se han identificado 7 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs): *PD1.1* en la región promotora (-531), *PD1.2* en el intrón 2 (6438), *PD1.3* en el intrón 4 (7146), *PD1.4* en el intrón 4 (7499), *PD1.9* en el exón 5 (7525), *PD1.5* en el exón 5 (7785) y *PD1.6* en la región 3'UTR (8738). *PD1.1*, *PD1.2* y *PD1.9* se encontraron en desequilibrio de ligamiento así como *PD1.4* y *PD1.5* (Prokunina et al, 2002) (Figura 4).

JUSTIFICACIÓN

La ARJ de la enfermedad reumática más común en la infancia, cuyo costo socio-económico hace indispensable conocer los factores que participan en la etiología de esta enfermedad para entender su patogénesis y mejorar las estrategias preventivas, de diagnóstico y tratamiento para mejorar la calidad de vida del paciente.

El gran número de genes que han mostrado tener un posible papel en la etiopatología de las enfermedades autoinmunes, apoya la hipótesis de que en estos padecimientos existe una gran heterogeneidad genética y que ésta es diferente entre los diversos grupos étnicos y poblaciones, por lo que estos genes candidato deben ser estudiados con detalle en cada una de las poblaciones.

Por otro lado, es posible que el componente genético sea mayor en aquellos individuos donde la enfermedad se manifiesta a una edad más temprana, por lo que la población pediátrica puede presentar la muestra ideal para el estudio de los factores genéticos implicados en la ARJ. La finalidad de este proyecto es buscar polimorfismos asociados con la susceptibilidad a desarrollar ARJ en la población pediátrica mexicana.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en genes candidatos se encuentran asociados a la susceptibilidad para desarrollar ARJ.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar la frecuencia de SNPs en genes candidatos en una muestra de individuos sanos y pacientes con ARJ en población mexicana.
2. Determinar si polimorfismos localizados en genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria se encuentran asociados a la susceptibilidad para desarrollar ARJ en grupo de pacientes pediátricos mexicanos.
3. Establecer las diferencias entre los polimorfismos asociados a ARJ en otras poblaciones encontrados en el presente estudio.

HIPÓTESIS

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en genes candidatos involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria, se encuentran asociados a la gravedad y susceptibilidad para desarrollar ARJ en pacientes pediátricos mexicanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Se incluyeron en el estudio pacientes mexicanos con diagnóstico de ARJ de acuerdo con los criterios de la ACR, de inicio antes de los 16 años de edad, cuyos padres aceptaron firmar la carta de consentimiento informado. Se incluyeron también controles sanos sin antecedentes de enfermedades autoinmunes (determinado mediante la aplicación de un cuestionario), pareados por origen geográfico. Todos los individuos fueron mexicanos mestizos. Se consideraron como mexicanos mestizos las personas cuyas dos últimas generaciones hayan nacido en México y no refieran antecedentes extranjeros. Dado que el genoma no cambia con la edad, se seleccionaron como controles individuos mayores de 18 años para asegurar que no hubieran desarrollado la enfermedad en cuestión durante la infancia.

Muestras

A todos los pacientes y los controles se les extrajeron de 5 a 10 ml de sangre periférica utilizando EDTA como anticoagulante.

Extracción de DNA

La extracción de DNA genómico se realizó a partir sangre total periférica utilizando el estuche comercial para extracción de DNA de QIAGEN.

Midi kit QIAGEN

Sangre periférica total

- 1) Se colocaron 2mL de sangre periférica en un tubo cónico y se añadieron 200µL de proteasa.
- 2) Posteriormente se agregaron 2.4 mL de amortiguador AL al mismo tubo.
- 3) Se agitó durante 15 segundos la mezcla.
- 4) Se incubó a 70°C por 10 minutos.
- 5) Al término de la incubación, se añadieron 2mL de etanol absoluto y se agitó la mezcla.
- 6) En la columna proporcionada en el estuche comercial, se transfirió la mitad de la mezcla y se centrifugó a 3000rpm durante 3 minutos.
- 7) Se desechó el filtrado y se vació a la columna el resto de la mezcla, centrifugando nuevamente a 3000rpm durante 3 minutos.
- 8) Posteriormente, se desechó el filtrado y se agregaron 2mL de amortiguador AW1; se centrifugó a 5000rpm durante un minuto.
- 9) Después de desechar el filtrado, se agregaron 2mL del amortiguador AW2 y se centrifugó a 5000rpm durante 15 minutos.
- 10) Las columnas se transfirieron a tubos nuevos estériles y se desechó el otro tubo con el filtrado.
- 11) Se agregaron 110µL de amortiguador de recuperación AE, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 5000rpm durante 2 minutos.
- 12) Para aumentar el rendimiento de DNA, se repitió el paso 11 y se transfirió el filtrado a un microtubo nuevo, estéril y rotulado adecuadamente para su identificación.

Verificación de la integridad del DNA

La integridad del DNA se verificó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Preparación para 50mL

1. Se pesaron 0.5 g de agarosa grado molecular y se vertieron en un matraz Erlen Meyer.
2. Posteriormente se agregaron 50mL de amortiguador TBE 1X.
3. Para disolver la agarosa, se calentó la mezcla en horno de microondas agitando periódicamente hasta no observar grumos.
4. Se dejó enfriar, y se agregó bromuro de etidio agitando cuidadosamente para homogenizar; se vació en la cámara de electroforesis.
5. Las muestras se corrieron agregando 1 μ L más 2 μ L de acarreador a 70V durante 20 minutos.

Repurificación del DNA

Algunas de las muestras de los pacientes que mostraron degradación del DNA, fueron repurificadas para eliminar el DNA degradado como se describe a continuación.

- 1) Cada muestra de DNA se llevó a un volumen final de 200 μ L con amortiguador Tris-EDTA (TE) en microtubos de 1.5mL.
- 2) Posteriormente, se agregó a cada muestra 20 μ L de proteinasa K.

- 3) Se agregaron 200µL de amortiguador AL y se mezcló rigurosamente.
- 4) Se incubó durante 30 minutos a 56°C.
- 5) Se añadieron 200µL de etanol absoluto y se agitó durante 15 segundos.
- 6) La mezcla se virtió en las columnas del estuche comercial y se centrifugó a 8000rpm durante 2 minutos y se desechó el filtrado.
- 7) A la misma columna se le agregaron 500µL de amortiguador AW1 y se centrifugó a 14000rpm durante un minuto. El filtrado se desechó.
- 8) Se agregaron 500µL de amortiguador AW2 a la columna y se centrifugó a 14000rpm por 5 minutos.
- 9) La columna se colocó en un microtubo nuevo de 1.5mL y se le agregaron 75µL de amortiguador de elución AE dejándose incubar un minuto a temperatura ambiente.
- 10) Se centrifugó a 14000 rpm y el filtrado que contiene al DNA, se transfirió a un tubo nuevo previamente rotulado.
- 11) Se cuantificó por Nanodrop y se verificó su integridad nuevamente en geles de agarosa al 1%.

Cuantificación del DNA con el instrumento Nanodrop®.

Las muestras de DNA obtenidas se cuantificaron con el instrumento Nanodrop® (modelo ND1000), a una longitud de onda de 280nm. Con estos datos se realizaron diluciones de las muestras a 100ng/µL para los ensayos de genotipificación.

Análisis molecular

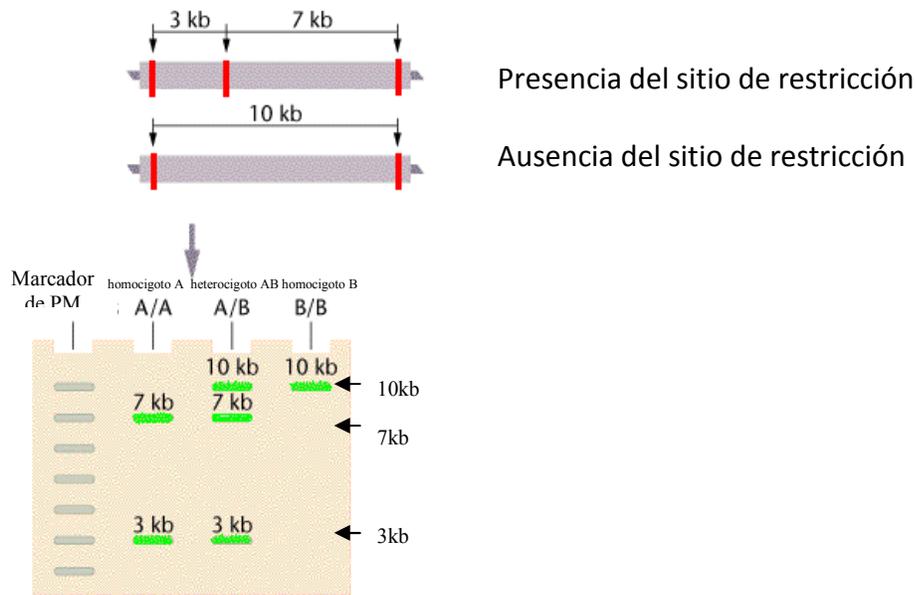
Genotipificación de SNPs

Se analizaron cuatro polimorfismos del gen *PD-1* y uno del gen *PTPN22* que han mostrado asociación en otras poblaciones afectadas con ARJ. Cuatro SNPs fueron caracterizados mediante el método fluorescente de 5' exonucleasa (TaqMan) y uno por análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs). Estos SNPs han sido descritos en genes candidatos contenidos principalmente en las regiones que han mostrado ligamiento con ARJ en el humano. Los SNPs fueron analizados en forma independiente.

Análisis por RFLPs

Un polimorfismo es capaz de eliminar o crear sitios de restricción los cuales son reconocidos por enzimas de restricción, llamadas también endonucleasas de restricción (Figura 5). En este caso, se utilizó esta característica para identificar la presencia o ausencia del SNP de interés, es decir, la presencia o ausencia del polimorfismo en el caso de *PD1.3*.

Para llevar a cabo esta metodología, se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) primero el fragmento de interés en donde estaba contenido el polimorfismo como se describe a continuación. En un tubo para PCR se colocaron los reactivos para la preparación de la mezcla en un volumen final de 25µL, como se ejemplifica a continuación:



Genotipos	Tamaño de fragmentos
Homocigotos para cromosoma A	3 Kb, 7 Kb
Heterocogotos (A/B)	3 Kb, 7 Kb, 10 Kb
Homocigotos para el cromosoma B (B/B)	10 Kb

Figura 5. RFLPs. En el análisis por RFLPs se utilizan enzimas de restricción específicas para una secuencia, si ésta se encuentra presente en el fragmento de interés, se generarán dos fragmentos de longitud específica (3 y 7kb, A), sin embargo, cuando está ausente el fragmento permanecerá intacto (10kb, B).

Amplificación de una región del gen *PD-1* que contiene al SNP *PD-1.3*

Reactivos	1 muestra (μL)
Amortiguador	2.5
MgCl ₂ (2mM)	1.5
Nucleótidos (2.5 mM)	1.5
Oligonucleótido R (100ng)	1.0
Oligonucleótido F (100ng)	1.0
Enzima Taq polimerasa	0.5
H ₂ O	15
DNA (200ng)	2.0
	Vol. final: 25

Las condiciones de termociclado fueron las siguientes:

95°C / 10 minutos		
-		
95°C / 15 segundos	} 35 ciclos	Desnaturalización
60°C / 30 segundos		Alineación
72°C / 15 segundos		Extensión
-		
72°C 5 minutos		Extensión final
-		
4°C final		

Para verificar que el producto amplificado por PCR era el deseado, se corrió en geles de agarosa al 3% como se indica a continuación:

1. Se pesaron 0.9g de agarosa y se disolvieron en 30mL de TBE 1X calentando la mezcla.
2. Se agregaron 3 μ L de bromuro de etidio y se mezcló bien.
3. 5 μ L de muestra se mezclaron con 5 μ L de acarreador y en el primer carril el marcador de peso molecular.
4. El gel se corrió a 100V por 20 minutos.
5. Al final, se observó el gel con luz para verificar la amplificación de las muestras.

Una vez teniendo el producto de PCR deseado, se llevó a cabo la digestión con las enzimas de restricción

Reacción de RFLPs

Para realizar esta reacción, se tomó el producto de PCR y se incubó toda la noche con la enzima de restricción en la siguiente mezcla:

Reacción con enzima de restricción

1 muestra (μ L)

amortiguador	2.5
PstI	0.5
H ₂ O	2.0
Vol. final	5

Para visualizar si la restricción se llevó a cabo e identificar el genotipo de las muestras, los productos de la digestión se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida, cuya preparación fue la siguiente:

Preparación del gel de acrilamida al 30%.

1. Se tomaron 7.5 mL de acrilamida (preparada previamente) y se colocaron en un matraz.
2. Se adicionaron 3.0 mL de TBE 5X, 4.49 mL de agua bidestilada, 225 μ L de persulfato de amonio al 10%, mezclar bien y por último,
3. Se agregaron 22.5 μ L de TEMED.
4. Esta mezcla se vertió rápida y cuidadosamente en la cámara de electroforesis para que el gel polimerizara.
5. Una vez hecho el gel, se agregó a cada muestra 5 μ L de acarreador y se colocaron en los pocillos.
6. Al final, se corrió el gel a 100V durante 30 minutos.
7. Al cabo de este tiempo, se tiñó con 20 μ L bromuro de etidio en 50mL de amortiguador TBE 1X durante 10 minutos.
8. Posteriormente, se observó el gel con luz UV para identificar los genotipos de las muestras.

Método fluorescente de 5' exonucleasa (TaqMan ®)

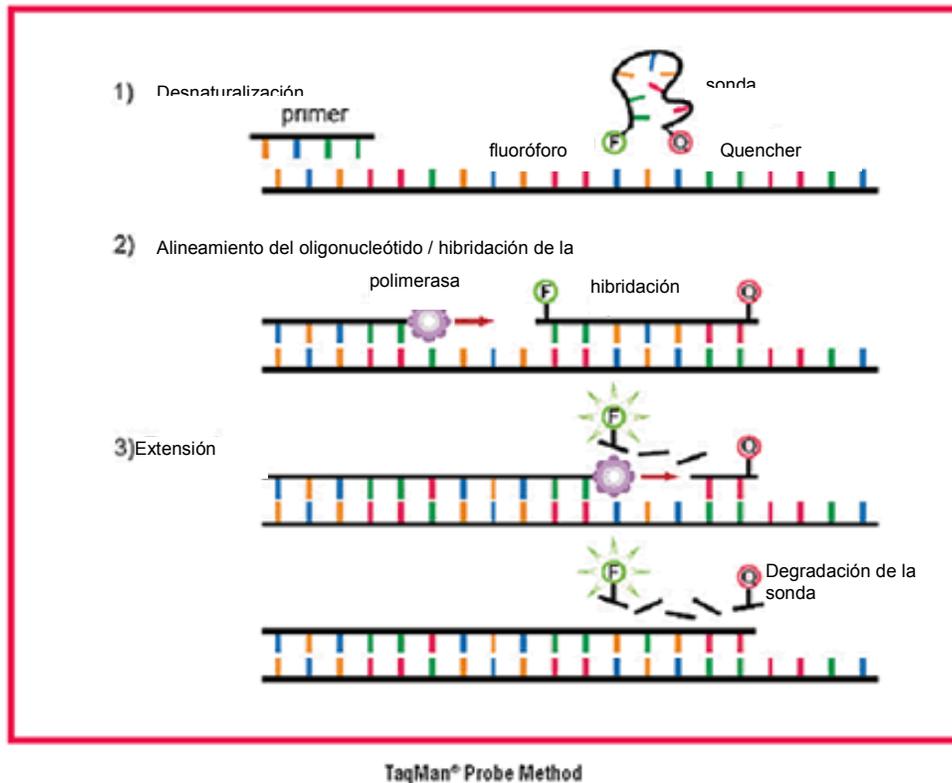
Para cada ensayo de discriminación alélica se diseñaron 2 sondas específicas marcadas en el extremo 5' con fluorocromos diferentes, FAM para el alelo 1 y VIC para el alelo 2, además ambas sondas tenían en el

extremo 3' un "quencher" (TAMRA) el cual mientras la sonda permanece intacta, inhibe la emisión de fluorescencia. Durante la reacción de PCR, los oligonucleótidos hibridan con una secuencia específica del segmento del gen que contiene la secuencia polimórfica, la sonda de TaqMan también híbrida con su secuencia homóloga. Durante la PCR, la AmpliTaq Gold, que tiene actividad tanto de DNA polimerasa como de exonucleasa 5'-3', es capaz de digerir la sonda marcada durante la amplificación y liberar el colorante fluorescente de la acción del "quencher", de tal manera que dadas las condiciones de astringencia utilizada durante la reacción, sólo la sonda específica para el polimorfismo presente fue capaz de hibridar. Por lo tanto es posible diferenciar un alelo del otro con base en el tipo de fluorescencia emitida (Figura 6).

La reacción de TaqMan se realizó mezclando la master mix, la sonda, agua y el DNA en las siguientes cantidades en placas especiales de 96 pozos para el equipo ABIPrism 7900 de Applied Biosystems:

Condiciones del método de TaqMan

	1 muestra (μL)
Master mix	2.5
Assay 20X	0.125
H ₂ O	0.375
DNA (20ng)	2
Volumen final	5



Tomada y modificada de (www.appliedbiosystems.com)

Figura 6. Esquema de la reacción TaqMan. 1) Desnaturalización, las hebras de DNA se separan por efecto de la temperatura; 2) En el alineamiento, tanto los oligonucleótidos como las sondas TaqMan hibridan con su secuencia complementaria en la muestra de DNA; 3) Al llevarse a cabo la extensión por la DNA polimerasa con función de 5' exonucleasa, la sonda se degrada permitiendo la emisión de fluorescencia.

Una vez realizada la mezcla, se corrió la reacción con las siguientes condiciones de termociclado:

50°C / 2 minutos

95°C / 10 minutos

-

95°C / 15 segundos 35 ciclos

60°C / 1 minuto

-

4°C / final

Una vez finalizada la reacción de amplificación, se determinó el genotipo de las muestras dependiendo de su posición en el plano utilizando el programa SDS2.2, el cual muestra los resultados en una gráfica de dos ejes (Figura 7).

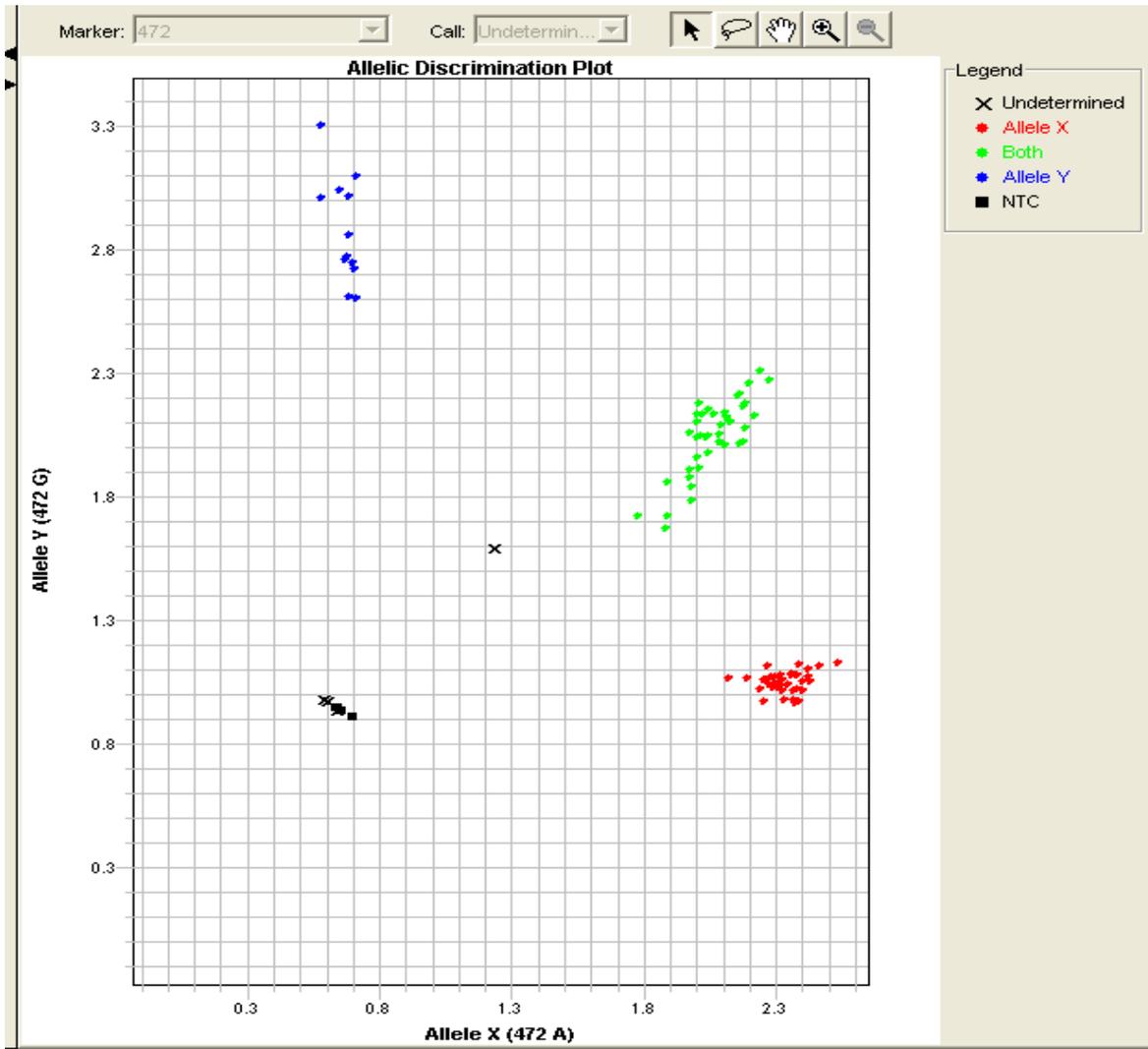


Figura 7. Discriminación alélica mediante la técnica de TaqMan. En verde se muestran los homocigotos para el alelo Y, en rojo los homocigotos para el alelo X y en verde los heterocigotos XY; en negro se presentan los controles negativos.

Diseño de oligonucleótidos y sondas específicas

Los oligonucleótidos y las sondas se diseñaron con el software Oligonucleótido Express de Applied Biosystems®, flanqueando las regiones de interés de los genes estudiados.

PD1.1

Oligonucleótidos

PD1.1 Sentido 5'-TGCCCCAGCGAAGGG-3'

PD1.1 Antisentido 5'-CAGGTGCCTGGCCTCTG-3'

Sondas TaqMan

PD1.1 5'-VIC-CTTCC**C**GGCCCATC-NFQ-3'

PD1.1 5'-FAM-CCTTCC**T**GGCCCATC-NFQ -3'

PD1.5

Oligonucleótidos

PD1.5 Sentido 5'-GCGGAATGGGCACCTCAT-3'

PD1.5 Antisentido 5'-TCCATCCTCAGGCCTCAGT-3'

Sondas TaqMan

PD1.5 5'-VIC-CGTC**G**GCTGAGCC-NFQ-3'

PD1.5 5'-FAM-CCGTC**A**GCTGAGCC-NFQ-3'

PD1.6

Oligonucleótidos

PD1.6 Sentido 5'-GCAGAAGTGCAGGCACCTA-3'

PD1.6 Antisentido 5'-GAATGGGTTCCAAGGAGAGCT-3'

Sondas TaqMan

PD1.6 5'-VIC-CCCCAT**G**TGCCAC-NFQ-3'

PD1.6 5'-FAM-CCCCAT**A**TGCCAC-NFQ-3'

PTPN22

Oligonucleótidos

PTPN22 Sentido 5'-CCAGCTTCCTCAACCACAATAAATG-3'
PTPN22 Antisentido 5'-CAACTGCTCCAAGGATAGATGATGA-3'

Sondas TaqMan

PTPN22 5'-VIC-TCAGGTGTCCATACAGG-NFQ-3'
PTPN22 5'-FAM-TCAGGTGTCCGTACAGG-NFQ-3'

Análisis estadístico

Para identificar la asociación de los polimorfismos individuales se analizaron las frecuencias fenotípicas y alélicas entre los casos y los controles mediante la prueba de chi-cuadrada o exacta de Fisher, considerando como significativo cuando el valor de $P < 0.05$. Se utilizó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Todo esto utilizando el programa EPI-INFO. Se verificó que la distribución de los genotipos en la población en estudio se encontrara en equilibrio de Hardy-Weinberg con el programa FINETTI.

Ubicación del estudio

Los pacientes se captaron, previo consentimiento informado, de la consulta externa del Departamento de Reumatología e Inmunología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI y del Departamento de Reumatología Pediátrica del Centro Médico "La Raza". El análisis genético y el estudio molecular se realizaron en el Laboratorio de Genómica de Enfermedades Multifactoriales del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

RESULTADOS

Pacientes y controles

En este estudio se analizaron 115 pacientes menores de 16 años con diagnóstico de ARJ según los criterios de la ACR, los cuales fueron clasificados en los tres principales subtipos: oligoarticular, poliarticular y sistémica. Sesenta y tres individuos fueron (54.8%) del sexo femenino y 52 (45.2%) del sexo masculino (figura 8). La relación de género femenino:masculino fue aproximadamente 1:1.

En el caso de los controles, se obtuvieron 150 muestras de donadores sanos obtenidos del banco de sangre del Instituto Nacional de Pediatría mayores de 18 años, previa firma del consentimiento informado. Los controles fueron pareados por sexo: 75 fueron de hombres (50%) y 75 de mujeres (50%).

Integridad del DNA

A todas las muestras obtenidas de DNA se les verificó la integridad en gel de agarosa al 1%. Se observó que había variabilidad en la integridad de las muestras, por lo que las que mostraban mayor degradación se repurificaron con el estuche comercial QIAquick de QIAGEN.

Posteriormente se ajustó la concentración del DNA a 10ng/μL (Figura 9).

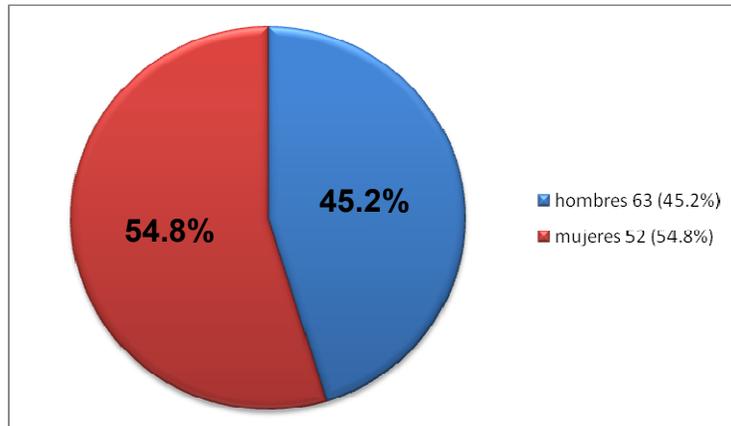


Figura 8. Representación del número de pacientes masculinos y femeninos analizados (n=115).

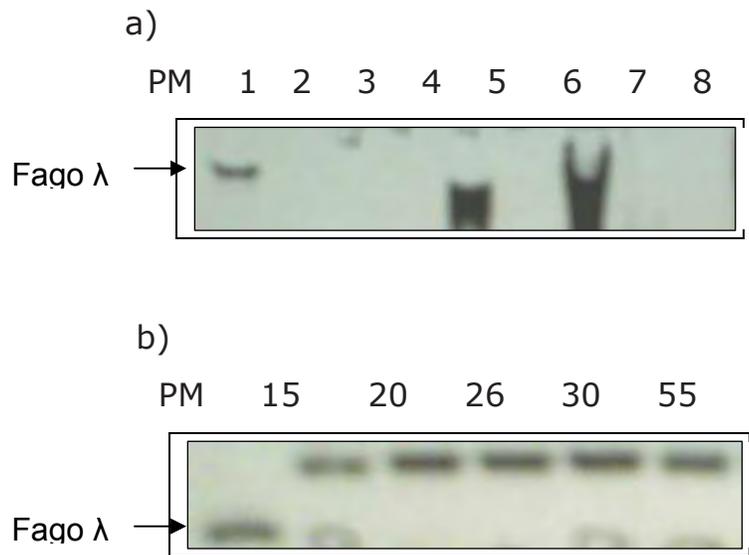


Figura 9. Integridad de DNA en geles de agarosa al 1%. a) integridad antes de la purificación, el barrido de las muestras representa al DNA degradado. b) Integridad después de la purificación con el estuche comercial QIAquick, se observan bandas definidas, lo que indica una buena integridad después de la limpieza.

Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg

Los SNPs estudiados se analizaron con el programa Finetti para verificar que la distribución de los genotipos en la población estuvieran en equilibrio de Hardy-Weinberg. Tanto los casos como los controles, mostraron una distribución de los genotipos en equilibrio Hardy-Weinberg.

Se realizó la genotipificación de un SNP del gen *PTPN22* y cuatro SNPs del gen *PD-1* (tabla 3) utilizando las técnicas de TaqMan y RFLPs. Los resultados fueron validados por secuenciación automática (Hitachi sequence analyzer 5400).

Análisis de los SNPs de los genes *PTPN22* y *PD-1*

En la tabla 4 se muestran las frecuencias para los diferentes genotipos y alelos tanto en los pacientes como en los controles, el porcentaje de cada uno en las diferentes poblaciones muestreadas, el valor de riesgo relativo (OR) y el intervalo de confianza (CI 95%, el valor de chi cuadrada (X^2) y el valor de P, cuyo valor se consideró estadísticamente significativo cuando su valor estaba por debajo de 0.05 ($P < 0.05$).

Al comparar las frecuencias genotípicas y alélicas de los casos diagnosticados con) ARJ y los controles para el SNP C1858T en el gen *PTPN22* (tabla 4), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas que nos indicaran asociación entre el polimorfismo de riesgo (T) y la ARJ.

Tabla 3. SNPs de los genes *PTPN22* y *PD-1* analizados.

PTPN22

Gen	Locus	SNP	Localización
<i>PTPN22</i>	1p13	C1858T (rs2476601)	Región codificante

PD-1

Gen	Locus	SNP	Localización
<i>PD-1</i>	2q37	<i>PD-1.1</i>	Promotor
		<i>PD-1.3</i>	intrón 4
		<i>PD-1.5</i>	exón 5 (sinónimo)
		<i>PD-1.6</i>	3'UTR

Tabla 4. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C1858T de *PTPN22* encontradas en la muestra.

Genotipo	Casos (%) n=115	Controles (%) n=150		OR 95% (CI)	X²	P
CC	109 (94.8)	146 (97.3)	CC Vs TT	1.338(0.026-67.955)	Nan	1.0
CT	6 (5.2)	4 (2.67)	CC Vs CT	2.009(0.553-7.293)	1.17	0.28016
TT	0	0				
Alelo	n=230	N=300				
C	224 (97.4)	296 (98.7)		1.98 (0.553-7.108)	1.14	0.34313
T	6 (2.6)	4 (1.33)				

Al estratificar por sexo los casos y controles, tampoco mostraron una asociación con la enfermedad (datos no mostrados).

Posteriormente, se analizaron cuatro polimorfismos del gen *PD-1*, (*PD1.1* G/A, *PD1.3* G/A, *PD1.5* C/T, *PD1.6* G/A). La comparación de ñas frecuencias alélicas y genotípicas de estos polimorfismos, no muestran diferencias estadísticamente significativas que indicaran asociación de los diferentes SNPs de riesgo del gen *PD-1* con la ARJ (tablas 5-8). En este caso también se hizo el análisis por estratificación por sexo para cada SNP, en donde no mostraron asociación con ARJ (datos no mostrados).

Dado que en el momento de la realización de esta tesis no fue posible diseñar las sondas TaqMan correspondientes, La genotipificación del SNP *PD1.3* se realizó por RFLPs mediante una PCR convencional (figura 10a). Se utilizó la enzima de restricción Pst-I que reconoce el alelo A pero no el G (figura 10b). Así se identificó a los individuos que portan los alelos G y A en forma homocigota (GG o AA) o heterocigota (GA). Aunque este SNP no se encuentra en una región codificante, se ha visto que se encuentra en una región de unión del factor de transcripción llamado RUNX1 (Prokunina *et al*, 2004).

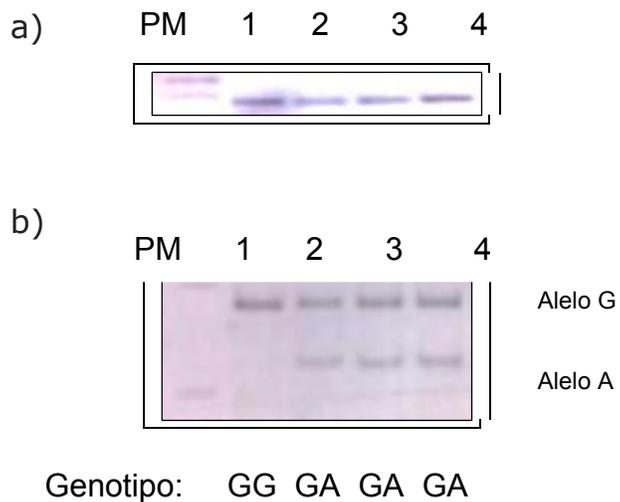


Figura 10. Identificación del genotipo del *PD1.3* del gen *PD-1* mediante RFLPs. a) Gel de agarosa al 3% para la visualización del producto de PCR del SPN *PD1.3*. b) Gel de acrilamida al 15% para visualizar los genotipos de las muestras después de su digestión del amplificado de PCR con la enzima *PstI*; en el carril 1 se muestra un homocigoto para el alelo G con genotipo GG; en los carriles 2 al 4 se observa tanto el alelo A como el G por lo que se identificaron los individuos con genotipo GA.

Tabla 5. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *PD1.1* (G/A) de *PD-1* encontradas en los casos y en los controles.

PD-1.1

Genotipo	Casos (%) n=115	Controles (%) n=150		OR 95% (CI)	X²	P
GG	53 (46.1)	61 (40.7)	GG Vs AA	0.987(0.420-2.318)	0.0	0.97517
GA	50 (43.5)	75 (50.0)	GG Vs GA	0.767(0.459-1.282)	1.02	0.31147
AA	12 (10.4)	14 (9.3)				
Alelo	n=230	n=300				
G	156 (67.8)	197 (65.7)		0.91(0.62-1.33)	0.27	0.601716
A	74 (32.2)	103 (34.3)				

Tabla 6. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *PD1.3* (G/A) de *PD-1* encontradas en la muestra.

PD-1.3

Genotipo	Casos (%) n=115	Controles (%) n=150		OR 95% (CI)	X²	P
GG	106 (92.2)	145 (96.7)	GG Vs AA	1.366(0.027-69.402)	Nan	1.0
GA	9 (7.8)	5 (3.3)	GG Vs GA	2.462(0.802-7.558)	2.63	0.10514
AA	0 (0)	0 (0)				
Alelo	n=230	n=300				
G	221 (96.0)	295 (98.3)		2.4 (0.72-8.36)	2.55	0.11031
A	9 (4.0)	5 (1.7)				39

Tabla 7. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *PD1.5* (C/T) de *PD-1* encontradas en la muestra.

PD-1.5 (rs2227981)

Genotipo	Casos n=115	Controles n=150		OR 95% (CI)	X²	P
CC	57 (49.6)	63 (42.0)	CC Vs TT	1.289(0.551-3.018)	0.34	0.55723
CT	44 (38.2)	75 (50.0)	CC Vs CT	0.648(0.387-1.087)	2.71	0.09956
TT	14 (12.2)	12 (8.0)				
Alelo	n=230	n=300				
C	158 (68.7)	201 (67.0)		0.93(0.63-1.36)	0.17	0.679262
T	72 (31.3)	99 (33.0)				

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *PD1.6* (G/A) de *PD-1* encontradas en la muestra.

PD-1.6

Genotipo	Casos n=115	Controles n=150		OR 95% (CI)	X²	P
GG	22 (19.31)	30 (20.0)	GG Vs AA	1.091(0.540-2.204)	0.06	0.80841
GA	57 (49.6)	75 (50.0)	GG Vs GA	1.036(0.542-1.983)	0.01	0.91411
AA	36 (31.3)	45 (30.0)				
Alelo	n=230	n=300				
G	101 (43.9)	135 (45.0)		1.05(0.73-1.5)	0.06	0.803123
A	129 (56.1)	165 (55.0)				1

DISCUSIÓN

La artritis reumatoide juvenil es la artropatía autoinmune más común en la infancia (antes de los 16 años de edad), afectando de 80 a 100 niños/100 000, es decir, que al menos 1 de cada 1000 niños padecen ARJ. El pronóstico de la enfermedad depende de su gravedad y de su tipo al realizar el diagnóstico, en donde la calidad de vida de los pacientes se ve afectada si no es tratada de manera adecuada y el costo socioeconómico es muy alto. Esta es una enfermedad compleja donde intervienen tanto factores genéticos como factores ambientales, sin embargo, estos factores aun no están bien esclarecidos. Así, el estudio de la ARJ a nivel genético es necesario para conocer los genes que están directamente involucrados en el desarrollo de la enfermedad.

En este trabajo se analizaron uno y cuatro SNPs de los genes *PTPN22* Y *PD-1* respectivamente, que se han reportado asociados con ARJ en diferentes poblaciones y que juegan un papel fundamental en el desarrollo de esta patología.

Después de los genes de la región del HLA, *PTPN22* ha sido el gen más estudiado en las enfermedades autoinmunes (tabla 9). El SNP C1858T produce un cambio de arginina (R) por un triptófano (W) en la posición 620 de la proteína que impide la supresión de la activación de células T, lo que sugiere este polimorfismo está involucrado en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes. Por esta razón, ha sido un gen candidato estudiado en diversas enfermedades autoinmunes.

Debido a su relevancia funcional como regulador negativo de la activación de las células T y su localización en una región cromosómica que ha mostrado ligamiento con AR y LES, *PTPN22* es un buen

candidato como marcador genético para enfermedades autoinmunes (Jawaheer *et al*, 2003).

Estudios realizados *in vitro* han mostrado que la presencia del alelo T une menos eficientemente a Csk (figura 2) que el alelo C, sugiriendo así que las células portadoras del alelo T pueden ser hiperreactivas y en consecuencia, los individuos con este alelo pueden ser más susceptibles a desarrollar autoinmunidad (Begovich *et al*, 2004; Bottini *et al*, 2004).

Hasta la fecha, se han reportado cuatro estudios que involucran el SNP C1858T en pacientes pediátricos con artritis, donde tres de ellos han sido asociados con la enfermedad (Tabla 9). En un estudio realizado por Seldin y cols. (Seldin *et al*, 2005) no se documentó asociación en 230 pacientes y 1400 controles finlandeses; en controversia Viken y cols. utilizando 320 casos de Noruega encontraron asociación de este polimorfismo con ARJ. Estos resultados fueron confirmados por Hinks y cols. (Hinks *et al*, 2006) donde por la asociación de este polimorfismo y la enfermedad en 661 casos ingleses. De la misma manera Cinek y cols. (Cinek *et al*, 2007), demostró asociación en 130 casos y 400 controles de Checoslovaquia. Cabe señalar que las frecuencias alélicas y genotípicas observadas en nuestro estudio muestran diferencias significativas con los dos trabajos reportados hasta la fecha, lo que puede explicarse debido a la heterogeneidad genética de las poblacionales.

A diferencia de las poblaciones noruega, inglesa y checoslovaca, en nuestro estudio no encontramos asociación entre este gen ARJ. Estas controversias pueden ser debidas al origen étnico, aunque la población mestiza tiene ascendencia europea, esta es una mezcla de europeos, indígenas y africanos. De hecho la baja frecuencia del alelo de riesgo T observado en nuestra población, sugiere que este alelo tenga un origen

europeo y se halla diluido en la mezcla de poblaciones. Por otra parte, no podemos descartar que el tamaño de muestra utilizado en este estudio es aun pequeño, pero cabe señalar que el número de casos utilizado por Cinek y cols. es muy similar al de este trabajo.

La activación de los linfocitos está controlada estrictamente por señales positivas y negativas que son reguladas a través de diversos receptores (Frauwirth y Thompson, 2002). Una falla en las señales negativas de los inmunorreceptores puede disminuir el umbral de activación de los linfocitos autorreactivos y por consecuencia el desarrollar padecimientos autoinmunes. Esto se ha observado en ratones knock out para *PD-1*. En humanos, la contribución de receptores inmunoinhibitorios y sus moléculas señalizadoras en el desarrollo de autoinmunidad aún no está clara.

En esta tesis se consideró al gen *PD-1* como un fuerte candidato para ARJ. Este gen es un inmunorreceptor miembro de la familia de las inmunoglobulinas, posee un dominio inhibitorio de tirosina, que se sabe participa en la regulación de la tolerancia periférica en células T y B y los ratones ko para este gen desarrollan autoinmunidad con características similares a enfermedades autoinmunes en el humano. Debido a la función de *PD-1* en la regulación del sistema inmune, se ha considerado un buen candidato para estudiarlo en las enfermedades autoinmunes. En un estudio realizado por Prokunina et al. (Prokunina *et al*, 2002),

Tabla 9. Enfermedades autoinmunes asociadas con *PTPN22* en diferentes poblaciones

Enfermedad	Población
Diabetes tipo I	Inglesa (Smyth <i>et al</i> , 2004) Estadounidense (Bottini <i>et al</i> , 2004; Zheng y She, 2005) Alemana (Kahles <i>et al</i> , 2005) Holandesa (Zhernakova <i>et al</i> , 2005)
Lupus eritematoso sistémico	Estadounidense (Kyogoku <i>et al</i> , 2004) Colombiana (Gomez <i>et al</i> , 2005) Sueca (Reddy <i>et al</i> , 2005) Española (Orozco <i>et al</i> , 2005) Mexicana en niños (Baca <i>et al</i> , 2006)
Artritis reumatoide	Estadounidense (Begovich <i>et al</i> , 2004) Holandesa (Wesoly <i>et al</i> , 2005; Zhernakova <i>et al</i> , 2005) Inglesa (Prescott <i>et al</i> , 2005; Hinks <i>et al</i> , 2006) Finlandesa (Seldin <i>et al</i> , 2005) Neozelandesa (Simkins <i>et al</i> , 2005) Noruega (Viken <i>et al</i> , 2005) Española (Orozco <i>et al</i> , 2005)
Enfermedad de Graves	Polaca (Skorka <i>et al</i> , 2005) Española (Orozco <i>et al</i> , 2005) Inglesa (Smyth <i>et al</i> , 2004)
Enfermedad de Addison	Inglesa (Velaga <i>et al</i> , 2004)
Artritis idiopática juvenil	Inglesa (Hinks <i>et al</i> , 2006) Noruega (Viken <i>et al</i> , 2005) Checoslovaca (Cinek <i>et al</i> , 2007)

(Tomada y modificada de Lee *et al Rheumatology*, 2007).

donde se secuenció *PD-1* en 5 individuos con LES no relacionados y 5 controles, identificaron 7 SNPs: *PD-1.1* en la región promotora -531, *PD-1.2* en el intrón 2 en el sitio 6438, *PD-1.3* en el intrón 4 en el sitio 7146, *PD-1.4* en el intrón 4 en la posición 7499, *PD-1.9* en el exón 5 en la posición 7625 (alanina-valina), *PD-1.5* en el exón 5 en el sitio 7785 (alanina-alanina) y *PD-1.6* en la región 3'UTR en la posición 8738. En relación a *PD-1* existen pocos estudios realizados en pacientes con AR, pero hasta el momento no existe ninguno en ARJ, aunque si se ha estudiado en otras enfermedades autoinmunes (Tabla 10). Los SNPs que se estudiaron en este trabajo son intrónicos, sinónimos o presentes en la región 3'UTR (con excepción de *PD1.1* en la región promotora). Las mutaciones en regiones no codificantes no son comúnmente observadas, sin embargo, su influencia en la expresión génica no está bien comprendida por lo que todavía tenemos mucho que aprender acerca de las complejas funciones de las regiones no codificantes del genoma (James *et al*, 2005).

Tabla 10. Enfermedades asociadas con los SNPs presentes en *PD-1* en diferentes poblaciones

<i>Población</i>	<i>Enfermedad</i>	<i>Polimorfismo asociado</i>
China (Taiwan)	Artritis reumatoide (Lin <i>et al</i> , 2004)	<i>PD-1.5</i>
Sueca	Artritis reumatoide (Prokunina L. <i>et al</i> 2004)	<i>PD-1.3</i>
China (Hong Kong)	Artritis reumatoide (Kai-Pang E. <i>Et al</i> 2005)	<i>PD-1.1 PD-1.5</i>
Británica	Artritis reumatoide (James ES <i>et al</i> 2005)	<i>PD-1+7717 y PD-1+5640</i>
Danesa	Diabetes mellitus tipo I (Nielsen C. <i>Et al</i> 2003)	<i>PD-1.3</i>
Europea, Mexicana	Lupus eritematoso sistémico (Prokunina <i>et al</i> 2002)	<i>PD-1.3</i>
Alemana	Esclerosis múltiple (Kroner <i>et al</i> , 2005)	<i>PD-1.3</i>
Australianos	Asma atópica (James ES <i>et al</i> 2005)	<i>PD-1+3928</i>
Mexicanos	Lupus eritematoso sistémico en niños (Velazquez-Cruz <i>et al</i> , 2007)	<i>PD1.3, PD1.5, PD1.6</i>

(Tomada y modificada de Lee *et al Rheumatology*, 2007).

En otro estudio realizado por Prokunina y cols. (Prokunina *et al*, 2004) con pacientes estratificados por factor reumatoide (FR), se demostró tendencia a la asociación con *PD1.3* en aquellos que son FR negativo, (P=0.053).

Así mismo, en un estudio de casos y controles realizado en otra población china (Lin Shin-Chang *et al* 2004) con 84 individuos pareados por sexo donde analizó el polimorfismo *PD-1.5*, se demostró por primera vez la asociación de este marcador con la susceptibilidad a padecer AR en adultos, basándose en las observaciones de manifestaciones autoinmunes que causaba la ausencia de este gen en ratones knock out. Pero es cuestionable que la población de estudio no se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg. Respecto a *PD-1 (PD-1)*, este es un gen que codifica para una glicoproteína transmembranal que participa en la regulación de un gran número de procesos involucrados en la respuesta inmune, como la regulación negativa de la activación de células T y B (Freeman *et al*, 2000). Esto se ha visto en células T potencialmente autorreactivas que se pueden activar si *PD-1* no está presente, implicándolo en la regulación de la tolerancia celular periférica, aunque su mecanismo no ha sido ampliamente estudiado.

Los polimorfismos *PD-1.1*, *PD-1.2* y *PD-1.9* se encuentran en desequilibrio de ligamiento, al igual que los SNPs *PD-1.4* y *PD-1.5*, por lo que se decidió estudiar solamente los polimorfismos *PD-1.1*, *PD1.3*, *PD-1.5* y *PD-1.6*. De todos estos polimorfismos, el más relevante es el *PD1.3*, cuyo alelo A impide la unión del factor de transcripción Runx1 y eso podría afectar la expresión de *PD-1* (Prokunina *et al* 2002).

Nuestros resultados no mostraron asociación de ninguno de los polimorfismos analizados del gen *PD-1* con ARJ. Al igual que *PTPN22*, estos hallazgos pueden ser debidos a varios factores como el origen étnico y su relación con la influencia de los factores ambientales que confieren susceptibilidad a la autoinmunidad en cada población.

Así, la distribución genotípica y alélica en todos los casos entre pacientes y controles no mostraron diferencias significativas, lo que muestra que no hay una asociación entre los genes *PTPN22* y *PD-1* con ARJ.

Cabe resaltar que se plantea que la AR en adultos y la ARJ son padecimientos diferentes, en los adultos se dice que es una sola enfermedad con diferentes manifestaciones clínicas y en niños son diferentes enfermedades agrupadas en una sola.

La asociación de estos dos genes con diferentes enfermedades autoinmunes mostrados en otras poblaciones, sugiere la existencia de un componente de alteraciones fisiológicas comunes y un fondo genético compartido aunado al hecho de que los mecanismos patológicos son similares en todas ellas como la pérdida de tolerancia a antígenos propios. La fisiopatología de las enfermedades autoinmunes y su coocurrencia en familias nos indican la influencia de factores genéticos en su desarrollo. Es importante señalar algunas veces se presentan falsas asociaciones debido a que el alelo estudiado se encuentra en desequilibrio de ligamiento (LD) con el gen de interés, es decir, debido a que el LD depende del efecto fundador ejercido sobre la población, una enfermedad puede mostrar asociación con alelos diferentes de un marcador en las distintas poblaciones. Otra causa de falsas asociaciones es el diseño de los estudios, como fallas en la selección de los controles, estratificación de la población o tamaños de muestra inadecuados, por lo que en este estudio es importante incrementar en tamaño de muestra mediante la captación de más pacientes. Esto permitirá dividir a la ARJ en los tres subgrupos que marca la ACR para tratar de asociar los SNPs con dichos subgrupos.

CONCLUSIONES

- Esta tesis es el primer trabajo realizado en población mexicana pediátrica enfocada a la búsqueda de genes candidato asociados con la susceptibilidad a desarrollar ARJ.
- El análisis de los SNPs en los genes *PTPN22* y *PD-1* sugieren que estos genes no se encuentran asociados con la susceptibilidad de desarrollar ARJ en pacientes pediátricos mexicanos, pero no podemos descartar que estén asociados a una de las subclasificaciones de la enfermedad.
- Las frecuencias encontradas de los genotipos y los alelos de *PTPN22* son diferentes a las reportadas en otras poblaciones.
- Es el primer trabajo realizado en la búsqueda de asociación de *PD-1* en ARJ.
- En este trabajo se apoya la hipótesis de que en esta enfermedad existe una gran heterogeneidad genética, por lo que es importante seguir con la búsqueda y estudio de más genes candidato.
- Es importante considerar un aumento del tamaño de muestra para futuros análisis.

ABREVIATURAS

AR	Artritis reumatoide
ARJ	Artritis reumatoide juvenil
ACR	Colegio Americano de Reumatología
CPA	Célula presentadora de antígeno
cSNP	SNP codificante
Csk	Tirosín-cinasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilén-diamino- tetracético
EULAR	Liga europea contra el reumatismo
FR	Factor reumatoide
HLA	Antígeno leucocitario humano
IL	Interleucina
ILAR	Liga internacional contra el reumatismo
IFN γ	Interferón gama
Kb	Kilobases
Ko	Knock-out
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NCBI	Centro nacional de información biotecnológica
nsSNP	SNP no codificante
<i>PDCD1</i>	Proteína de muerte celular programada 1 (PD-1)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTK	Proteína tirosín-cinasa
PTP	Proteína tirosín-fosfatasa
<i>PTPN22</i>	Proteína tirosín-fosfatasa 22
RFLPs	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
TCR	Receptor de células T
TE	Tris EDTA
T _{reg}	Células T reguladoras
SI	Sistema inmune
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
UTR	Región no traducida
λ_s	Riesgo de recurrencia en hermanos
V	volts

Lista de reactivos

Acrilamida al 30%

Acrilamida 29g

Bisacrilamida 1g

Agua (para llevar al aforo de 100 mL)

TBE 10X

Tris 324g

Ácido bórico 100g

EDTA 19g

Agua (para llevar al aforo de 100 mL)

TBE 5X

Diluir TBE 10X 1:2 con agua bidestilada

TBE 1X

Diluir TBE 10X 1:10 con agua bidestilada

Persulfato de amonio

Persulfato de amonio 1g

Agua bidestilada 10mL

Bromuro de etidio

Diluir la solución para llegar a una concentración de 0.5(g/ml)

BIBLIOGRAFÍA

1. Baca V, Velazquez-Cruz R, Salas-Martinez G, Espinosa-Rosales F, Saldana-Alvarez Y, Orozco L (2006). Association analysis of the PTPN22 gene in childhood-onset systemic lupus erythematosus in Mexican population. *Genes Immun* 7 (8):693-695.
2. Baum J, Fink C (1968). Juvenile rheumatoid arthritis in monozygotic twins: a case report and review of the literature. *Arthritis Rheum* 11 (1):33-36.
3. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SY, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ, Gregersen PK (2004). A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 75 (2):330-337.
4. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, MacMurray J, Meloni GF, Lucarelli P, Pellicchia M, Eisenbarth GS, Comings D, Mustelin T (2004). A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 36 (4):337-338.
5. Brewer EJ, Jr., Bass J, Baum J, Cassidy JT, Fink C, Jacobs J, Hanson V, Levinson JE, Schaller J, Stillman JS (1977). Current proposed revision of JRA Criteria. JRA Criteria Subcommittee of the Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Section of The Arthritis Foundation. *Arthritis Rheum* 20 (2 Suppl):195-199.

6. Cinek O, Hradsky O, Ahmedov G, Slavcev A, Kolouskova S, Kulich M, Sumnik Z (2007). No independent role of the -1123 G>C and +2740 A>G variants in the association of PTPN22 with type 1 diabetes and juvenile idiopathic arthritis in two Caucasian populations. *Diabetes Res Clin Pract* 76 (2):297-303.
7. Cohen S, Dadi H, Shaoul E, Sharfe N, Roifman CM (1999). Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. *Blood* 93 (6):2013-2024.
8. Christen U, von Herrath MG (2004). Initiation of autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 16 (6):759-767.
9. Donn RP, Barrett JH, Farhan A, Stopford A, Pepper L, Shelley E, Davies N, Ollier WE, Thomson W (2001). Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. British Paediatric Rheumatology Study Group. *Arthritis Rheum* 44 (4):802-810.
10. Earp HS, Austin KS, Buessow SC, Dy R, Gillespie GY (1984). Membranes from T and B lymphocytes have different patterns of tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (8):2347-2351.
11. Frauwirth KA, Thompson CB (2002). Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest* 109 (3):295-299.
12. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192 (7):1027-1034.

13. Giscoombe R, Wang X, Huang D, Lefvert AK (2002). Coding sequence 1 and promoter single nucleotide polymorphisms in the CTLA-4 gene in Wegener's granulomatosis. *J Rheumatol* 29 (5):950-953.
14. Gyorloff-Wingren A, Saxena M, Han S, Wang X, Alonso A, Renedo M, Oh P, Williams S, Schnitzer J, Mustelin T (2000). Subcellular localization of intracellular protein tyrosine phosphatases in T cells. *Eur J Immunol* 30 (8):2412-2421.
15. Gomez LM, Anaya JM, Gonzalez CI, Pineda-Tamayo R, Otero W, Arango A, Martin J (2005). PTPN22 C1858T polymorphism in Colombian patients with autoimmune diseases. *Genes Immun* 6 (7):628-631.
16. Gregersen PK (2005). Gaining insight into PTPN22 and autoimmunity. *Nat Genet* 37 (12):1300-1302.
17. Gregersen PK, Batliwalla F (2005). PTPN22 and rheumatoid arthritis: gratifying replication. *Arthritis Rheum* 52 (7):1952-1955.
18. Grom AA, Murray KJ, Luyrink L, Emery H, Passo MH, Glass DN, Bowlin T, Edwards C, 3rd (1996). Patterns of expression of tumor necrosis factor alpha, tumor necrosis factor beta, and their receptors in synovia of patients with juvenile rheumatoid arthritis and juvenile spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 39 (10):1703-1710.
19. Haas JP, Nevinny-Stickel C, Schoenwald U, Truckenbrodt H, Suschke J, Albert ED (1994). Susceptible and protective major histocompatibility complex class II alleles in early-onset pauciarticular juvenile chronic arthritis. *Hum Immunol* 41 (3):225-233.

20. Hasegawa K, Martin F, Huang G, Tumas D, Diehl L, Chan AC (2004). PEST domain-enriched tyrosine phosphatase (PEP) regulation of effector/memory T cells. *Science* 303 (5658):685-689.
21. Hinks A, Worthington J, Thomson W (2006). The association of PTPN22 with rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 45 (4):365-368.
22. Hof P, Pluskey S, Dhe-Paganon S, Eck MJ, Shoelson SE (1998). Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. *Cell* 92 (4):441-450.
23. James ES, Harney S, Wordsworth BP, Cookson WO, Davis SJ, Moffatt MF (2005). PDCD1: a tissue-specific susceptibility locus for inherited inflammatory disorders. *Genes Immun* 6 (5):430-437.
24. Jawaheer D, Seldin MF, Amos CI, Chen WV, Shigeta R, Etzel C, Damle A, Xiao X, Chen D, Lum RF, Monteiro J, Kern M, Criswell LA, Albani S, Nelson JL, Clegg DO, Pope R, Schroeder HW, Jr., Bridges SL, Jr., Pisetsky DS, Ward R, Kastner DL, Wilder RL, Pincus T, Callahan LF, Flemming D, Wener MH, Gregersen PK (2003). Screening the genome for rheumatoid arthritis susceptibility genes: a replication study and combined analysis of 512 multicase families. *Arthritis Rheum* 48 (4):906-916.
25. Kahles H, Ramos-Lopez E, Lange B, Zwermann O, Reincke M, Badenhoop K (2005). Sex-specific association of PTPN22 1858T with type 1 diabetes but not with Hashimoto's thyroiditis or Addison's disease in the German population. *Eur J Endocrinol* 153 (6):895-899.
26. Kim S, Misra A (2007). SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu Rev Biomed Eng* 9:289-320.

27. Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka KV, Maurer M, Wiendl H (2005). A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 58 (1):50-57.
28. Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VE, Chang M, Ramos P, Baechler EC, Batliwalla FM, Novitzke J, Williams AH, Gillett C, Rodine P, Graham RR, Ardlie KG, Gaffney PM, Moser KL, Petri M, Begovich AB, Gregersen PK, Behrens TW (2004). Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet* 75 (3):504-507.
29. Lander ES, Schork NJ (1994). Genetic dissection of complex traits. *Science* 265 (5181):2037-2048.
30. Lang BA, Shore A (1990). A review of current concepts on the pathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* 21:1-15.
31. Lin SC, Yen JH, Tsai JJ, Tsai WC, Ou TT, Liu HW, Chen CJ (2004). Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis, but not systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50 (3):770-775.
32. Maksymowych WP, Adlam N, Lind D, Russell AS (1997). Polymorphism of the LMP2 gene and disease phenotype in ankylosing spondylitis: no association with disease severity. *Clin Rheumatol* 16 (5):461-465.
33. Mangge H, Schauenstein K (1998). Cytokines in juvenile rheumatoid arthritis (JRA). *Cytokine* 10 (6):471-480.

34. McCormack RM, Maxwell AP, Carson D, Patterson CC, Bingham A, Savage DA (2001). Possible association between CTLA4 DNA polymorphisms and early onset type 1 diabetes in a UK population. *Genes Immun* 2 (4):233-235.
35. McDowell TL, Symons JA, Ploski R, Forre O, Duff GW (1995). A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 alpha polymorphism. *Arthritis Rheum* 38 (2):221-228.
36. Milterski B, Drynda S, Boschow G, Klein W, Oppermann J, Kekow J, Epplen JT (2004). Complex genetic predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis. *BMC Genet* 5:2.
37. Moore TL (1999). Immunopathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 11 (5):377-383.
38. Mustelin T, Rahmouni S, Bottini N, Alonso A (2003). Role of protein tyrosine phosphatases in T cell activation. *Immunol Rev* 191:139-147.
39. Mustelin T, Vang T, Bottini N (2005). Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat Rev Immunol* 5 (1):43-57.
40. Nishimura H, Honjo T (2001). PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol* 22 (5):265-268.
41. Ogilvie EM, Fife MS, Thompson SD, Twine N, Tsoras M, Moroldo M, Fisher SA, Lewis CM, Prieur AM, Glass DN, Woo P (2003). The -174G allele of the interleukin-6 gene confers susceptibility to systemic arthritis in children: a multicenter study using simplex and multiplex juvenile idiopathic arthritis families. *Arthritis Rheum* 48 (11):3202-3206.

42. Orozco G, Sanchez E, Gonzalez-Gay MA, Lopez-Nevot MA, Torres B, Caliz R, Ortego-Centeno N, Jimenez-Alonso J, Pascual-Salcedo D, Balsa A, de Pablo R, Nunez-Roldan A, Gonzalez-Escribano MF, Martin J (2005). Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52 (1):219-224.
43. Petty RE, Cassidy JT, Sullivan DB (1973). Clinical correlates of antinuclear antibodies in juvenile rheumatoid arthritis. *J Pediatr* 83 (3):386-389.
44. Petty RE, Southwood TR, Baum J, Bhattay E, Glass DN, Manners P, Maldonado-Cocco J, Suarez-Almazor M, Orozco-Alcala J, Prieur AM (1998). Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997. *J Rheumatol* 25 (10):1991-1994.
45. Pincus T, Callahan LF (1992). Early mortality in RA predicted by poor clinical status. *Bull Rheum Dis* 41 (4):1-4.
46. Ploski R, Undlien DE, Vinje O, Forre O, Thorsby E, Ronningen KS (1994). Polymorphism of human major histocompatibility complex-encoded transporter associated with antigen processing (TAP) genes and susceptibility to juvenile rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 39 (1):54-60.
47. Prahalad S, Ryan MH, Shear ES, Thompson SD, Giannini EH, Glass DN (2000a). Juvenile rheumatoid arthritis: linkage to HLA demonstrated by allele sharing in affected sibpairs. *Arthritis Rheum* 43 (10):2335-2338.
48. Prahalad S, Ryan MH, Shear ES, Thompson SD, Glass DN, Giannini EH (2000b). Twins concordant for juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43 (11):2611-2612.

49. Prahalad S, O'Brien E, Fraser AM, Kerber RA, Mineau GP, Pratt D, Donaldson D, Bamshad MJ, Bohnsack J (2004). Familial aggregation of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 50 (12):4022-4027.
50. Prescott NJ, Fisher SA, Onnie C, Pattni R, Steer S, Sanderson J, Forbes A, Lewis CM, Mathew CG (2005). A general autoimmunity gene (PTPN22) is not associated with inflammatory bowel disease in a British population. *Tissue Antigens* 66 (4):318-320.
51. Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, Brookes AJ, Tentler D, Kristjansdottir H, Grondal G, Bolstad AI, Svenungsson E, Lundberg I, Sturfelt G, Jonssen A, Truedsson L, Lima G, Alcocer-Varela J, Jonsson R, Gyllenstein UB, Harley JB, Alarcon-Segovia D, Steinsson K, Alarcon-Riquelme ME (2002). A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 32 (4):666-669.
52. Prokunina L, Padyukov L, Bennet A, de Faire U, Wiman B, Prince J, Alfredsson L, Klareskog L, Alarcon-Riquelme M (2004). Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope. *Arthritis Rheum* 50 (6):1770-1773.
53. Reddy MV, Johansson M, Sturfelt G, Jonsen A, Gunnarsson I, Svenungsson E, Rantapaa-Dahlqvist S, Alarcon-Riquelme ME (2005). The R620W C/T polymorphism of the gene PTPN22 is associated with SLE independently of the association of PDCD1. *Genes Immun* 6 (8):658-662.
54. Sanjeevi CB, Miller EN, Dabadghao P, Rumba I, Shtauvere A, Denisova A, Clayton D, Blackwell JM (2000). Polymorphism at NRAMP1 and D2S1471

- loci associated with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43 (6):1397-1404.
55. Savolainen A, Isomaki H, Myllykangas-Luosujarvi R, Aho K (2000). Trends in mortality of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 27 (9):2283-2284.
56. Seldin MF, Shigeta R, Laiho K, Li H, Salla H, Savolainen A, Leirisalo-Repo M, Aho K, Tuomilehto-Wolf E, Kaarela K, Kauppi M, Alexander HC, Begovich AB, Tuomilehto J (2005). Finnish case-control and family studies support PTPN22 R620W polymorphism as a risk factor in rheumatoid arthritis, but suggest only minimal or no effect in juvenile idiopathic arthritis. *Genes Immun* 6 (8):720-722.
57. Sharpe AH, Freeman GJ (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2 (2):116-126.
58. Simkins HM, Merriman ME, Highton J, Chapman PT, O'Donnell JL, Jones PB, Gow PJ, McLean L, Pokorny V, Harrison AA, Merriman TR (2005). Association of the PTPN22 locus with rheumatoid arthritis in a New Zealand Caucasian cohort. *Arthritis Rheum* 52 (7):2222-2225.
59. Skorka A, Bednarczuk T, Bar-Andziak E, Nauman J, Ploski R (2005). Lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22/LYP) variant and Graves' disease in a Polish population: association and gene dose-dependent correlation with age of onset. *Clin Endocrinol (Oxf)* 62 (6):679-682.
60. Smyth D, Cooper JD, Collins JE, Heward JM, Franklyn JA, Howson JM, Vella A, Nutland S, Rance HE, Maier L, Barratt BJ, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Dunger DB, Widmer B, Strachan DP, Ring SM, Walker N, Clayton DG, Twells RC, Gough SC, Todd JA (2004). Replication

of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes* 53 (11):3020-3023.

61. Thompson SD, Moroldo MB, Guyer L, Ryan M, Tombragel EM, Shear ES, Prahalad S, Sudman M, Keddache MA, Brown WM, Giannini EH, Langefeld CD, Rich SS, Nichols WC, Glass DN (2004). A genome-wide scan for juvenile rheumatoid arthritis in affected sibpair families provides evidence of linkage. *Arthritis Rheum* 50 (9):2920-2930.
62. Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orru V, Zavattari P, Nika K, Tautz L, Tasken K, Cucca F, Mustelin T, Bottini N (2005). Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet* 37 (12):1317-1319.
63. Velaga MR, Wilson V, Jennings CE, Owen CJ, Herington S, Donaldson PT, Ball SG, James RA, Quinton R, Perros P, Pearce SH (2004). The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 89 (11):5862-5865.
64. Velazquez-Cruz R, Orozco L, Espinosa-Rosales F, Carreno-Manjarrez R, Solis-Vallejo E, Lopez-Lara ND, Ruiz-Lopez IK, Rodriguez-Lozano AL, Estrada-Gil JK, Jimenez-Sanchez G, Baca V (2007). Association of PDCD1 polymorphisms with childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet* 15 (3):336-341.
65. Viken MK, Amundsen SS, Kvien TK, Boberg KM, Gilboe IM, Lilleby V, Sollid LM, Forre OT, Thorsby E, Smerdel A, Lie BA (2005). Association analysis of the 1858C>T polymorphism in the PTPN22 gene in juvenile idiopathic arthritis and other autoimmune diseases. *Genes Immun* 6 (3):271-273.

66. Vyse TJ, Todd JA (1996). Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* 85 (3):311-318.
67. Wandstrat A, Wakeland E (2001). The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol* 2 (9):802-809.
68. Weiss JE, Ilowite NT (2005). Juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Clin North Am* 52 (2):413-442, vi.
69. Wesoly J, van der Helm-van Mil AH, Toes RE, Chokkalingam AP, Carlton VE, Begovich AB, Huizinga TW (2005). Association of the PTPN22 C1858T single-nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis phenotypes in an inception cohort. *Arthritis Rheum* 52 (9):2948-2950.
70. Whitton JL, Fujinami RS (1999). Viruses as triggers of autoimmunity: facts and fantasies. *Curr Opin Microbiol* 2 (4):392-397.
71. Zheng W, She JX (2005). Genetic association between a lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) and type 1 diabetes. *Diabetes* 54 (3):906-908.
72. Zhernakova A, Eerligh P, Wijmenga C, Barrera P, Roep BO, Koeleman BP (2005). Differential association of the PTPN22 coding variant with autoimmune diseases in a Dutch population. *Genes Immun* 6 (6):459-461.