



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

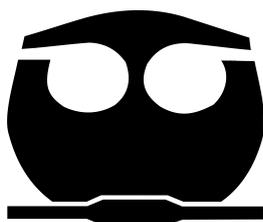
**RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO
GENÉTICO DE LA INTERLEUCINA-1 Y EL
ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DE LA
INTERLEUCINA-1 SOBRE LA INCIDENCIA DE
LA ARTERITIS DE TAKAYASU EN
PACIENTES MEXICANOS**

T E S I S

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

PRESENTA

ERICK NOE HERNÁNDEZ FERREIRA



MÉXICO, D. F.

2010



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.

Jurado asignado

Presidente: José Sullivan López González

Vocal: Alicia Beatriz Cervantes Peredo

Secretario: Ricardo Gamboa Ávila

1^{er}. Suplente: Elpidio García Ramírez

2^o. Suplente: María Benita Leonor Fernández Salgado

Sitio en el que se desarrolló el tema:

Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”
Departamento de Fisiología

Asesor del tema

Dr. Ricardo Gamboa Ávila

Sustentante

Erick Noe Hernández Ferreira

Agradecimientos

Son muchas las personas que me gustaría nombrar en estas líneas, aquellas que han contribuido en diferente medida para la culminación de esta etapa, pero me haría falta escribir una nueva tesis solo para poder agradecerles todo el apoyo prestado, las horas de desvelos, sudor, lágrimas y... ¿por qué no? sangre derramada para llegar hasta aquí. De antemano gracias, muchas gracias a todos los que voluntaria o involuntariamente me ayudaron en este largo trayecto. Sin embargo no puedo dejar de nombrar a algunos que particularmente me han marcado en este andar, aquellos que en todo momento creyeron en mí y me alentaron a seguir hacia adelante.

Quiero hacer mención especial a dos seres extraordinarios que me educaron sobre la base de la perseverancia, la honestidad y la responsabilidad, mi padre, Arturo Hernández Mendoza, y mi madre, Rosa Alicia Ferreira Hernández, que siempre estarán en mi ser y en mis acciones, los amo. Gracias por el amor que siempre me profesaron, por su apoyo, paciencia y comprensión, por ser mi motivación para culminar este trabajo y emprender nuevos proyectos.

A mis hermanos, Uriel y Alex, no puedo sino darles gracias por el tiempo y el amor que siento de su parte, gracias por que cuando sentía que estaba desanimado y decaído, estaban siempre junto a mí, sonriendo y animándome, gracias

Por supuesto que debo un amplio agradecimiento a mi familia, en especial a mis abuelos, Abelardo (†) y Alberto (†), y abuelas, Carmen y Felicitas, por quienes siempre he sentido una profunda admiración por su fuerza y sensibilidad humana.

No puedo dejar de nombrar a la mujer que ha alegrado mi vida, que ha sido mi motivación y pilar para superar cualquier obstáculo sin importar las circunstancias. Gracias Ma. Rosa por ser mi compañera, amiga, confidente, cómplice... mi todo. Gracias mi querida María Rosa por el apoyo constante, la paciencia, comprensión y los consejos en los momentos difíciles. Gracias por enseñarme todo lo que sé, además de la conjugación del verbo "querer". Es que te quiero porque desde el primer momento vi que éramos, juntos, codo a codo, mucho más que dos...

Doy gracias también a la familia González Tepale por su hospitalidad y generosidad.

Igualmente quiero mencionar a mis compañeros de la vida, con quienes me he educado en la carrera más difícil de sortear. Mis hermanos adoptivos Aarón, Alejandro, Christian, Iván y Pedro en quienes encontré el apoyo para seguir la travesía emprendida tantos años atrás, gracias.

Un agradecimiento fraternal a mis colegas y amigos, Silvia, Angélica, Karla, Sandra, Idalia, Deny, Manuel, Héctor y Jacobo, en quienes siempre encontré un diálogo sincero y una disposición a compartir conocimientos. Gracias por sus acertados comentarios durante las múltiples discusiones en esta larga carrera, por los sentimientos de cariño y “calor de hogar” que sentí desde el primer momento en esta universidad.

Es inmenso el aprecio que siento por mi tutor, el Dr. Ricardo Gamboa, quien confió en mis ideas, en mi trabajo y que me apoyó desde el primer día que comenzamos a trabajar juntos. Gracias por dedicarme parte de su tiempo en escucharme, corregirme, aconsejarme y por ser además de un mentor, un amigo. A la Dra. Ma. Elena Soto, gracias por darme la oportunidad de compartir esta idea que me ha adentrado en el mundo de la ciencia.

Doy gracias al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, por permitirme desarrollar esta tesis. Gracias al equipo de laboratorio del Dpto. de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología, dirigido por el Dr. Oscar Pérez. Al equipo de laboratorio del Dpto. de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, encabezado por la Dra. Ariadna González. Gracias por la inestimable ayuda, comentarios, consejos, opiniones, amistad y las tardes de cervezas, en donde no solo se reúnen un equipo de trabajo, sino de amigos.

Finalmente y no por ello menos meritorio, estoy eternamente agradecido a la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme brindado la oportunidad de formarme al más alto nivel, tanto académica como personalmente. Por recordarme que no solo hay que “exprimir” el conocimiento de su fuente, sino que hay que retribuir de manera justa y equitativa dicho intercambio. Quiero expresar mi gratitud a la Facultad de Química, a mis maestros de los distintos cursos que supieron moldear mi espíritu, para ampliarlo al complejo mundo de la sociedad mexicana.

A todos ellos gracias, muchas gracias.

“Si has construido castillos en el aire, no quiere decir que has perdido el tiempo; en el aire es donde han de estar. Ahora pon debajo el cimiento”

Henry David Thoreau

ÍNDICE

Resumen.....	1
Antecedentes.....	2
Definición de la arteritis de Takayasu.....	2
Historia de la arteritis de Takayasu.....	4
Incidencia global de la enfermedad.....	6
Incidencia de la enfermedad en México.....	8
Características clínicas de la enfermedad.....	9
Clasificación de la arteritis de Takayasu.....	12
Diagnóstico de la arteritis de Takayasu.....	13
Etiología de la enfermedad.....	16
Generalidades sobre citocinas.....	18
Interleucina 1 (IL-1).....	21
Organización de la familia de la interleucina-1.....	25
Polimorfismos de la familia de la IL-1.....	32
Hipótesis.....	36
Objetivo.....	37
Diseño experimental.....	38
Descripción.....	38
Definición de la población.....	38
Tamaño de muestra.....	39
Metodología.....	39
Análisis estadístico.....	43
Diagrama de flujo.....	44
Resultados.....	45
Características generales de la población de estudio.....	45
Polimorfismo en la posición -511 del gen IL1B.....	47
Polimorfismo en la posición +3954 del gen IL1B.....	50
VNTR del intrón 2 del gen IL1RN.....	53
Análisis de asociación múltiple de polimorfismos.....	57
Discusión.....	58
Conclusión.....	65
Referencias bibliográficas.....	66
Anexos.....	74
Anexo 1. Carta de consentimiento.....	74
Anexo 2. Extracción de DNA por el método de precipitación salina.....	75
Anexo 3. Amplificación por PCR.....	77
Anexo 4. Gel de agarosa al 3% para electroforesis horizontal.....	78
Anexo 5. Gel de acrilamida al 8% para electroforesis vertical.....	79
Anexo 6. Tinción en plata.....	80
Anexo 7. Cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg.....	81

RESUMEN

Introducción: La arteritis de Takayasu (TA) es una arteritis inflamatoria crónica que involucra mayoritariamente a la aorta y sus ramas principales. Su etiología es desconocida, pero se ha asociado con procesos de inflamación sistémica por fallas del sistema inmune. Las citocinas proteicas, Interleucina-1 β (IL-1 β) y el antagonista del receptor de la interleucina-1 (IL-1Ra) son mediadores muy potentes de la respuesta inflamatoria y actúan en la reparación de tejidos en inflamación crónica, de modo que los genes codificantes para estas citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias son candidatos a estar implicados en la patogénesis de la TA.

Metodología: Se analizaron tres polimorfismos localizados en regiones regulatorias (*IL1B* -511 C>T, *IL1B* +3954 C>T, *IL1RN* VNTR 86 pb) de los genes de las citocinas de la familia de la IL-1 en 58 pacientes mexicanos con TA y 161 individuos mexicanos, no relacionados, clínicamente sanos (grupo control). Las variantes polimórficas se determinaron por PCR-RFLP con enzimas de restricción específicas (*AvaI* y *TaqI* para el caso de los SNP en -511 y +3954 respectivamente) y por determinación directa de los productos de la PCR (para el VNTR en *IL1RN*). Para evaluar el efecto combinado de los tres polimorfismos se realizó el análisis de asociación múltiple nuestra población de estudio.

Resultados: Los resultados de este estudio muestran significancia estadística en la presencia del alelo T en estado heterocigoto en el SNP de +3954 del gen *IL1B* ($p=0.000$, OR 95%=4.5, IC=2.22-9.1) y del alelo 1 en el VNTR del gen *IL1RN* en estado homocigoto ($p=0.009$; OR=2.30, 95%; CI=1.2-4.3) en los pacientes con TA vs controles. Además se encontró asociación de la presencia de los haplotipos (*IL1B* -511/ *IL1B* +3954/ *IL1RN* VNTR) T-T-1 ($p=0.002$; OR=5.24, 95%, CI=1.82-15.14) y C-T-1 ($p=0.001$; OR=13.73, 95%, CI=2.81-67.13) con la enfermedad.

Conclusión: La presencia del alelo T del SNP de +3954 del gen *IL1B* y del alelo 1 en el VNTR del gen *IL1RN* de manera independiente y en combinación están asociados con la susceptibilidad a padecer arteritis de Takayasu en población mexicana.

ANTECEDENTES

- **Definición de la Arteritis de Takayasu.**

La arteritis de Takayasu (TA del inglés *Takayasu's arteritis*), también conocida como “*la enfermedad sin pulso*”, es una arteritis inflamatoria crónica que afecta los vasos grandes e intermedios, con daño frecuente del arco aórtico y sus ramas principales, como las arterias braquiocefálica, carótida, subclavia, vertebral y renal, así como las arterias coronaria y pulmonar⁽¹⁾.

Las manifestaciones clínicas dependen de la localización del daño arterial y de la severidad del mismo, por lo que pueden variar desde un estado asintomático hasta cuando se presenta con daño vascular e involucra órganos, lo que conlleva a situaciones complicadas entre las que destacan el daño cardiovascular, neurológico, renal y pulmonar⁽²⁾. La mayoría de los pacientes presentan desórdenes isquémicos de los vasos, mareos, síncope, disturbios visuales, pulso débil o ausente, o diferencias en la presión sanguínea entre los brazos⁽³⁾.

La inflamación de los vasos lleva al adelgazamiento de la pared, fibrosis, estenosis, y trombosis (Figura 1). Una progresión más aguda de la enfermedad puede causar la destrucción de la media de la pared arterial, lo que deriva en aneurismas o en la ruptura de las arterias involucradas. La TA se caracteriza histológicamente como una panarteritis, que involucra todas las capas de la pared arterial, incluso el adelgazamiento de la íntima fibrosa y/o las lesiones arteromatosas típicas; destruye las células de músculo liso y su capa elástica; produce infiltración celular y fibrosis colágena en la media y la adventicia delgada alrededor del *vasa vasorum*⁽⁴⁾.

Los primeros reportes de la enfermedad sugerían que estaba confinada a mujeres del este de Asia, pero en la actualidad es reconocida en todo el mundo en ambos sexos, aunque las manifestaciones de la enfermedad varían entre poblaciones. La proporción entre mujeres y hombres que padecen esta enfermedad parece disminuir desde el este de Asia hacia los países del oeste⁽¹⁾.

Hay datos que indican una patogenicidad autoinmune, con mecanismos humorales y celulares en la TA⁽³⁾. La infiltración de células inflamatorias y la destrucción de la pared de los vasos, así como el aneurisma aterosclerótico aórtico, sugieren fuertemente la presencia de un mecanismo inmunológico celular como un factor primordial en la patogénesis de esta enfermedad. Sin embargo, el mecanismo preciso de daño a las células vasculares como la principal causa desencadenante del proceso autoinmune aún es desconocido y requiere ser clarificado⁽⁵⁾.

El curso clínico de esta enfermedad suele ser fulminante, éste puede progresar gradualmente con periodos de inactividad seguidos por recaídas, o puede estabilizarse. De ahí que sea crucial el encontrar marcadores apropiados para monitorear su actividad⁽⁶⁾.



Figura 1. Esquema del estrechamiento de la luz de una arteria (estenosis) debido al proceso inflamatorio en esa zona.

- **Historia de la Arteritis de Takayasu.**

La primera descripción de la TA fue hecha en 1830 por Rukushu Yamamoto en un documento de casos de su propia práctica intitulado “*Kitsuo i dan*”, que significa: “*Reportes médicos de mi hospital privado con el gran árbol naranja*”. En él, Yamamoto, quien practicaba la medicina oriental japonesa, describía a un hombre de 45 años que inicialmente lo visitó por fiebre elevada; un año después el paciente se presentó sin pulso en uno de sus brazos y un pulso muy bajo en el otro; después, ambas arterias carótidas se volvieron no palpables, y el paciente se presentó demacrado, con pérdida de peso, acompañado por disnea, y repentinamente murió en el onceavo año de seguimiento ⁽¹⁾.

La primera publicación de esta enfermedad fue registrada en 1905 por Mikito Takayasu (Figura 2a), profesor de oftalmología en la Universidad de Kanazawa, Japón, quien presentó el tema en 1908 en el doceavo encuentro anual de la Sociedad Japonesa de Oftalmología realizado en Fukuoka ⁽²⁾. Él expuso el caso de una mujer de 21 años de edad cuyo fondo óptico exhibía una anastomosis coronaria peculiar (Figura 2b). En el mismo encuentro K. Onishi y T. Kagoshima, ambos con sus propios casos con características similares en el fondo óptico de sus pacientes, resaltaron la ausencia de pulso no radial en sus pacientes ⁽⁴⁾.

Takayasu no mencionó la ausencia de pulso en su paciente e indicó que no tenía anormalidades en su examen médico; por ello, algunos médicos insistieron en la apelación de esta enfermedad como “*enfermedad de Takayasu-Onishi*”. En 1920, K. Ohta, presenta el caso de una necropsia de una paciente femenina de 25 años de edad, en donde demostró una panarteritis que involucraba la íntima, media y adventicia, y sugirió que el fondo óptico característico encontrado era el resultado de la isquemia por la obstrucción de los vasos cervicales ⁽²⁾. Poco tiempo después de los primeros reportes, muchos casos fueron reportados en Japón. No fue hasta 1939 que Y. Shinmi utilizó por primera vez el término de “*arteritis de Takayasu*” en un reporte médico ⁽⁴⁾.

En 1951, K. Shimizu y K. Sano, del departamento de cirugía de la Universidad de Tokio, resumieron los síntomas clínicos de la TA en un diario Inglés bajo el nombre de “*pulseless disease*” (enfermedad sin pulso) ⁽²⁾. Aún cuando algunos casos fueron reconocidos por diversos autores en el siglo anterior, fueron Caccamise y Whitman quienes, en 1952, introdujeron el término de “*arteritis de Takayasu*” a los países de occidente en el *American Heart Journal* ⁽³⁾. En 1975, el comité de investigación del Departamento de Salud y Bienestar de Japón propuso el uso de “*arteritis de Takayasu*” en honor a quien realizó su primera descripción formal ⁽⁴⁾. Otros sinónimos de la enfermedad son: enfermedad sin pulso, síndrome de arco aórtico, síndrome medioaórtico, tromboarropatía oclusiva y arteritis no específica, entre muchos otros ⁽¹⁾. A pesar de la variedad en la nomenclatura, el término de “*arteritis de Takayasu*” es reconocido universalmente ⁽⁶⁾.

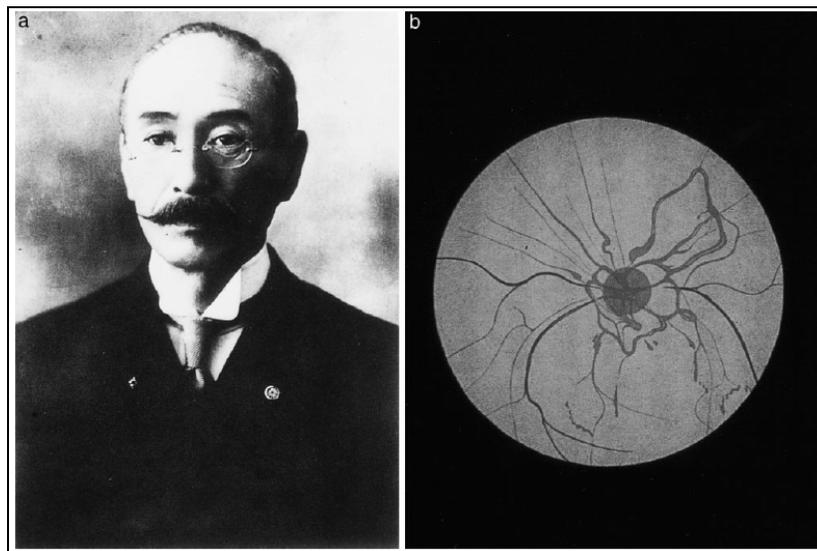


Figura 2. a) Dr. Mikito Takayasu (1859-1938). b) Imagen de una anastomosis coronaria de la vasculatura retinal, la cual fue bosquejada en 1905 y presentada en el doceavo encuentro anual de la sociedad japonesa de oftalmología en 1908 ⁽⁴⁾.

- **Incidencia global de la enfermedad.**

La TA es una enfermedad poco común, con una distribución mundial, pero tiene una alta prevalencia en países asiáticos como Japón, Corea, China, India, Tailandia, Singapur, Israel y Turquía, entre otros; así como en países de América central y Sudamérica como Perú, Colombia, México, Brasil y Chile; con una baja prevalencia en poblaciones caucásicas de Europa y Norteamérica ⁽³⁾.

Una de las características epidemiológicas clave de la arteritis de Takayasu es la preponderancia de la enfermedad en mujeres jóvenes ⁽²⁾; del 80 al 90% de los pacientes son mujeres y la proporción entre géneros varía según la población. La edad de inicio de los síntomas varía de los 10 años hasta 40 años, con una edad media de 25 años. De forma interesante, una encuesta internacional realizada por Numano y col. ⁽²⁾, reveló que la proporción mujer-hombre (M: H) decrece mientras uno se mueve hacia el oeste y varía en las distintas poblaciones, desde 9: 1 (Japón) hasta 1.2:1 (Suecia), e n México l a r elación es de aproximadamente 6.9:1 ⁽³⁾ (Tabla 1).

También se han observado diferencias en el comportamiento de la enfermedad de acuerdo a la zona aortica involucrada con respecto a la región geográfica estudiada; de modo que, en Japón se afecta a la aorta ascendente mayoritariamente; e n ot ros paí ses de A sia, l a aorta a bdominal es tá más frecuentemente involucrada, y en países como India, Tailandia y México es más típica l a pr esencia de aneurismas en la aorta t orácica y ab dominal ^(3, 4). Esto sugiere una variación en l a pat ogénesis de l a en fermedad debido a di ferencias étnicas y/o ambientales ⁽⁴⁾.

Tabla 1. Proporción entre pacientes mujeres y hombres con TA ⁽²⁾.

País	Número de casos	Mujeres	Hombres	Proporción mujer/hombre
Japón	2148	1909	239	8.0/1
Corea	47	40	7	5.7/1
China	500	370	130	2.8/1
Tailandia	63	43	20	2.2/1
India	106	65	41	1.6/1
Israel	56	32	18	1.8/1
Turquía	14	11	3	3.7/1
México	237	207	30	6.9/1
Brasil	73	61	12	5.1/1
Colombia	35	26	9	2.9/1

- **Incidencia de la enfermedad en México.**

En México, en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, el primer caso de esta enfermedad fue mencionada por Puig-Solanes en 1946, pero fue hasta 1957 cuando se publicó, y desde entonces se ha estudiado ⁽³⁾. En el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, en la Ciudad de México, la incidencia de la arteritis de Takayasu relacionada a la edad es de 9 casos en 10,000 hospitalizados por lustro (Tabla 2). En nuestro país, la TA se denominó arteritis inespecífica durante varios años y con tal nombre aparecieron algunas referencias en la literatura ⁽⁷⁾.

Tabla 2. Incidencia relacionada a la edad en casos de pacientes con arteritis de Takayasu en el Instituto Nacional de Cardiología.

Periodo	Edad				Casos	Hospitalización Total anual	Incidencia Casos/10,000/ Periodo
	10-19 años	20-29 años	30-39 años	40-49 años			
1976- 1979	1	1	2	0	4	14,499	2.7
1980- 1984	2	6	3	1	12	11,649	10.3
1985- 1989	8	14	8	1	31	24,537	12.6
1990- 1994	9	12	1	4	26	23,127	11.2
1995- 1999	6	5	8	1	20	20,940	9.5
2000- 2003	4	5	2	6	17	24,186	7.0
Total	30	43	24	13	110	118,938	9/10,000/ periodo

Datos personales de la Dra. Ma. Elena Soto. Instituto Nacional de Cardiología.

- **Características clínicas de la enfermedad.**

El rango de manifestaciones de la enfermedad varía desde casos asintomáticos encontrados como: hallazgos casuales de pulsos y presión arterial desigual en extremidades, soplos e hipertensión hasta presentaciones iniciales como formas severas y desastrosas. Un patrón trifásico progresivo se ha sugerido para la evolución de la enfermedad (Tabla 3): fase I, describe el periodo pre-inflamatorio y pre-no pulso, caracterizado por manifestaciones clínicas no específicas tales como fiebre, artralgias y pérdida de peso; fase II, involucra inflamación de los vasos, dominados por dolor de los vasos y sensibilidad; fase III, se refiere al estado fibrótico, en donde los soplos y la isquemia predominan. No todos los pacientes siguen este patrón ⁽³⁾.

Tabla 3. Patrón trifásico progresivo de la TA ⁽³⁾.

Fase	Características
I	Describe el periodo pre-inflamatorio y pre-no pulso, caracterizado por manifestaciones clínicas no específicas (fiebre, artralgias y pérdida de peso)
II	Involucra la inflamación de los vasos, dominados por el dolor de los vasos y sensibilidad.
III	Se refiere al estado fibrótico, en donde los soplos y la isquemia predominan.

La enfermedad puede localizarse en una porción de la aorta abdominal y torácica y sus ramas, o involucrar a toda la aorta; las arterias pulmonares también se afectan en más de la mitad de los casos. En orden descendente de frecuencia, están afectadas las siguientes arterias: subclavia (85%), descendente (58%), renal (56%), carótida (43%), ascendente (30%), aorta abdominal (20%), vertebral (17%), iliaca (16%), innominada (15%) y pulmonar (15%) ⁽³⁾.

La enfermedad comúnmente se presenta entre la segunda y tercera década de vida, con frecuencia el diagnóstico no se establece en la etapa inicial, sino como resultado de manifestaciones tardías, muchas de ellas secundarias a un daño arterial establecido y definitivo, este retraso en el diagnóstico puede ir desde meses hasta años ⁽³⁾. En la fase aguda, ocurre una inflamación extensa con infiltrados celulares masivos y daño severo en los tejidos vasculares, mientras que en la fase crónica, hay una inflamación local que ocasiona daño vascular persistente, además pueden desarrollarse lesiones con características patológicas semejantes a un aneurisma arteroesclerótico aórtico ^(1, 6).

Los síntomas no específicos incluyen fiebre, sudor nocturno, pérdida de peso, artralgia, mialgia y anemia leve; tan pronto como la inflamación progresa y se desarrolla la estenosis, los síntomas más característicos se vuelven aparentes y un flujo sanguíneo colateral puede desarrollarse para compensar la falta de irrigación en el área dañada. La estenosis de las ramas de la arteria aorta son las lesiones típicas de la TA ⁽¹⁾, por lo que pueden presentarse síntomas como la claudicación de brazos y piernas, isquemias de órganos, hallazgos clínicos de pulso y presión sanguínea desiguales (Tabla 4); los vasos sanguíneos de la cabeza y miembros superiores son los más frecuentemente afectados. El desarrollo de estos síntomas depende de la presencia de perfusión colateral ⁽³⁾.

La afección cardíaca se presenta como angina, infarto del miocardio, paro cardíaco o muerte súbita. La baja presencia de dilataciones aneurismales en la vasculatura pulmonar ayuda a diferenciar a la TA de otros padecimientos que cursan por un proceso inflamatorio crónico, como la enfermedad de Behcets. Las enfermedades del tejido conectivo tienden a afectar los vasos pulmonares pequeños y las lesiones sistémicas estenóticas típicas distinguen a la TA de la enfermedad tromboembólica pulmonar. Los síntomas neurológicos dependen del compromiso de las cuatro ramas cerebrales del arco de la aorta; las convulsiones son poco frecuentes y se asocian a encefalopatía hipertensiva; el dolor y sensibilidad en los vasos carotídeos es común; la enfermedad de la retina resulta

del compromiso en la circulación de la carótida con hipoperfusión concomitante de la retina central; las manifestaciones en piel más comunes son el eritema nodoso y la piodermia gangrenosa, no hay relación entre el sitio de las lesiones de la piel y el vaso afectado ⁽⁸⁾.

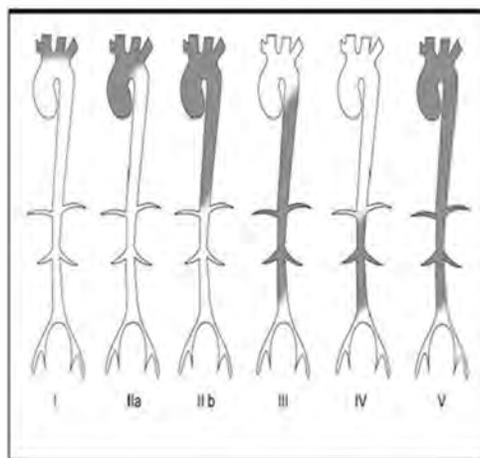
Tabla 4. Síntomas característicos de la TA ^(1, 2).

Síntomas
Disminución o ausencia de pulso.
Vasculitis crónica que afecta la íntima, media y adventicia de los vasos grandes del cuello, tórax y abdomen.
Presentación clínica con dolores localizados, síntomas y señales de regiones de isquemia por estenosis y trombosis.
Raramente se presentan con ruptura de vasos.
Cuando se involucra con la aorta ascendente puede causar regurgitación aórtica.
Puede causar la muerte por hipertensión renovascular.
Otros síntomas incluyen la disnea, dolores de cabeza, carotodinia, isquemia miocárdica, dolor en las paredes del pecho, y eritema nodoso.

- **Clasificación de la arteritis de Takayasu.**

Existen varias clasificaciones para esta enfermedad, en este trabajo se utilizó la presentada en la conferencia de la arteritis de Takayasu de 1994. Esta clasificación está basada en la región anatómica en la que se presenta el daño, se distinguen cinco tipos diferentes (Figura 3). Este sistema es muy útil debido a que hace una comparación de las características del paciente de acuerdo a los vasos involucrados y ayuda para planear la cirugía ⁽¹⁾.

Figura 3. Clasificación angiográfica de la arteritis de Takayasu ⁽²⁾.



Cuando se involucran las arterias coronaria o pulmonar deben ser designadas como C(+) o P(+).

- **Diagnóstico de la arteritis de Takayasu.**

Hay evidencia de que la TA se inicia en la primera o segunda década de la vida, y en esta época, suele ser una enfermedad grave e incluso mortal en casi un tercio de los enfermos; pero no es diagnosticada si no has ta q ue apar ecen manifestaciones de morbilidad co mo se cuela de l as graves lesiones arteriales estenosantes ⁽⁷⁾. A partir de l as características más típicas de la TA, el Colegio Americano d e R eumatología (ACR) def inió en 199 0 un cr iterio di agnóstico específico para este desorden (Tabla 5) ⁽¹⁾.

Tabla 5. Criterios de diagnóstico para la arteritis de Takayasu del ACR, 1990. Su diagnóstico requiere al menos 3 de los 6 criterios presentes ⁽¹⁾.

Edad al inicio de la enfermedad < 40 años
• Aparición o desarrollo de los síntomas característicos a una edad menor a los 40 años.
Claudicación de las extremidades
• Desarrollo y empeoramiento de fatiga y malestar en músculos de 1 o más extremidades mientras están en uso, especialmente las extremidades superiores.
Decaimiento del pulso de la arteria branquial
• Decaimiento de las pulsaciones de una o ambas arterias branquiales.
Diferencia en la presión sanguínea > 10 mm Hg
• Diferencia de más de 10 mm Hg en la presión sanguínea sistólica entre brazos.
Soplo sobre la arteria subclavia o de la aorta
• Soplo audible en auscultación en una o ambas arteria(s) subclavia(s) o en la aorta abdominal.
Arteriograma anormal
• Adelgazamiento u oclusión arteriográficas de la aorta completa, sus ramas principales, o en arterias grandes de las extremidades proximales superiores e inferiores, no causadas por arterioesclerosis, displasia fibromuscular o casos similares; cambios generalmente focales o segmentales.

No existe una prueba de laboratorio diagnóstica o específica de la TA, no hay parámetros de laboratorio específicos que indiquen la actividad inflamatoria. Se puede encontrar una anemia normocítica normocrómica, trombocitosis de leve a moderada, hipergammaglobulinemia, presencia de la proteína C reactiva (PCR), aumento del valor de sedimentación eritrocitaria (ESR), pero estos datos no son patognomónicos ⁽³⁾.

La angiografía es el estándar de oro para detectar la enfermedad de los vasos en la TA, debido a que, tanto la extensión y la naturaleza de los vasos involucrados son bien identificadas con esta técnica y, por ser un método invasivo, permite medir la presión arterial a través de la lesión estenótica. Una aortografía completa se recomienda en la evaluación inicial de la TA; las lesiones son más a menudo en segmentos largos, se presentan como lesiones de estenosis u oclusión arterial de la aorta y vasos viscerales (figuras 4); los aneurismas pueden ser saculares o fusiformes (figura 5) y afectan principalmente a la aorta. En algunas ocasiones se puede observar circulación colateral en la zona afectada ⁽³⁾.

La angiografía dibuja la permeabilidad de los vasos pero no proporciona una adecuada información sobre el estado inflamatorio de la pared de los vasos ⁽³⁾, de aquí que los hallazgos encontrados no excluyen la presencia de una ocurrencia temprana ni de la fase activa de la enfermedad; los hallazgos en la angiografía para evaluar la actividad de la TA o su progresión, deben ser interpretados dentro del contexto clínico de cada caso. Las limitaciones para realizar estudios angiográficos para el monitoreo de la progresión de la enfermedad son su requerimiento de volúmenes relativamente grandes de medio de contraste y, por lo tanto, la acumulación de material radiactivo, además requiere de equipo especializado y de personal con experiencia ⁽⁷⁾.

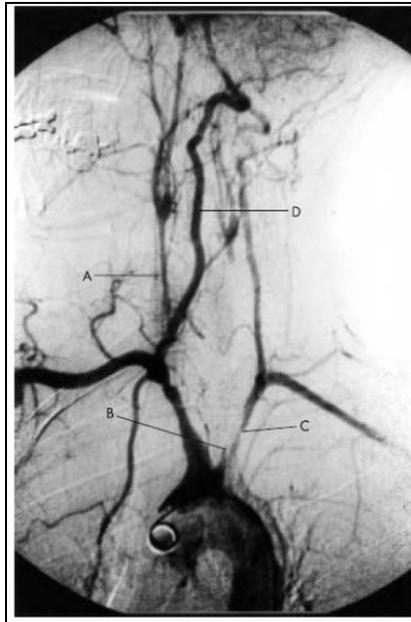


Figura 4. Arteriograma que muestra (A) una arteria carótida derecha común muy delgada, (B) oclusión de la arteria carótida izquierda común y, (C) estenosis proximal de la arteria subclavia izquierda. (D) la arteria vertebral derecha provee el sustento cerebral dominante ⁽¹⁾.

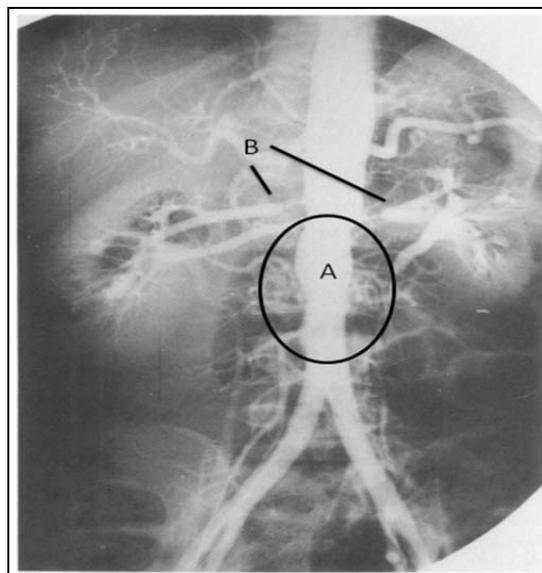


Figura 5. Arteriograma pre-operativo en la que se muestra: (A) un aneurisma bilateral, y (B) estenosis bilateral severa de la arteria renal ⁽⁹⁾.

- **Etiología de la enfermedad.**

La causa de la TA es desconocida, pero características como su fuerte predilección hacia las mujeres, diferencias étnicas, una alta incidencia en países de Asia, Centro y Sudamérica, la presencia de casos con agregación familiar y en gemelos monocigóticos, indican una aportación considerable de factores genéticos en la susceptibilidad hacia la patogénesis de esta enfermedad. ⁽¹⁰⁾

La TA ha sido asociada con los genes de clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad o MHC (del inglés *Major Histocompatible Complex*) ⁽¹⁾. Es bien sabido que los linfocitos no pueden reconocer y responder a un antígeno a menos que hayan formado un complejo con una molécula del antígeno leucocitario humano o HLA (del inglés *Human Leucocyte Antigen*) en la superficie de una célula presentadora de antígeno ⁽¹¹⁾. Aún más, las interacciones célula-célula en la respuesta inmune se sabe que están mediadas por las moléculas de adhesión expresadas en ambas células, las inmunes y las blanco ⁽⁸⁾. Las moléculas de adhesión intercelulares-1 o ICAM-1 (del inglés *Intercellular adhesion molecule-1*), son un ligando para la función asociada de antígenos de clase I del HLA con linfocitos e integrinas, se conoce que permiten a los linfocitos adherirse y posteriormente rotar a lo largo de la superficie de las células endoteliales ⁽¹²⁾.

Se han realizado varios estudios mediante análisis serológico de antígenos de clase I y II del HLA, y se ha demostrado la asociación sostenida por mecanismos inmunopatológicos de un tipo específico con la enfermedad; no obstante, los resultados en diversas poblaciones no son consistentes ⁽²⁾. En Japón y Corea se ha observado una clara relación con el haplotipo extendido: HLA-B*52, DRB1*1502, DRB5*0102, DQA1*0103, DQB1*0601, DPA1*02-DPB1*0901 ⁽¹⁾. El análisis secuencial de estos alelos mostró que algunos comparten epítopes específicos, por lo que la presencia de estos podría ser un factor de susceptibilidad a la enfermedad ⁽¹⁾. Reportes en México e India revelan una alta frecuencia de HLA-B5 y B21 ⁽³⁾; otros estudios en México indican la asociación con HLA-B39, DR6 ⁽⁸⁾. Esta conjunción con el HLA es para algunos el argumento más

fuerte a favor de una patogénesis autoinmune, pero a pesar de estos resultados, la relación entre la TA y ciertos subtipos de HLA permanece incierta ^(10, 13).

Por otro lado, hallazgos histológicos de infiltración de células inflamatorias y necrosis de las células endoteliales de vasos afectados, sugieren que el mecanismo de autoinmunidad mediado por células juega un papel primordial en la patogénesis involucrada ⁽³⁾. Se ha demostrado en pacientes con TA una interacción de las células T con proteínas endoteliales y de la matriz extracelular ^(1, 3, 8, 13, 14), como causante de daño vascular y puede llevar a la formación de aneurismas. Se han reportado aumentos en la expresión de las proteínas formadoras de poros (perforinas) ⁽⁸⁾, así como de marcadores de la actividad celular de las células NK ⁽⁶⁾ y de una proteína de choque térmico de 65 kDa en el tejido aórtico de pacientes con la enfermedad ⁽⁸⁾.

Los niveles altos de γ -globulinas, complejos inmunes circulantes y el factor reumatoide, proveen evidencia de la participación de mecanismos humorales en la patogénesis de la TA ⁽³⁾. En pacientes se han encontrado anticuerpos anti-células endoteliales o AECA (del inglés *Anti-Endothelial Cell Antibodies*), y se ha observado que estos se unen principalmente a las moléculas de unión de las membranas ⁽¹³⁾. La diversidad de los AECA asociados a enfermedades sugiere anticuerpos heterogéneos, algunos de los potencialmente patogénicos que pueden inducir la autoinmunidad; algunos pueden aparecer como consecuencia del daño vascular inflamatorio, o debido al factor directamente involucrado en el proceso de patogénesis ⁽¹⁵⁾.

- **Generalidades sobre citocinas.**

Las citocinas son proteínas secretadas que median y regulan las reacciones inmunitarias e inflamatorias; tienen bajo peso molecular, generalmente de 15-25 kDa, son muy potentes, a menudo actúan en bajas concentraciones (10^{-15} M), y se combinan con pequeñas cantidades de receptores de la superficie celular para producir sus funciones ⁽¹²⁾. Son sintetizadas por diferentes poblaciones celulares en respuesta a microorganismos y otros antígenos. Sus acciones son frecuentemente pleiotrópicas, o sea que ejercen múltiples efectos sobre distintos tipos celulares, lo que les permite mediar diversos efectos biológicos ⁽¹⁶⁾; además existe entre ellas superposición y redundancia con respecto a sus funciones individuales, lo que se explica en parte porque comparten componentes de receptores y utilizan factores de transcripción comunes. Sin embargo, debe destacarse que casi todas tienen propiedades singulares ⁽¹²⁾. Inician sus funciones al unirse a receptores específicos de alta afinidad en las células diana. La mayoría de las células expresa concentraciones bajas de receptores para citocinas y señales externas regulan la expresión de los receptores y, por tanto, la reactividad de las células con estas proteínas ⁽¹⁶⁾.

Sus principales funciones (tabla 6) se relacionan con el crecimiento y diferenciación celular, el proceso inflamatorio, y la regulación de la respuesta inmune ⁽¹⁷⁾. Las citocinas que median y regulan la inmunidad innata actúan sobre células endoteliales y leucocitos para estimular las reacciones inflamatorias tempranas frente a microorganismos, así como para controlar estas respuestas. Estas son sintetizadas principalmente por los fagocitos mononucleares, las células NK y también pueden ser secretadas por macrófagos activados por linfocitos T estimulados por el antígeno (es decir, como parte de la inmunidad celular adaptativa). Las citocinas que actúan en la inmunidad adaptativa lo hacen principalmente regulando el crecimiento y la diferenciación de diversas poblaciones linfocíticas, atraen, activan y regulan células efectoras especializadas para eliminar a los antígenos en la fase efectora de la respuesta inmune

adaptativa. Estas son sintetizadas principalmente por los linfocitos T en respuesta al reconocimiento específico de antígenos extraños ⁽¹⁶⁾.

También estimulan el desarrollo de las células hematopoyéticas, pues la diferenciación de las células madre, para convertirse en los elementos formes de la sangre dentro del ambiente de la médula ósea, es nutrida a través de la producción de citocinas por las células de la estroma ⁽¹²⁾.

Las señales transmitidas por las citocinas originan una serie de eventos que son necesarios para limitar, rechazar, reparar o exacerbar inmunológicamente cualquier clase de daño tisular ⁽¹⁷⁾. Dado que regulan la amplitud y duración de las respuestas inmunoinflamatorias, la secreción de estas proteínas es un fenómeno breve y autolimitado ⁽¹²⁾. Generalmente no se almacenan como moléculas preformadas, y su síntesis se inicia por transcripción génica nueva como consecuencia de la activación celular. Esta activación de la transcripción es transitoria, y los RNAs mensajeros son inestables, por lo que la síntesis de citocinas también es transitoria. Además, la síntesis de algunas de ellas puede ser mediada por el procesamiento del RNA y por mecanismos postraduccionales, como la liberación proteolítica de un producto activo a partir de un precursor inactivo. Una vez sintetizadas, las citocinas se secretan rápidamente ⁽¹⁶⁾.

Sus funciones pueden ser locales y sistémicas; la mayoría actúa cerca de su lugar de producción, en la misma célula que la secreta (acción autocrina) o en una célula próxima (acción paracrina). Cuando se producen en cantidades grandes pueden entrar en circulación, actuar a distancia (acción endocrina) y provocar efectos sistémicos ⁽¹⁶⁾. Las relaciones entre las diferentes citocinas están mediadas por acontecimientos celulares, estas interacciones pueden darse por medio de una cascada en la cual una citocina induce la producción de otra, a través de la transmodulación del receptor para ella y del sinergismo o antagonismo de dos de ellas que actúan sobre la misma célula ⁽¹²⁾.

Las respuestas celulares a las citocinas están reguladas estrechamente, y hay mecanismos inhibidores de retroalimentación para inactivar estas respuestas. Estos mecanismos incluyen la inducción de genes que codifican inhibidores de los receptores de las citocinas o de las vías de transducción de señales activadas por los receptores. Además, existen receptores “señuelo”, moléculas que bloquean las interacciones de cinasas de transducción de señales, fosfatasa que contrarrestan los efectos de las cinasas activadoras y moléculas que bloquean las interacciones productivas de factores de transcripción inducidos por citocinas con el DNA ⁽¹⁶⁾.

Tabla 6. Principales tipos de citocinas ⁽¹²⁾.

nombre	abreviatura	ejemplos
interleucinas	IL	IL-1, IL-2, etc.
interferones	IFN	IFN α , IFN β , IFN γ
factores de necrosis tumoral	TNF	TNF α , TNF β
factores de crecimiento	GF	NGF, EGF
factores estimuladores de colonias	CSF	M-CSF, G-CSF, GM-CSF
quimiocinas	-	RANTES, MCP-1, MIP-1 α

Las interleucinas son consideradas mensajeros necesarios para modular las reacciones inflamatorias, las cuales representan el mecanismo eferente más importante de la respuesta inmunitaria. Sin embargo, también actúan como factores que retroalimentan la actividad del tejido hematopoyético, co-estimulan la diferenciación de los linfocitos que han reconocido un antígeno y modulan la cantidad de hormonas producidas por varias glándulas de secreción interna ⁽¹²⁾.

- **Interleucina 1 (IL-1)**

La IL-1 es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda frente a microorganismos infecciosos, y es responsable de muchas de las complicaciones sistémicas de las infecciones graves. Su función principal es actuar como mediador de la respuesta inmunitaria del hospedero frente a infecciones y otros estímulos (traumatismos, tumores y otros agentes agresivos). La IL-1 actúa en la inmunidad innata y en la inflamación ⁽¹⁶⁾. Es el prototipo de las citocinas pro-inflamatorias, puede inducir o reprimir la expresión de una gran variedad de genes, junto con la presencia de otros estimulantes, particularmente lectinas o agentes que incrementan el calcio citosólico ⁽¹⁸⁾. También promueve la síntesis de diversas proteínas; las cuales, en su momento, inducen una cascada de moléculas efectoras pro-inflamatorias ⁽¹⁹⁾.

Esta citocina puede ser producida por muchos tipos de células, las principales son macrófagos, monocitos, células endoteliales, células de músculo liso, queratinocitos, fibroblastos, los linfocitos T y B, células dendríticas, neutrófilos y hepatocitos ^(16, 19, 20). La cantidad de IL-1 secretada depende del tipo de célula y las condiciones de la estimulación. Su producción puede ser estimulada por adyuvantes, como el muramilo péptido, lipopolisacáridos (LPS) y/o endotoxinas presentes en la pared celular de diversos microorganismos ⁽¹⁶⁾, que se unen a receptores de tipo *Toll* (TLR) y estimulan la liberación de IL-1 de estas células ⁽¹⁹⁾. Otros inductores son las sustancias activadoras de los linfocitos, como el TNF- α , los factores estimuladores de colonias (CSF) y el INF- γ ⁽²¹⁾.

Los efectos biológicos de la IL-1 dependen de la cantidad de citocina secretada, a concentraciones bajas actúa como mediador de la inflamación local sobre las células endoteliales para aumentar la expresión de moléculas de superficie que median la adhesión leucocitaria, como ligandos para integrinas. Mientras que, cuando se secreta en cantidades mayores, la IL-1 entra en el torrente sanguíneo y ejerce efectos endócrinos, como la inducción de fiebre, la

síntesis de proteínas de fase aguda por el hígado y producción de neutrófilos y plaquetas por la médula ósea (figura 6) ⁽¹⁶⁾.

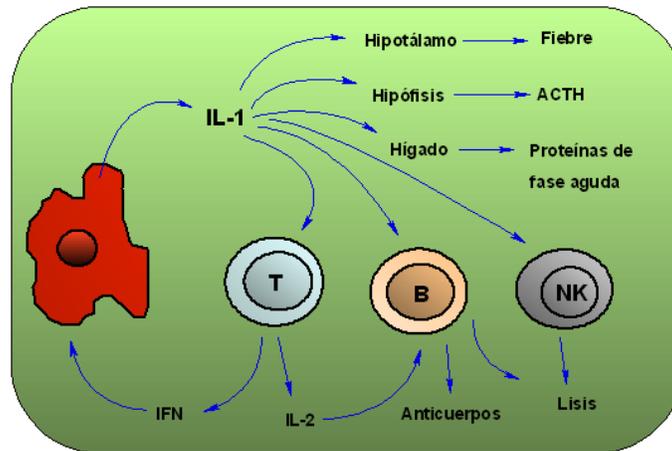


Figura 6. Esquema de las principales actividades de la IL-1 ⁽¹⁷⁾.

La IL-1 al interactuar con su receptor en la célula blanco desencadena una compleja red de vías de señalización que permiten la expresión de un número significativo de genes y la síntesis de diversas proteínas ⁽¹⁹⁾. Dentro de las principales actividades de la IL-1 (tabla 7) está la de estimular la multiplicación de los linfocitos T, promover su diferenciación a T colaboradores (Th1) los cuales liberan IL-2 e IFN- γ , y que a su vez estimulan la respuesta de los linfocitos T citotóxicos ⁽²¹⁾. La IL-1 también activa a los linfocitos Th2 y, además, resulta un cofactor para estimular la diferenciación y proliferación de los linfocitos B, de los cuales depende la producción de anticuerpos; por lo que expande la respuesta celular y humoral del sistema inmune ⁽¹⁷⁾.

Muchos de los efectos pro-inflamatorios inducidos por la IL-1 dependen de su capacidad para, a través del factor de transcripción kappa B (NF- κ B), provocar un aumento en la síntesis de otras citocinas ⁽²²⁾. Cuando la IL-1 estimula al eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal induce la fiebre a través de un efecto directo en el centro regulador de la temperatura en el hipotálamo, posiblemente por estimular

la producción de varias sustancias inflamatorias derivadas del ácido araquidónico ⁽¹⁷⁾, y de manera indirecta, promueve la quimiotaxis y la desgranulación de neutrófilos y macrófagos; produce la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), aumenta la síntesis de glucocorticoides, el factor liberador de la corticotropina (CRF) y proteínas de fase aguda en el hígado ⁽¹⁷⁾.

Tabla 7. Principales actividades biológicas de la IL-1 ⁽¹⁷⁾.

Interleucina -1
• Estimula linfocitos T
• Aumenta la síntesis de IL-2, IL-4 e IFN- γ
• Aumenta la expresión de TCR
• Estimula linfocitos B
• Aumenta la síntesis de anticuerpos
• Estimula hipotálamo
• Estimula hepatocitos (APP)
• Estimula hipófisis (ACTH)
• Promueve la quimiotaxis de PMN
• Estimula la desgranulación de PMN
• Estimula la producción de prostaglandinas
• Provoca hipertensión y shock
• Disminuye Zn ²⁺ y Fe ² en el suero
• Estimula la proliferación de fibroblastos
• Aumenta la producción de colagenasa
• Estimula osteoblastos y osteoclastos
• Estimula las células endoteliales
• Facilita la síntesis de IL-6, IL-8, TNF y TGF- β

Además estimula la síntesis de moléculas de adhesión intercelular sobre la membrana de las células endoteliales y, de este modo, facilita la extravasación de los leucocitos. En las células de músculo liso, la IL-1 incrementa la síntesis de sí misma y de otras citocinas; también sirve como un factor de crecimiento autocrino para estas células ⁽¹⁶⁾. Estos efectos se cree que tienen un papel en el desarrollo de aterosclerosis y neo-vascularización ⁽²¹⁾.

La respuesta aguda es una reacción sistémica a la infección. La proteólisis del músculo causa un incremento de los aminoácidos disponibles, los cuales son utilizados por los hepatocitos para la síntesis de estas proteínas; la fiebre estimula que los linfocitos proliferen; los niveles bajos de zinc y hierro en la sangre inhiben la replicación de microorganismos; y se presenta un incremento rápido de los niveles de neutrófilos en sangre. Si esta respuesta se estimula de forma crónica, como ocurre en infecciones persistentes (tuberculosis), puede resultar en daño al tejido afectado ⁽¹⁸⁾.

A diferencia de otras citocinas, la IL-1 ejerce un control sobre la inflamación tanto a nivel nuclear como a nivel de su receptor ⁽²⁰⁾. La IL-1 media sus efectos biológicos a través de un receptor de membrana denominado receptor de la IL-1 de tipo I, que participa en las vías de transducción de señales que activan los factores de transcripción NF- κ B y AP-1. Los fenómenos de transducción de señales que se producen cuando la IL-1 se une al receptor de la IL-1 de tipo I son similares a los que se asocian a los TLR. La transducción de señales supone varios fenómenos de fosforilación y formación de nuevos complejos con otras cinasas y proteínas adaptadoras, que finalmente activan el NF- κ B ⁽¹⁶⁾.

La regulación de la actividad de IL-1 puede ocurrir en múltiples niveles. Por ejemplo, las prostaglandinas (PG) participan, lo mismo que los glucocorticoides, en un mecanismo de retroalimentación negativa. La síntesis de la PGE₂ se incrementa por IL-1 al activar las enzimas fosfolipasas de la membrana y la PGE₂ es un regulador de la liberación de IL-1 mediante la vía de la AMP cíclico; este efecto también se observa por la vía del fosfoinositol (PIP) pues al inhibir a la proteína cinasa C también se reduce la cantidad de citocina que se libera ⁽²¹⁾. Fuera de la célula, la concentración funcional de IL-1 puede disminuir por la acción de un receptor señuelo para la IL-1, el cual no produce la señalización. Además existe una molécula antagonista producida naturalmente, el receptor antagonista de la IL-1 (IL-1Ra), que ocupa competitivamente al receptor para la IL-1 pero es incapaz de desencadenar la ruta mediada por esta citocina ⁽¹⁹⁾.

- **Organización de la familia de la Interleucina-1.**

El término de interleucina-1 es utilizado para dos proteínas distintas pero relacionadas: la interleucina-1 α (IL-1 α) y la interleucina-1 β (IL-1 β). Ambas son producidas como precursores de 31 kDa que se someten a escisión proteolítica por proteasas específicas durante su maduración ⁽¹⁹⁾. Los genes que codifican para la IL-1 están localizados en el brazo largo del cromosoma 2 (2q13-21) ⁽²³⁾, el agrupamiento genético consiste de tres genes homólogos: *IL1A*, *IL1B* e *IL1RN* que codifican para tres glicoproteínas distintas: IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra, respectivamente; cada uno de las cuales parece estar bajo un control transcripcional independiente ⁽¹⁸⁾.

Ambas proteínas con actividad de IL-1 (α y β) se sintetizan en forma de precursores de 31 kDa (pro-IL-1) con valores de punto isoeléctrico (pI) distinto (pI=7.2 y pI=5.3 respectivamente). El gen de la IL-1 β humana (*IL1B*) es de 7.8 kb, el gen de la IL-1 α humana (*IL1A*) es de 10.5 kb, cada gen contiene siete exones y el gen para la IL-1Ra (*IL1RN*) codifica para una proteína de 23-25 kDa ⁽¹⁸⁾. Tanto la IL-1 α como la IL-1 β se secretan como proteínas maduras de 17 kDa ⁽¹⁶⁾. La IL-1 β es escindida mediante proteólisis por la proteasa de citosteatina caspasa-1 (también denominada enzima de conversión de la IL-1 β o ICE), y la IL-1 α es escindida por la calpaína ⁽¹⁷⁾. La forma activa de IL-1 β es el producto escindido, en tanto que, la IL-1 α es activa como precursor y como producto escindido ⁽¹⁹⁾.

Una característica de la IL-1 es la ausencia de un péptido señal en la proteína sintetizada ⁽²⁴⁾, lo que no es muy común en proteínas secretadas, por lo que es secretada por una vía no clásica ⁽¹⁶⁾. La mayoría de las proteínas sintetizadas secretadas tienen un péptido de tamaño variable en la región N-terminal de la molécula que facilita el paso a través de la membrana del retículo endoplásmico (RE) hacia el interior del mismo, previo a su almacenamiento en el aparato de Golgi (AG). Sin este péptido una cantidad considerable de la pro-IL-1 permanece asociada a la célula y se localiza casi por completo en el citoplasma y

no en el RE, el AG o en la fracción de la membrana plasmática ⁽²⁴⁾. Ni la IL-1 α ni la IL-1 β tienen secuencias señal hidrófobas para dirigir el polipéptido naciente hacia el RE ⁽¹⁶⁾.

A pesar de las similitudes entre estas dos formas de IL-1, ambas presentan diferentes características y actividades en el organismo. Por ejemplo, la IL-1 α es expresada constitutivamente bajo condiciones fisiológicas y es sintetizada simultáneamente durante la inflamación; por el contrario, la IL-1 β no es producida a menos que la célula reciba una señal inflamatoria y, el hecho de que la forma activa sea la escindida por ICE refleja una regulación estricta ⁽¹⁹⁾. Más aún, la secreción de la IL-1 α madura por células humanas es un evento raro y la proteína no es usualmente detectada en los fluidos corporales de individuos sanos; por lo que, la IL-1 β es la forma secretada de la IL-1 ⁽²¹⁾.

La notable diferencia en la regulación, el procesamiento, la expresión específica en el tejido, la localización sub-celular y la compartimentalización de las isoformas de la IL-1 sugieren diferentes funciones y participaciones fisiológicas de estas moléculas ⁽¹⁹⁾. La actividad de cada miembro de la familia de la IL-1 está determinada por su capacidad para transmitir una señal agonista o actuar como un antagonista de los receptores ⁽²⁰⁾.

- **Interleucina-1 β (IL-1 β).**

La IL-1 β es el miembro más estudiado de la familia de la IL-1 debido su papel como mediador de las enfermedades autoinmunes ⁽¹⁹⁾. La región promotora de la IL-1 β contiene una caja TATA, una característica típica de los genes inducibles. A diferencia de la mayoría de los promotores de citocinas, las regiones regulatorias de la IL-1 β se pueden encontrar distribuidas sobre diversos miles de pares de bases río arriba y unas pocas pares de bases río abajo del sitio de inicio de la transcripción ⁽²⁴⁾. Después de su síntesis, la pro-IL-1 β permanece primordialmente en el citosol hasta que es escindida y transportada fuera de la célula (Figura 7). Existen diversos sitios en la parte de 16 kDa del N-terminal de la pro-IL-1 β que son vulnerables a la acción de enzimas como tripsina, elastasa, quimiotripsina, una quimiasa de los mastocitos y una variedad de proteasas encontradas comúnmente en fluidos inflamatorios. Existen varios niveles de control de la síntesis de la IL-1 β , como la naturaleza compleja de su promotor, la regulación del proceso de corte y empalme del RNA mensajero, la fosforilación de las proteínas requeridas para la traducción y la regulación de la actividad de la caspasa-1 ⁽²⁴⁾. En general, la liberación de la IL-1 β hacia la sangre está estrechamente controlada y menos del 20% del total de los precursores de IL-1 β es procesado y liberado ⁽²⁰⁾. Una vez liberada de las células, la IL-1 β puede unirse a su receptor específico en la superficie celular ⁽²⁴⁾.

Los mecanismos patológicos que incrementan la secreción de IL-1 β en enfermedades autoinmunes son usualmente, pero no siempre, disfunciones en la activación de la caspasa-1. Como tal, el efecto de la IL-1 en el sistema inmune es indirecto. Por ejemplo, la habilidad de la IL-1 β para inducir la expresión génica y la síntesis de la ciclooxigenasa C tipo 2 (COX-2) se debe a la producción de PGE₂; y es, quizás, el mecanismo más común para la supresión inespecífica de las respuestas de células T ⁽²⁴⁾.

Otra propiedad pro-inflamatoria importante de la IL-1 β es su habilidad para incrementar la expresión de moléculas de adhesión como las moléculas de adhesión intercelulares-1 (ICAM-1) en células mesenquimatosas y las moléculas de adhesión de células vasculares tipo 1 (VCAM-1) en las células endoteliales ⁽²⁴⁾. En la inflamación crónica, junto con la inducción de quimioquinas, estas propiedades de la IL-1 β promueven la infiltración de células inflamatorias e inmunocompetentes desde la circulación hacia el espacio extravascular y, de ahí, hacia los tejidos para ser remodelados ⁽²⁰⁾. La IL-1 β es también un factor angiogénico y participa en la metástasis de tumores ⁽²¹⁾.

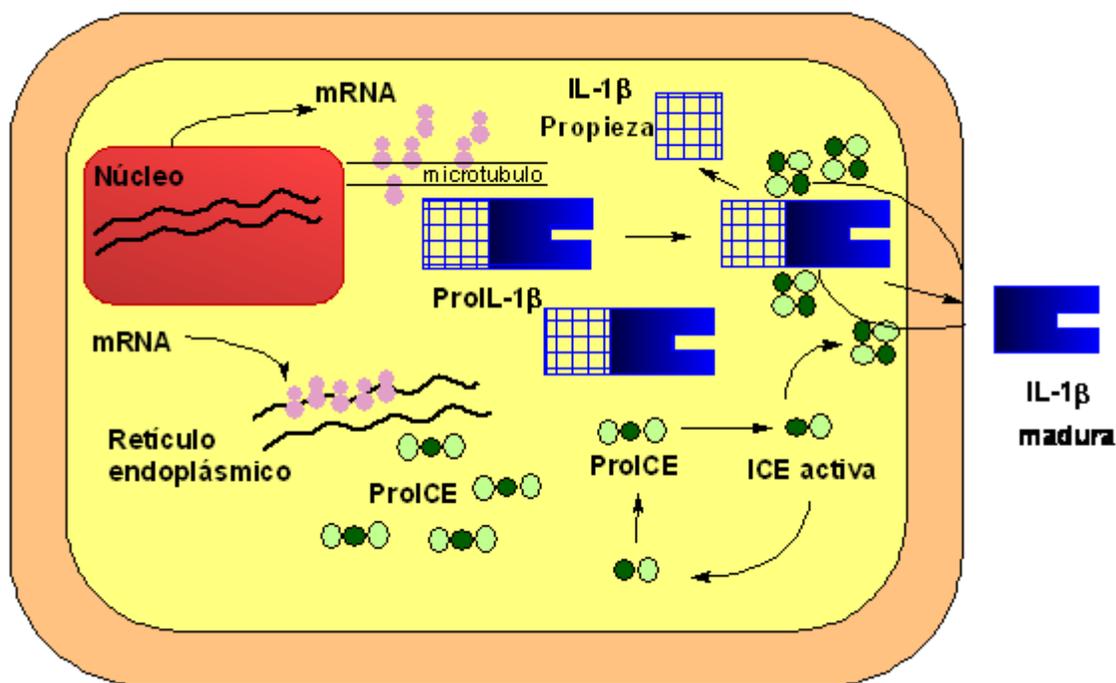


Figura 7. Producción de IL-1 β por monocitos humanos ⁽²¹⁾.

- **Antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1Ra).**

La familia de la IL-1 también incluye miembros que suprimen la inflamación ⁽²⁰⁾. Por ejemplo, los fagocitos mononucleares sintetizan una citocina de estructura homóloga a la IL-1 que se une a los mismos receptores, pero carece de actividad biológica, de forma que actúa como un inhibidor competitivo; por consiguiente, se denomina antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra). El IL-1Ra se une al receptor celular para IL-1 con una afinidad mayor que la IL-1 y reduce la respuesta de IL-1 α e IL-1 β ⁽²⁵⁾. Esta citocina bloquea la unión de la IL-1 a su receptor en las células T y fibroblastos, y puede ser un regulador endógeno, pues bloquea la habilidad de la IL-1 para estimular la generación de PGE₂ ⁽²⁶⁾.

Existen dos formas de IL-1Ra, la soluble (sIL-1Ra) y la intracelular (icIL-1Ra). La molécula soluble de IL-1Ra se une al receptor para IL-1, pero esta interacción no lleva a la activación de las vías de señalización ⁽²⁶⁾. Se sintetiza principalmente en monocitos y macrófagos, pero puede ser producida por varios tipos celulares. La función del icIL-1Ra se cree que regula la liberación de IL-1 α y la síntesis de esta citocina en el interior de las células ⁽²⁵⁾.

Hoy en día, la forma recombinante no glicosilada de IL-1Ra, genéricamente conocido como Anakinra (Kieret®), está aprobada en diversos países para el tratamiento de artritis reumatoide ⁽²⁰⁾ y es probada también para inhibir a la IL-1 en gota aguda, diabetes mellitus y la urticaria familiar por frío ⁽¹⁹⁾.

- **Receptores para IL-1**

De igual importancia es el papel de los receptores para la familia de la IL-1. Mientras que los receptores que transmiten las señales para la inflamación están bien estudiados, aquellos que transmiten señales anti-inflamatorias son de considerable importancia ⁽²⁰⁾. Los receptores de las citocinas están formados por una o más proteínas transmembranales cuyas porciones extracelulares son responsables de la unión a las citocinas y cuyas porciones citoplásmicas son responsables del inicio de las vías de transducción de señales intercelulares. Los receptores de la familia de la IL-1 comparten una secuencia citosólica conservada, denominada dominio del receptor tipo *Toll* de IL-1 (TIR), y activan vías de transducción de señales que inducen transcripción génica *de novo* ⁽²⁰⁾.

Existen dos clases de receptores para la IL-1, los cuales son productos de genes separados; uno es una proteína de 80 kDa llamada receptor de tipo I para la IL-1 (IL-1RI) y el otro es una proteína de 68 kDa conocida como receptor de tipo II para la IL-1 (IL-1RII) ⁽¹⁶⁾. Ambos pertenecen a la subfamilia de las inmunoglobulinas y son específicos para la IL-1 ⁽²⁴⁾. A pesar de ser productos de genes diferentes, la IL-1 α , la IL-1 β y el IL-1Ra compiten por la unión a las dos clases de receptores ⁽²²⁾.

La IL-1 extracelular es reconocida y unida por el receptor transmembranal de IL-1RI el cual forma un complejo con la proteína accesoria de IL-1 o IL-1RAcP (del inglés *IL-1 receptor accessory protein*) ⁽¹⁹⁾. El dominio citoplásmico de IL-1RI contiene el dominio TIR, el cual también se encuentra en los dominios citoplásmicos de los receptores tipo *Toll* (TLR), y que es crucial para la señalización. Los dominios de TLR para IL-1RI y también el correceptor IL-1RAcP son necesarios para la transducción (figura 8) ⁽²⁰⁾. La unión de la IL-1 a IL-1RI activa una cinasa denominada cinasa asociada al receptor de IL-1 o IRAK (del inglés *Interleucine-1 Receptor Associated Kinase*), lo que finalmente activa los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 ⁽¹⁹⁾.

El IL-1RII actúa como un “señuelo” ya que carece del dominio TIR, y no es capaz de iniciar la transducción. En humanos, el dominio extracelular soluble del receptor de tipo II (sIL-1RII) es liberado de la superficie celular por una proteasa; sIL-1RII tiene una alta afinidad específica por IL-1 β madura y forma un complejo trimétrico con IL-1RAcP. Este mecanismo sirve para desproveer a la célula tanto de IL-1 β como de su cadena receptora accesoria funcional. El sIL-1RAcP forma complejos en la superficie celular y provee la habilidad para reducir la activación de los linfocitos B ⁽²⁰⁾.

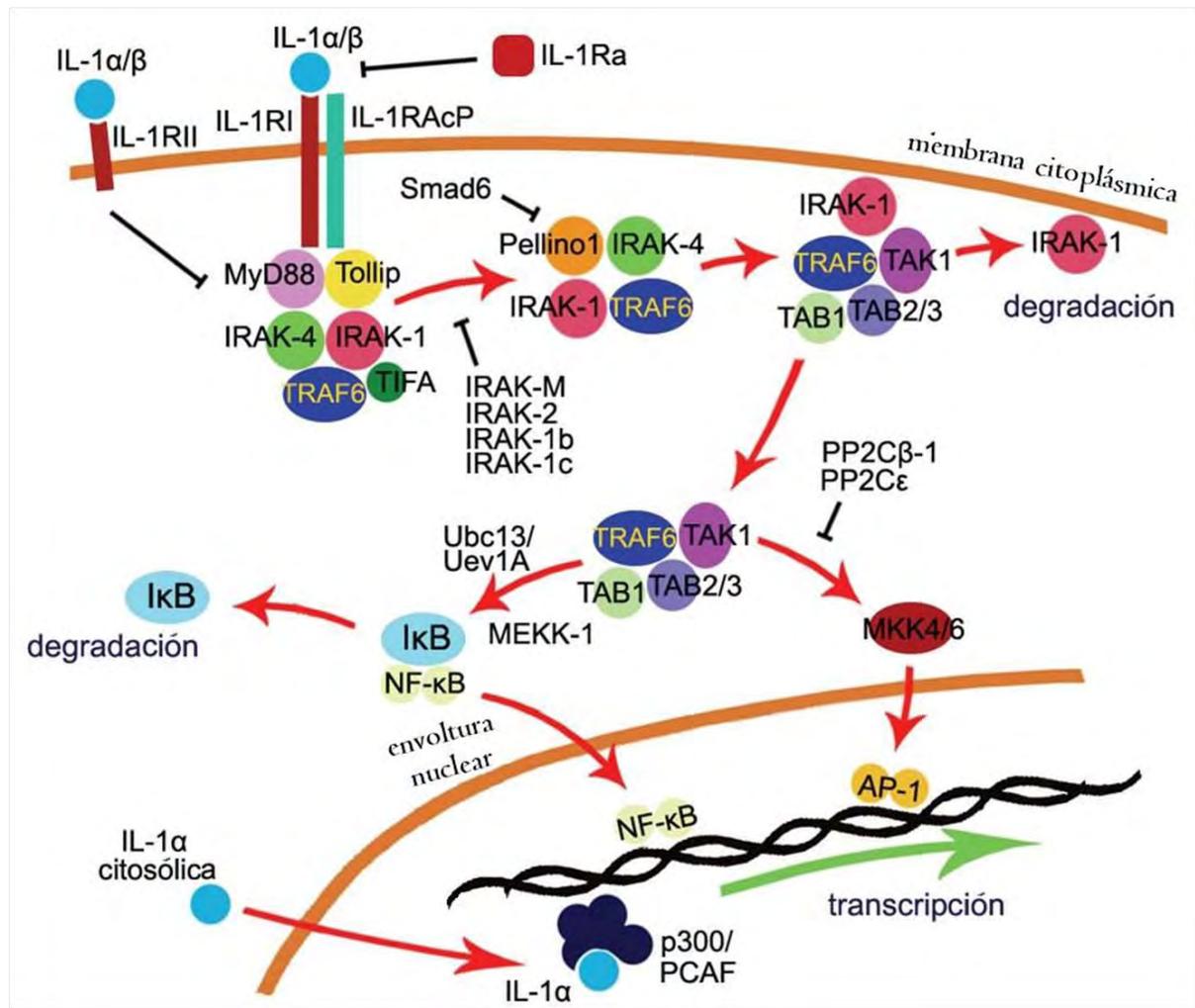


Figura 8. Esquema de las señales de la IL-1 y su regulación negativa ⁽¹⁹⁾.

- **Polimorfismos de la familia de la IL-1.**

Está ampliamente demostrado que el agrupamiento genético de la IL-1 contiene varios polimorfismos (tabla 8) ⁽²³⁾, algunos de los cuales se localizan en las regiones de regulación de estos genes (figura 9) ⁽²⁷⁾; lo que sugiere un posible efecto al modular la producción de la proteína, al afectar directamente la transcripción, lo que lleva a su asociación con niveles alterados de la IL-1. Más aún, estos polimorfismos genéticos se han asociado con la patogénesis y severidad del daño en diversas enfermedades autoinmunes ⁽¹⁹⁾, entre ellas las que cursan con un proceso inflamatorio intenso ⁽²⁴⁾.

Tabla 8. Algunos sitios polimórficos de los genes de la familia de la IL-1 ⁽²⁷⁾.

Posición	Nucleótido	SNPs	dbSNPs	Amino ácido	Método de detección *	Genotipo **
IL1A						
Exón 1	-899 C>T	Ex1+12C>T	rs1800587		RFLP: DpnII	C: 170 pb T: 145+25pb
Exón 5	+4845 G>T	Ex5+21G>T	rs17561	A114S	RFLP: SatI	G:29+123+3+84pb T: 152+3+84pb
Intrón 6	+376 C>A	IVS6+169C>A	rs2071376		RFLP: stYI	C: 270pb A: 198+72pb
IL1B						
Promotor	-511 C>T	-511C>T	rs16944		RFLP: AvaI	T: 530pb C: 190+340pb
Promotor	-31T>C	-31T>C	rs1143627		Secuenciación directa	
Intrón 4	-5810 C>T	IVS4-64G>A	rs1143633		RFLP: Fnu4HI	G: 38+271+19pb A: 309+19pb
Exón 5	-3954 C>T	Ex5+14C>T	rs11433634	F105F	RFLP: TaqI	C: 116+212pb T: 328pb
IL1RN						
Intrón 2	86pb VNTR				Electroforesis en gel de Agarosa	1: 410 pb; 2: 240pb; 3: 500p; 4: 325pb; 5: 595pb
Exón 4	+8006 C>T	Ex4+55C>T	Rs419598	A60A	RFLP: HpaII	C: 29-98pb T: 127pb
Intrón 4	+8061 C>T	IVS4+2C>T	rs423904		RFLP: MwoI	C: 179+46pb T: 225pb
Intrón 5	+9589 A>T	IVS5+59A>T	rs454078		RFLP: SspI	A: 299pb T: 145+154pb
Exón 7	+11100 T>C	Ex7+72T>C	rs315952	S133S	RFLP: MspAII	T: 330pb C: 132+198pb
* Se incluyen las enzimas de restricción utilizadas en cada caso						
** Se indican los tamaños de los fragmentos de restricción y de los amplificadores del VNTR.						

De los polimorfismos reportados para la IL-1 β , cuando menos dos podrían tener una posible influencia para modular la producción de la proteína ⁽²⁷⁾. Uno de ellos se localiza en la región promotora en la posición -511, y el otro en el exón 5 en la posición +3594; ambos representan un polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) con un cambio de citosina por una timina (C>T) ^(23, 27). Las dos variantes de SNP han sido asociadas repetidamente con múltiples condiciones clínicas, como en enfermedades cardiovasculares, así como con diferencias clínicas observadas en los niveles proteicos de IL-1 β *in vivo* ^(18, 23, 27). Por ejemplo, en algunas leucemias mieloides, el gen de la IL-1 β parece ser expresado constitutivamente ⁽²⁷⁾.

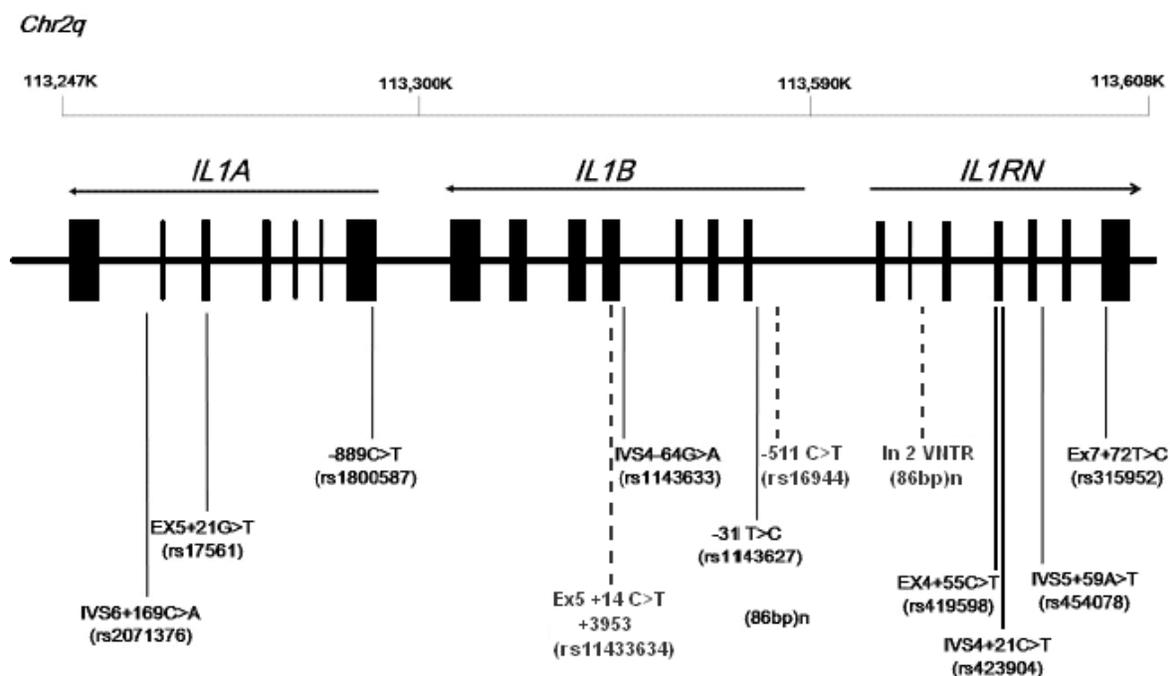


Figura 9. Mapa del agrupamiento de genes de la IL-1 en el que se muestran los genes *IL1A*, *IL1B* e *IL1RN* y se indica la posición de las secuencias nucleotídicas polimórficas. La dirección de transcripción se muestra debajo de cada gen mediante una flecha horizontal. Los exones se muestran como rectángulos. Las líneas verticales indican algunos sitios polimórficos reportados; las punteadas corresponden a los analizados en este estudio ⁽²⁷⁾.

El gen para la IL-1Ra (*IL1RN*) contiene un polimorfismo de repetición en tándem de número variable de copias o VNTR (del inglés *Variable Number of Tandem Repeats*) de 86 pb en el intrón 2, el cual puede presentar hasta 5 alelos diferentes: Alelo 1 (4 repetidos) de 410 pb, alelo 2 (2 repetidos) de 240 pb, alelo 3 (5 repetidos) de 500 pb, alelo 4 (3 repetidos) de 325 pb, y alelo 5 (6 repetidos) de 595 pb. Algunos estudios sugieren que el alelo 2 en estado tanto homocigoto como heterocigoto para este polimorfismo juega un papel en la modulación diferencial de la actividad de la IL-1 y se ha asociado con un incremento en la producción de IL-1Ra *in vivo* ⁽²⁸⁾. Existe evidencia que relaciona este polimorfismo con la susceptibilidad individual hacia enfermedades como el lupus eritematoso sistémico, psoriasis y enfermedades inflamatorias de la médula ósea ⁽²⁶⁾.

Datos recientes apoyan la noción de que la IL-1 junto con su regulador negativo, el IL-1Ra, participan de forma esencial en el desarrollo de diversas enfermedades cardiovasculares que cursan con un proceso inflamatorio severo; por ejemplo, la artritis reumatoide, aterosclerosis, infarto al miocardio, miocarditis, miocardiopatía dilatada, endocarditis infecciosa o miocardiopatía chagásica (Tabla 9) ^(20,25-28). Las variaciones genéticas que están asociadas con la sobreexpresión de mediadores inflamatorios también se correlacionan con un mayor riesgo de eventos cardiovasculares ⁽¹⁹⁾.

Teniendo en cuenta esto, existe considerable evidencia que implica a la IL-1 β y a la IL-1Ra en múltiples patologías crónicas y/o autoinmunes del sistema cardiovascular ⁽¹⁹⁾, como podría ser la TA, y dado que niveles elevados de IL-1 β se han reportado en pacientes con TA ⁽¹³⁾; es importante conocer qué factores genéticos de la familia de la IL-1 pueden desencadenar una susceptibilidad hacia padecer esta enfermedad ⁽¹³⁾.

Tabla 9. Mecanismos que involucran a las citocinas de la familia de la IL-1 en enfermedades cardiovasculares ⁽¹⁹⁾.

Molécula involucrada	Efecto biológico	Enfermedad o desorden	Referencia
IL-1 β	Estimulación de los promotores de las moléculas de adhesión (VCAM-1)	Ateroesclerosis	Kirii y col. 2003 ⁽²⁹⁾
IL-1 α IL-1 β	Sobre-regulación y desestabilización de la placa ateromatosa	Ateroesclerosis	Rajavashisth y col. 1999 ⁽³⁰⁾ Galis y col. 1995 ⁽³¹⁾ Shah y col. 1995 ⁽³²⁾
IL-1 α IL-1 β	Modulación de los niveles de colesterol en plasma	Ateroesclerosis	Kamari y col. 2007 ⁽³³⁾ Merhi y col. 2005 ⁽³⁴⁾
IL-1 α IL-1 β	Inducción del factor de crecimiento del endotelio vascular y estimulación de la angiogénesis	Ateroesclerosis	Salven y col. 2002 ⁽³⁵⁾ Voronov y col. 2003 ⁽³⁶⁾
IL-1 α IL-1 β	Inducción de la inflamación de la pared vascular a través del IL-1RI	Ateroesclerosis	Nicklin y col. 2000 ⁽³⁷⁾
IL-1 β	Inducción de la actividad pro-coagulante	Infarto al miocardio	Schwagner y col. 1994 ⁽³⁸⁾
IL-1 β	Modulación adversa de los depósitos de colágeno	Infarto al miocardio	Bujak y col. 2008 ⁽³⁹⁾ Murtuza y col. 2004 ⁽⁴⁰⁾
IL-1 β	Desarrollo de autoinmunidad contra células CD4 ⁺	Miocarditis autoinmune	Eriksson y col. 2003 ⁽⁴¹⁾
IL-1 β	Estimulación de la inflamación por sobre-expresión	Artritis reumatoide	Kay y col. 2005 ⁽²⁵⁾
IL-1 β	Estimulación de los promotores de las moléculas de adhesión (VCAM-1)	Granulomatosis de Wegner	Basile y col. 1989 ⁽⁴²⁾
IL-1 β	Estimulación de la inflamación por sobre-expresión	Enfermedad isquémica del corazón	Galea y col. 1996 ⁽²⁶⁾
IL-1Ra	Desregulación del proceso inflamatorio crónico	Enfermedad de la arteria coronaria	Francis y col. 1999 ⁽²⁸⁾
IL-1 β	Estimulación de anticuerpos anti-células endoteliales (AECA)	Lupus eritematoso y vasculitis	Van der Zee y col. 1994 ⁽⁴³⁾

HIPÓTESIS

Puesto que la arteritis de Takayasu se considera una enfermedad inflamatoria de tipo crónico asociada a niveles elevados en las citocinas de tipo pro-inflamatorio como la interleucina-1, entonces diferencias en las frecuencias de ciertos polimorfismos en el gen de esta citocina (*IL1B*) y su antagonista (*IL1RN*), entre pacientes y controles, podrían asociarse como un factor de protección o susceptibilidad a padecer la enfermedad en nuestra población.

OBJETIVO

- **Principal:**

Analizar los polimorfismos en las posiciones -511 y +3954 del gen de la interleucina-1 β (*IL1B*) y en el intrón 2 del gen del antagonista del receptor de interleucina-1 (*IL1RN*) en la arteritis de Takayasu en pacientes mexicanos y su asociación con la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad.

- **Secundarios:**

- Estudiar el polimorfismo del gen de la IL-1 β (*IL1B*) en la región promotora (posición -511) en individuos mexicanos con arteritis de Takayasu y sujetos sanos.
- Examinar el polimorfismo del gen de la IL-1 β (*IL1B*) en el exón 5 (posición +3954) en individuos mexicanos con arteritis de Takayasu y sujetos sanos.
- Investigar el polimorfismo de repetición e n t ándem co n n úmero variable de co pias del i ntrón 2 del gen de l l L-1Ra (*IL1RN*) en individuos mexicanos con arteritis de Takayasu y sujetos sanos.
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos estudiados entre los pacientes con arteritis de Takayasu y el grupo control.
- Determinar la susceptibilidad de riesgo/protección de los polimorfismos estudiados de la IL-1 con la arteritis de Takayasu en una muestra de la población mexicana.
- Analizar la asociación múltiple de los polimorfismos estudiados en una muestra de la población mexicana.

DISEÑO EXPERIMENTAL

- **Descripción.**

Se realizó un estudio prospectivo de tipo genético, transversal a conveniencia por casos y controles, con un muestreo no probabilístico de casos consecutivos. El estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Bioética.

- **Definición de la población.**

Nuestra población de estudio consistió de pacientes mexicanos diagnosticados con arteritis de Takayasu por el Servicio de Reumatología del Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez". La clasificación clínica fue definida de acuerdo al Colegio Americano de Reumatología (ACR, del inglés *American College of Rheumatology*), en cinco subgrupos de acuerdo a la localización del daño.

El grupo control incluyó individuos clínicamente sanos, pareados por sexo y edad, no emparentados, reclutados en el Instituto Nacional de Cardiología "Dr. Ignacio Chávez" en la Ciudad de México. Los criterios de inclusión para este grupo fueron el nacimiento del individuo y 2 generaciones de ancestros en el territorio nacional, con apellidos y características fenotípicas típicos de la población mestiza mexicana; así como, la ausencia de enfermedades conocidas asociadas a inflamación, hipertensión, niveles no alterados de lípidos en plasma, un índice de masa corporal $<30 \text{ Kg/m}^2$ y la ausencia de historia familiar de diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades coronarias.

- **Tamaño de muestra.**

Un total de 58 pacientes con arteritis de Takayasu y 161 individuos control fueron incluidos en el estudio; se obtuvo la carta de consentimiento de todos los participantes por escrito (ver anexo 1).

Para obtener el tamaño de muestra de nuestros pacientes se utilizó un cálculo de proporciones en muestras independientes, con un poder estadístico del 95% ($p > 0.05$).

- **Metodología.**

- *Extracción de DNA.*

El DNA genómico se aisló a partir de 6 ml de sangre periférica total por la técnica de precipitación salina (*Salting Out*). El DNA se cuantificó en un espectrofotómetro a 260nm y se realizó el ajuste para concentrar el DNA a 200 ng/ μ L (ver anexo 2).

- *Determinación Genotípica.*

Las regiones polimórficas de la región promotora (posición -511) y del exón cinco en la región codificante (posición +3954) del gen de la IL-1 β (*IL1B*) se amplificaron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) (ver anexo 3). Las condiciones características para cada PCR (iniciadores o *primers*, temperaturas y número de ciclos) se presentan en la tabla 10. La amplificación del producto respectivo de la PCR se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% (ver anexo 4). Para el caso del SNP en la posición -511 del gen *IL1B*, el alelo principal (C) presenta un sitio de corte para la enzima *AvaI*; y para el caso del SNP de la posición +3954 del gen *IL1B* el alelo principal (C) lo hace para la enzima *TaqI*; por lo que la detección de los alelos presentes en cada individuo se realizó mediante las enzimas de restricción correspondientes.

Tabla 10. Condiciones específicas de la PCR y método de detección para cada polimorfismo genético.

Polimorfismo	Oligonucleótidos		Condiciones para PCR						Método de análisis
	Forward	Reverse	Iniciación	Núm. de ciclos	Desnaturalización	Alineación	Extensión/elongación	Final	
IL-1 β (-511)	5'- TGGCATT GATCTGG TTCATC-3'	5'- GTTTAGG AATCTTC CCACTT- 3'	95°C / 5 min	35 ciclos	95°C / 30 seg	55°C / 30 seg	72°C / 30 seg	72°C / 7 min	PCR-RFLP AvaI 37°C / 3 h Gel de Agarosa 3% Br-etidio
IL-1 β (+3954)	5'- GTTGTCA TCAGACT TTGACC- 3'	5'- TTCAGTT CATATGG ACCAGA- 3'	95°C / 5 min	35 ciclos	95°C / 30 seg	55°C / 30 seg	72°C / 30 seg	72°C / 7 min	PCR-RFLP TaqI 65°C / 1 h PAGE 8% Ag(NO) ₃
IL-1Ra Intrón 2 (VNTR)	5'- CTCAGCA ACACTCC TAT-3'	5'- TCCTGGT CTGCAGG TAA-3'	95°C / 5 min	35 ciclos	95°C / 30 seg	58°C / 30 seg	72°C / 30 seg	72°C / 10 min.	PCR Gel de Agarosa 3% Br-etidio

Para el caso del SNP de -511, los fragmentos resultantes fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio (*ver anexo 4*); donde se observaron las bandas correspondiente a los alelos presentes en el DNA, el alelo 1 (C; dos bandas, de 190 pb y 114 pb) y el alelo 2 (T; una banda, de 304 pb) (figura 10). En tanto que para el caso del SNP en +3954, los fragmentos se observaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida o PAGE (del inglés *Poli-Acrilamide Gel Electroforesis*) al 8% (*anexo 5*) teñido con nitrato de plata (*anexo 6*), y se observaron los alelos presentes, alelo 1 (C; dos bandas de 135 pb y 114pb) y el alelo 2 (T; una banda de 249pb) (figura 11).

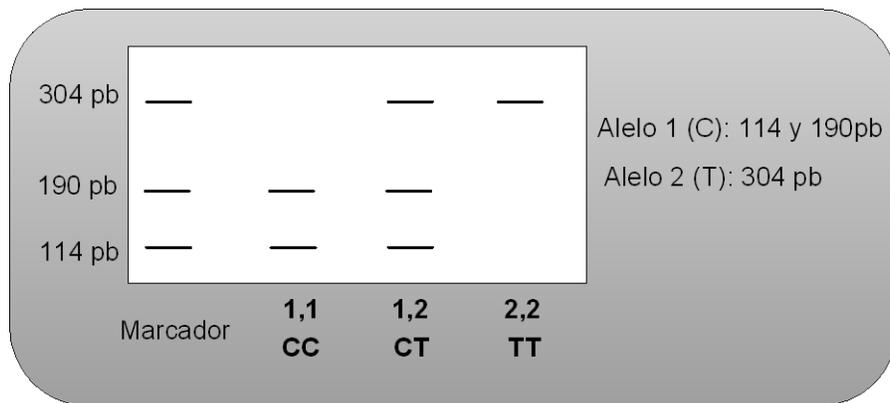


Figura 10. Bandas esperadas del PCR-RFLP después del corte con la enzima *Acl* para el SNP del promotor (posición -511) del gen de la IL-1 β (*IL1B*)

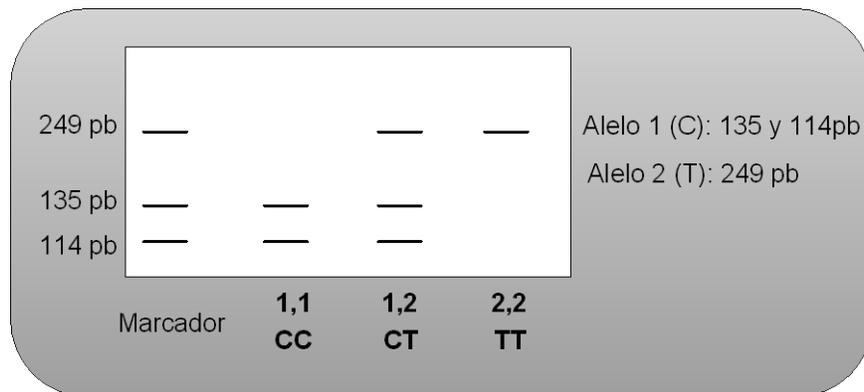


Figura 11. Bandas esperadas del PCR-RFLP después del corte con la enzima *TaqI* para el SNP del exón 5 (posición +3954) del gen de la IL-1 β (*IL1B*).

Con respecto al VNTR de 86pb del intrón 2 en el gen del IL-1Ra (*IL1RN*); se amplificó esta región por PCR (anexo 2), las condiciones características se presentan en la tabla 10. La determinación del número de repetidos para cada individuo se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio (anexo 3), para poner de manifiesto los cinco alelos posibles (figura 12): alelo 1 (410pb, 4 r repetidos), alelo 2 (240pb, 2 repetidos), alelo 3 (500pb, 5 repetidos), el alelo 4 (325pb, 3 repetidos) y el alelo 5 (595pb, 6 repetidos).

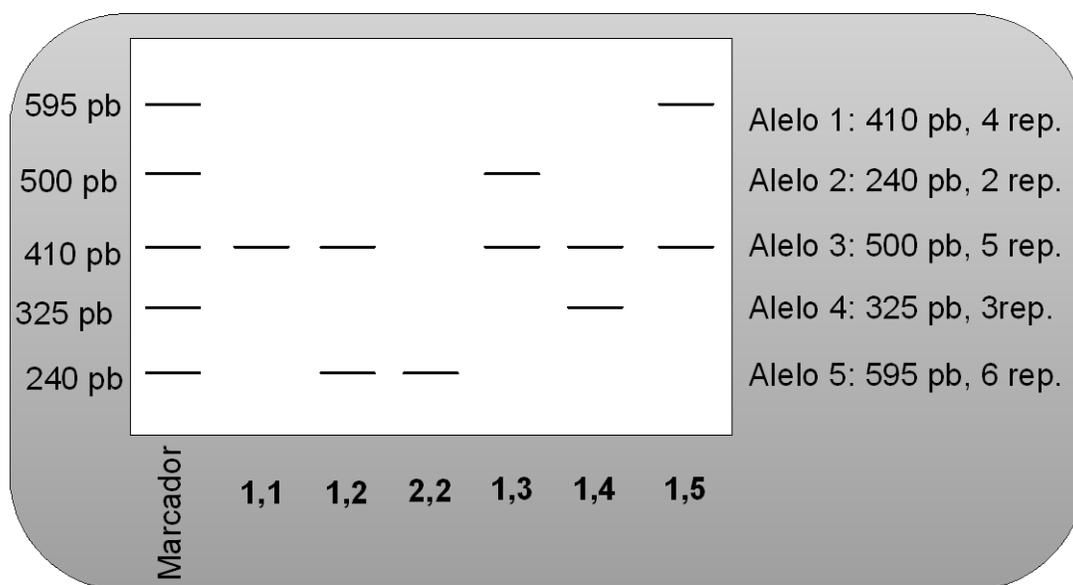


Figura 12. Bandas esperadas para el VNTR del intrón 2 del gen del IL-1Ra (*IL1RN*). Se muestran los genotipos más frecuentemente reportados en la literatura.

- **Análisis estadístico.**

Se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes polimórficas de los genes estudiados, tanto en pacientes como en controles, se llevó a cabo mediante el empleo de la prueba estadística no paramétrica de 2×2 χ^2 , basada en el análisis Woolf–Haldane, el valor de p se corrigió por el método de Bonferroni, de acuerdo a la fórmula $p_{corr} = 1 - (1 - p)^n$, donde p_{corr} es el valor corregido, p es el valor no corregido, y n es el número de loci. $p_{corr} < 0.05$ se consideró significativo.

Se realizó la prueba de conformidad con el equilibrio de Hardy–Weinberg para la prueba 2×2 χ^2 con la comparación de las frecuencias observadas y esperadas, mediante la fórmula $(p + q)^n$ donde p y q representan las frecuencias de dos alelos alternativos en un gen (donde $p + q = 1$) y $n=2$ que representa el par de alelos de la posición en el gen autosómico (anexo 7).

La comparación entre pacientes y controles se analizó por la prueba de t de Student y por un análisis de covarianza (ANCOVA) para evaluar el posible efecto de los polimorfismos estudiados. La fuerza de las asociaciones se calculó como riesgo relativo por el método de Woolf, razón de momios (OR) (Woolf y col. 1955). El OR indica cuantas veces un individuo portador del alelo en cuestión tiene más probabilidad de desarrollar la enfermedad que un individuo que no lo presenta.

Todos los análisis se llevaron a cabo con la utilización del programa SPSS v. 14 (Inc. Chicago, IL). Para el análisis de asociación múltiple de los polimorfismos estudiados con la enfermedad se utilizó el programa SNPstat (Instituto Catalán de Oncología, Barcelona, España).

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

- **Características generales de la población de estudio.**

Se estudiaron 58 pacientes con arteritis de Takayasu, 8 hombres y 50 mujeres; 55.2% de los pacientes (n=32) presentaron hipertensión arterial, mientras que 34.5% (n= 20) se encontraban en fase activa durante el estudio. El grupo control incluyó un total de 161 individuos mexicanos no relacionados, clínicamente sanos, 20 hombres y 141 mujeres reclutados en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” en la Ciudad de México. Las características clínicas de nuestra población de estudio se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Características clínicas de los pacientes con arteritis de Takayasu y sujetos controles.

Variable clínica	Pacientes con TA (n = 58)	Controles (n=161)	P
	(41) 70.7% tipo V		
Clasificación de Numano⁽¹⁾	(7)12.1% tipo III	-----	---
	(5) 8.6% tipo II		
	(5) 8.6% tipo I		
Edad	36.5 ± 11.8	36.6 ± 12.5	NS
Mujeres	86.2% (50)	87.57% (141)	NS
Peso	63.5 ± 12.4	64 ± 11.6	NS
Talla (cm)	153 ± 4	155 ± 7	NS
IMC	26.8 ± 5.1	26.1 ± 4	NS
PAS (mmHg)	114.1 ± 11.3	139.2 ± 29	0.0001
PAD (mmHg)	84.8 ± 90.7	69.0 ± 11	0.0001
Colesterol total (mmol/L)	5.03 ± 1.87	4.87 ± 1.84	NS
C-LDL (mmHg)	3.49 ± 1.53	3.39 ± 1.47	NS
C-HDL (mmHg)	0.88 ± .28	1.06 ± 0.44	NS
Triglicéridos (nmHg)	1.60 ± 0.84	1.58 ± 0.95	NS
Grosor íntima media(mm)	6.7 ± 1.5	4.2 ± 1.6	0.0001

Valores medios ± D.E.; Prueba post hoc P<0.05

Únicamente se observaron diferencias significativas en los valores de presión en los pacientes con TA, con un incremento en la presión diastólica (84.8 ± 90.7 vs. 69.0 ± 11) y una disminución en la presión sistólica (114.1 ± 11.3 vs 139.2 ± 29) en los pacientes comparados con los sujetos control. Además, con el propósito de corroborar que nuestros sujetos control no presentaran algún tipo de lesión vascular, se realizó una ultrasonografía a nivel de la capa íntima media de la arteria carótida (IMT) (figura 13). Se observó un aumento significativo en el grosor de la intima media en los pacientes con TA comparado con los controles. (6.7 ± 1.5 vs 4.2 ± 1.6 , respectivamente; $p=0.001$).

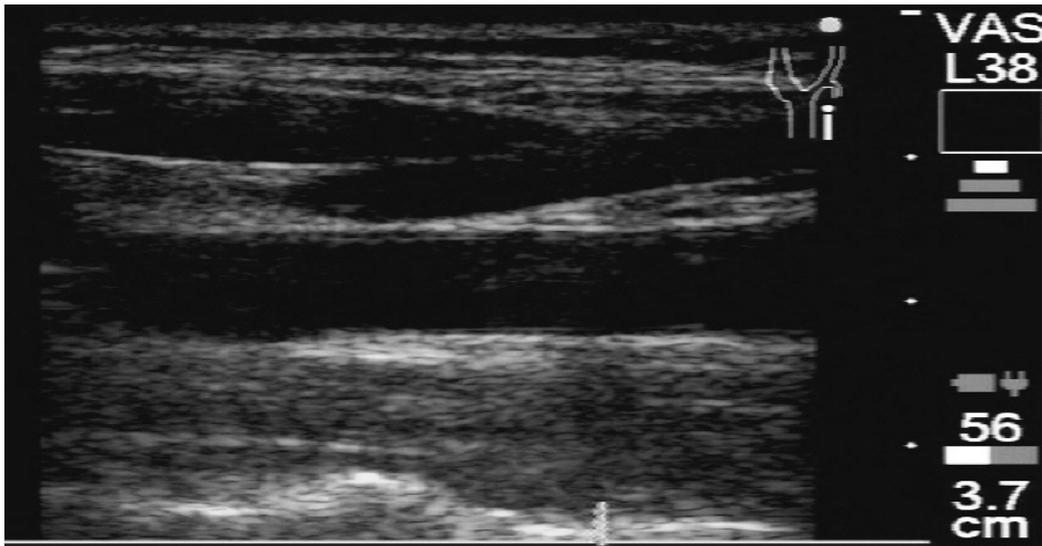


Figura 13. Ultrasonografía de la capa íntima media de la arteria carótida. La medición de la IMT se realizó con un equipo Ultramark 4+ (Advanced Technology Laboratories), con un transductor lineal de 7.5 MHz. Una imagen modo B fue obtenida de ambas arteria carótidas, en una sección longitudinal midiendo 5 segmentos justo antes de la bifurcación, a una frecuencia de 18.4 MHz por un periodo de 5 segundos.

- **Polimorfismo en la posición -511 del gen *IL1B*.**

Los productos obtenidos por PCR-RFLP con la enzima *AvaI* se muestran en la figura 14, en donde se visualizan las variantes para este SNP encontradas en nuestra población de estudio.

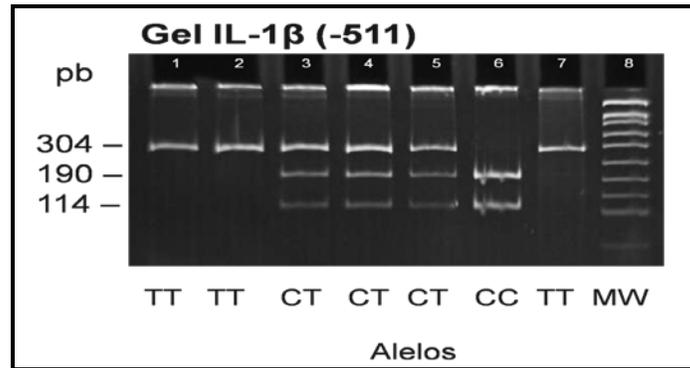


Figura 14. Gel de Agarosa al 3% en el que se muestra un ejemplo de los resultados de la restricción con la enzima *AvaI* para el SNP en la posición -511 del gen *IL1B*. Línea 8- MW: Marcador de peso molecular; líneas 1, 2 y 7- genotipo TT; 3, 4 y 5- genotipo CT; 6- genotipo CC. El gel se tiñó con bromuro de etidio.

La tabla 12 muestra las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP en la posición -511 del gen *IL1B* tanto en pacientes con TA como en controles.

Tabla 12. Frecuencias alélicas (Fa) y genotípicas (Fg) del SNP en la posición -511 del gen *IL1B* en pacientes con TA y controles.

<i>IL1B</i> (-511)	Pacientes con TA (n = 58)	Controles (n=161)	<i>p</i>
Alelos	(n) Fa	(n) Fa	
C	(33) 0.284	(83) 0.258	0.576
T	(83) 0.716	(239) 0.742	
Genotipo	(n) Fg	(n) Fg	
CC	(9) 0.155	(12) 0.075	0.074
CT	(15) 0.259	(59) 0.366	0.137
TT	(34) 0.586	(90) 0.559	0.720

Las frecuencias alélicas para este polimorfismo mostraron una disminución en la frecuencia del alelo T en los pacientes con TA con respecto a los sujetos control (71.6% vs 74.2%) y por ende un aumento del alelo C en los pacientes (28.4% vs 25.8%). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las frecuencias alélicas para esta isoforma.

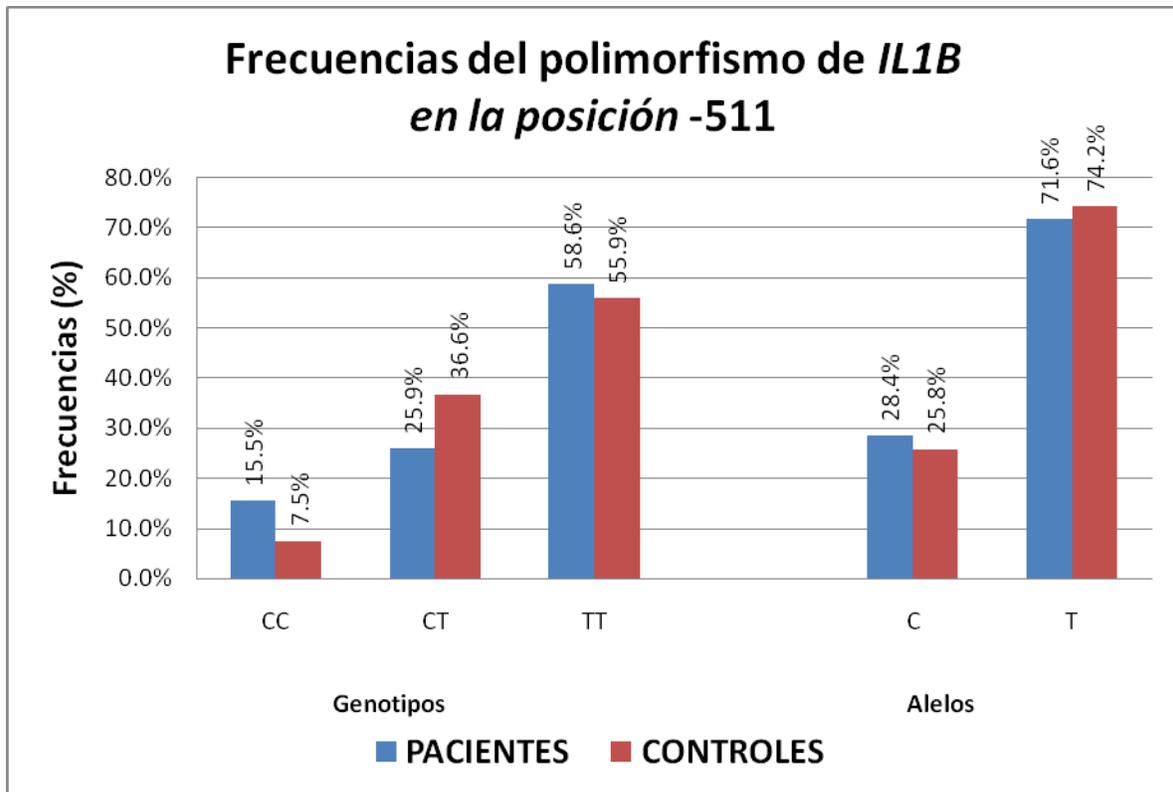
Por otro lado, en el análisis para los genotipos, el genotipo CC se encontró aumentado en un 8.0% en los pacientes (15.5% vs 7.5%); y en el genotipo CT se observó disminuido en un 10.7% en los pacientes (25.9% vs 36.6%); ambos comparados con los sujetos control. No obstante, ninguno de estos cambios mostró diferencias estadísticamente significativas. Con el fin de observar mejor las diferencias en las frecuencias obtenidas se realizó la gráfica 1. En la tabla 13 se muestran resultados del cálculo de conformidad para el equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) de los genotipos para este SNP.

Tabla 13. Frecuencias genotípicas (Fg) para la conformidad con EHW del SNP en la posición -511 del gen *IL1B* en la población de estudio.

IL1B (-511)	Pacientes con TA (n=58) Fg	Controles (n=161) Fg	Total observado (n=219) Fg	Total esperado (n) Fg
CC	(9) 0.155	(12) 0.075	(21) 0.096	(15.4) 0.059
CT	(15) 0.259	(59) 0.366	(74) 0.338	(85.3) 0.367
TT	(34) 0.586	(90) 0.559	(124) 0.566	(118.4) 0.574
χ^2				3.831
p				0.05032

Las frecuencias genotípicas observadas para el SNP en -511 se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg para nuestra población de estudio.

Grafica 1. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP en la posición -511 del gen para la IL-1 β en pacientes con arteritis de Takayasu y controles.



- **Polimorfismo en la posición +3954 del gen *IL1B*.**

Los productos obtenidos de la digestión con la enzima *TaqI* se muestran en la figura 15, en donde se visualizan las variantes para este SNP encontradas en nuestra población de estudio.

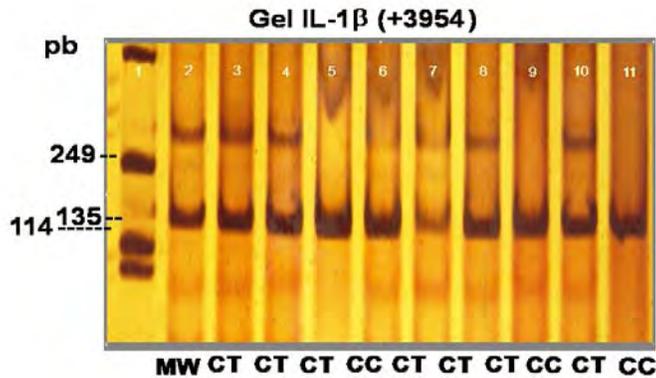


Figura 15. Gel de poliacrilamida en el que se muestra un ejemplo de los resultados de la restricción con la enzima *TaqI* para el SNP en la posición +3954 del gen *IL1B*. Línea 1- MW: Marcador de peso molecular; genotipo CT: líneas 2, 3, 4, 6, 7, 8 y 10; genotipo TT: líneas 5, 9 y 11. El gel se tiñó con nitrato de plata.

La tabla 14 muestra las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP en la posición +3954 del gen *IL1B* tanto en pacientes con TA como en controles.

Tabla 14. Frecuencias alélicas (Fa) y genotípicas (Fg) del SNP en la posición +3954 del gen *IL1B* en pacientes con TA y controles.

<i>IL1B</i> (+3954)	Pacientes con TA (n = 58)	Controles (n=161)	P	OR 95% (IC)
Alelos	(n) Fa	(n) Fa		
C	(50) 0.431	(207) 0.645	0.0001	0.41 (0.27-0.64)
T	(66) 0.569	(114) 0.354	0.0001	2.41 (1.56-3.71)
Genotipo	(n) Fg	(n) Fg		
CC	(2) 0.034	(67) 0.416	0.00001	0.50 (0.11-0.21)
CT	(46) 0.793	(74) 0.460	0.00001	4.50 (2.22-9.13)
TT	(10) 0.172	(20) 0.124	0.360	

OR= Razón de momios; IC= Intervalo de confianza.

Las frecuencias alélicas para este polimorfismo mostraron incremento significativo del alelo T (56.9% vs 35.4%, $p=0.0001$ OR 95%= 2.41, IC= 1.56-3.71) y una disminución del alelo C (43.1% vs 64.5%, $p=0.0001$ OR 95%= 0.41, IC= 0.27-0.64) en los pacientes con TA con respecto a los sujetos control.

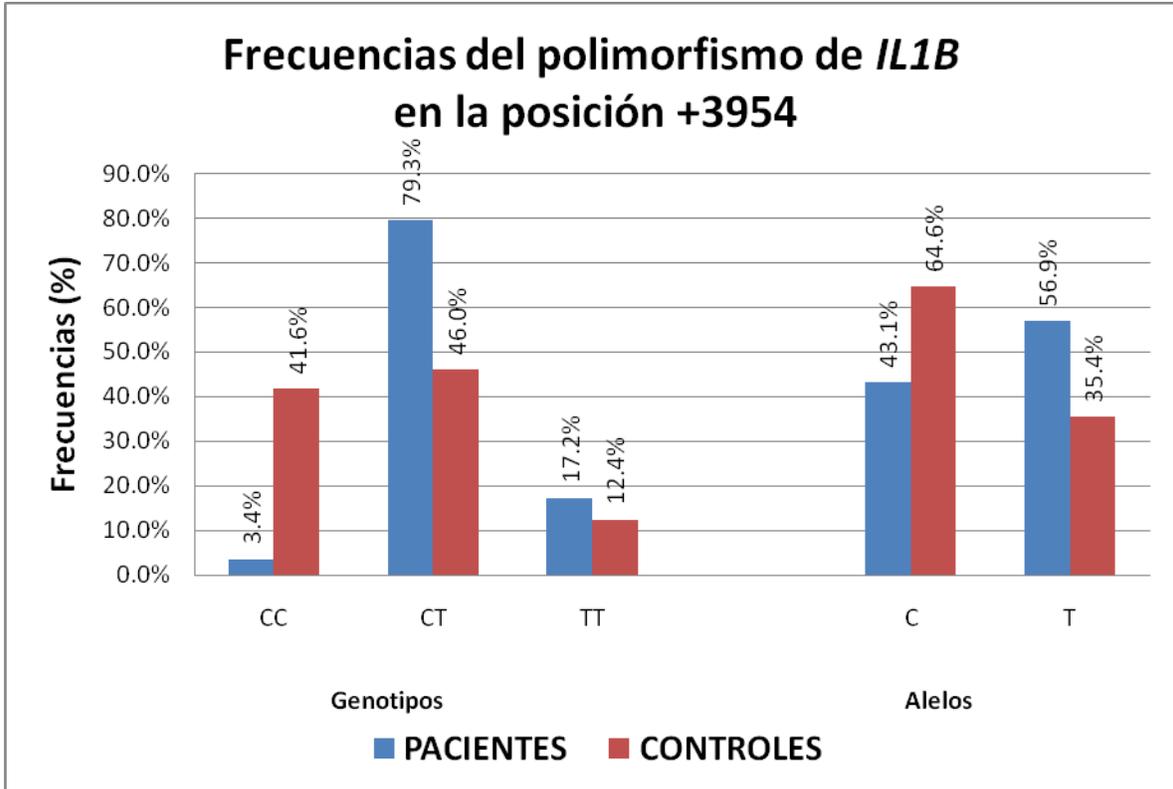
En cuanto a los genotipos observados, el genotipo CC se encuentra disminuido significativamente en un 38.2% en los pacientes con respecto a los controles (3.4% vs 41.6%, $p=0.0000$, OR 95%= 0.5 IC= 0.011-0.212). También se observó una diferencia estadísticamente significativa para el genotipo CT el cual se encontró aumentado en un 33.3% en los pacientes con TA (79.3% vs 46.0%, $p=0.0000$, OR 95%=4.5, IC=2.22-9.1) comparado con los sujetos control. Para el caso del genotipo TT no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Con el fin de observar mejor las diferencias en las frecuencias obtenidas se realizó la gráfica 2. En la tabla 15 se muestran resultados del cálculo de conformidad para el EHW para este SNP.

Tabla 15. Frecuencias genotípicas (Fg) para la conformidad con EHW del SNP en la posición +3954 del gen *IL1B* en pacientes con TA y controles.

IL1B (-511)	Pacientes con TA (n=58) Fg	Controles (n=161) Fg	Total observado (n=219) Fg	Total esperado (n) Fg
CC	(2) 0.034	(67) 0.416	(69) 0.315	(76.0) 0.347
CT	(46) 0.793	(74) 0.460	(120) 0.548	(106.0) 0.484
TT	(10) 0.172	(20) 0.124	(30) 0.137	(37.0) 0.169
χ^2				3.803
p				0.0511

Las frecuencias genotípicas observadas para el SNP en +3954 del gen *IL1B* se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg para nuestra población de estudio.

Grafica 2. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP en la posición +3954 del gen para la IL-1 β en pacientes con arteritis de Takayasu y controles.



- VNTR del intrón 2 del gen *IL1RN*.

El VNTR presente en el intrón 2 del gen del IL-1Ra (*IL1RN*) en nuestra población de estudio se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 3% después de la amplificación de la PCR (figura 16).

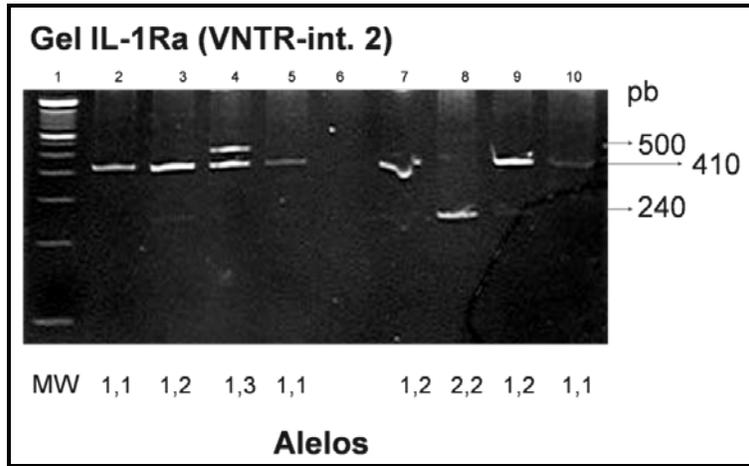


Figura 16. Gel de agarosa en el que se muestra un ejemplo de los resultados de la amplificación por PCR del VNTR en el intrón 2 del gen *IL1RN*. Línea 1- MW: Marcador de peso molecular; genotipo 1,1: líneas 2, 5 y 10; genotipo 1,2: líneas 3, 7 y 9; genotipo 1,3: línea 4; genotipo 2,2: línea 8; en la línea 6 no se observa ninguna amplificación. El gel se tiñó con bromuro de etidio.

La tabla 16 muestra las frecuencias genotípicas y alélicas para los repetidos de 86 pb del VNTR en el intrón 2 del gen para el IL-1Ra (*IL1RN*) tanto en pacientes con TA como en controles.

Tabla 16. Frecuencias alélicas (Fa) y genotípicas (Fg) del VNTR del intrón 2 del gen *IL1RN* en pacientes con TA y controles.

<i>IL1RN</i> (VNTR)	Pacientes con TA (n = 58)	Controles (n=161)	<i>P</i>	OR 95% (IC)
Alelos	(n) Fa	(n) Fa		
1	(95) 0.819	(217) 0.674	0.003	2.19 (1.29-3.71)
2	(18) 0.155	(95) 0.295	0.003	0.42 (0.25-0.77)
3	(1) 0.009	(4) 0.012	0.741	
4	(2) 0.017	(6) 0.019	0.923	
Genotipo	(n) Fg	(n) Fg		
1,1	(39) 0.672	(75) 0.466	0.007	2.35 (1.25-4.42)
1,2	(14) 0.241	(59) 0.366	0.083	
1,3	(1) 0.017	(4) 0.025	0.740	
1,4	(2) 0.034	(4) 0.025	0.700	
2,2	(2) 0.034	(18) 0.112	0.078	
4,4	(0) 0.000	(1) 0.006	N/A	

OR= Razón de momios; IC= Intervalo de confianza; N/A= no aplica.

Sólo se observaron cuatro de los cinco alelos posibles para el VNTR del gen *IL1RN* en nuestra población de estudio, el alelo 5 (595pb, 6 repetidos) no se encontró en ninguno de los sujetos de estudio. El alelo 1 fue el alelo que se observó más frecuentemente en los pacientes en un 14.5% comparado con los controles (81.9% vs 67.4%) y se observó significancia estadística ($p=0.003$; OR=2.19, 95%, IC=1.29-3.71). El alelo 2 se encontró con menor frecuencia en los pacientes en un 14.0% menos comparado con los controles (15.5% vs 29.5%) y también mostró significancia estadística ($p=0.003$; OR= 0.42, 95%; IC=0.25-0.77).

Para los genotipos encontrados en los pacientes, el genotipo más frecuente fue el 1,1 (67.2%), seguido por el genotipo 1,2 (24.1%), el genotipo 2,2 (3.4%); el genotipo 1,4 (3.4%) y el genotipo 1,3 (1.7%). Mientras que en los controles los genotipos encontrados por orden de frecuencia fueron: el genotipo 1,1 (46.6%), el

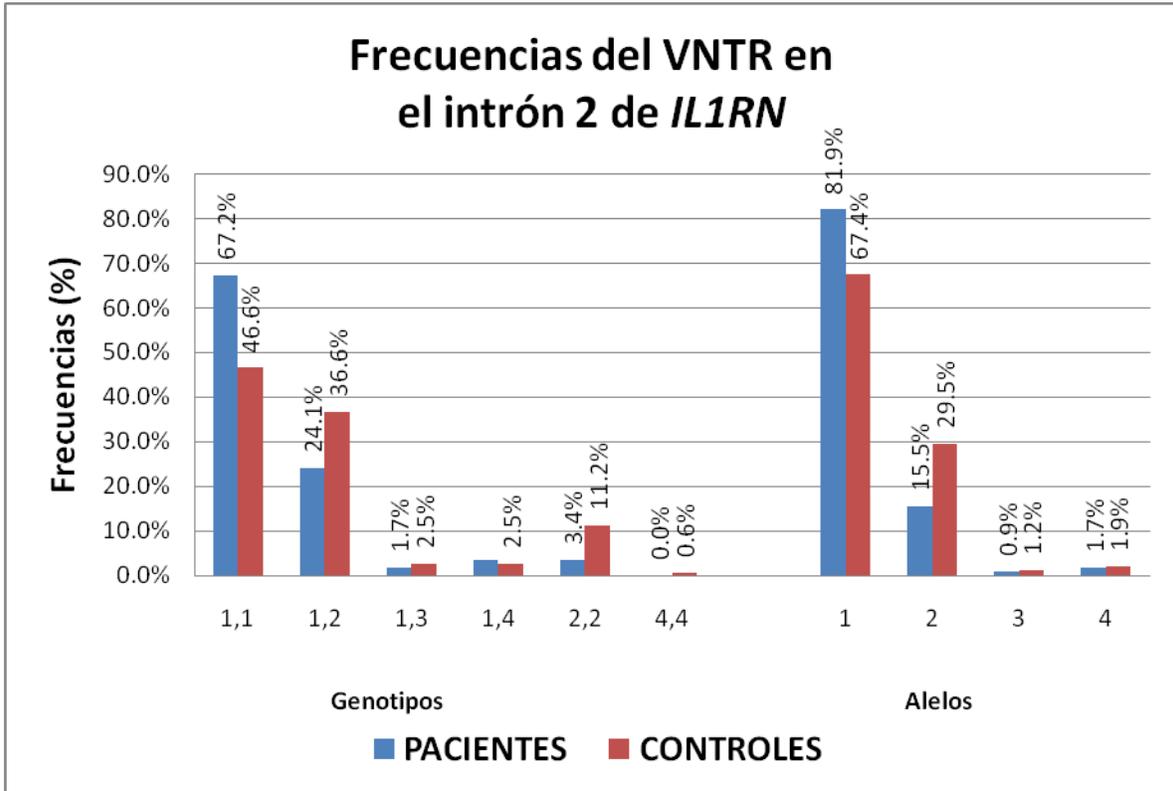
genotipo 1,2 (36.6%), el genotipo 2,2 (11.2%); el genotipo 1,3 (2.5%), el genotipo 1,4 (2.5%) y el genotipo 4,4 (0.6%); este último genotipo solo se encontró en uno de los controles. Se encontró significancia estadística sólo para el caso de el genotipo 1,1 ($p=0.007$; OR=2.35, 95%; CI=1.25-4.42), el cual estaba aumentado en los pacientes en un 20.6% comparado con los controles (67.2% vs 46.6%). Aunque se observó que el genotipo 1,2 estaba disminuido en los pacientes en un 12.5% y que el genotipo 2,2 estaba disminuido en los pacientes en un 7.8%, ambos comparados con el genotipo correspondiente en los controles (24.1% vs 36.6% y 3.4% vs 11.2% respectivamente), ninguno de ellos mostró diferencias con significancia estadística. Con el fin de observar mejor las diferencias en las frecuencias obtenidas se realizó la gráfica 3. En la tabla 17 se muestran resultados del cálculo de conformidad con el EHW para este VNTR.

Tabla 17. Frecuencias genotípicas (Fg) para la conformidad con el EHW del VNTR presente en el intrón 2 del gen *IL1RN* en pacientes con TA y controles.

IL1B (-511)	Pacientes con TA (n=58) Fg	Controles (n=161) Fg	Total observado (n=219) Fg	Total esperado (n) Fg
1,1	(39) 0.672	(75) 0.466	(114) 0.521	(111.1) 0.507
1,2	(14) 0.241	(59) 0.366	(73) 0.333	(80.5) 0.368
1,3	(1) 0.017	(4) 0.025	(5) 0.023	(3.6) 0.016
1,4	(2) 0.034	(4) 0.025	(6) 0.027	(5.7) 0.026
2,2	(2) 0.034	(18) 0.112	(20) 0.091	(14.6) 0.067
4,4	(0) 0.000	(1) 0.006	(1) 0.005	(0.0) 0.000
χ^2				3.387
p				0.0657

Las frecuencias genotípicas observadas para el VNTR en el intrón 2 del gen *IL1RN* se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg en nuestra población de estudio.

Grafica 3. Frecuencias genotípicas y alélicas del VNTR en el intrón 2 del gen para IL-1Ra en pacientes con arteritis de Takayasu y controles.



- **Análisis de asociación múltiple de los polimorfismos estudiados.**

En este trabajo se realizó el análisis de asociación múltiple de los SNP del gen *IL1B* (posiciones -511 y +3954) y del VNTR en el intrón 2 del gen *IL1RN* tanto para los pacientes como para los sujetos control. Los resultados se muestran en la tabla 18. El riesgo para cada haplotipo se comparó con respecto de la combinación de polimorfismos más frecuente en la población de estudio.

Tabla 18. Análisis de asociación múltiple para los SNP en las posiciones -511, +3954 del gen *IL1B* y el VNTR en intrón 2 del gen *IL1RN* en pacientes con TA y controles.

Polimorfismos			Frecuencias			p	OR 95% (IC)
-511 (<i>IL1B</i>)	+3954 (<i>IL1B</i>)	VNTR (<i>IL1RN</i>)	Pacientes	Controles	Total		
T	C	1	0.240	0.313	0.289	---	
T	T	1	0.355	0.178	0.230	0.002	5.24 (1.82 - 15.14)
T	C	2	0.067	0.233	0.193	0.330	
C	C	1	0.084	0.132	0.117	0.570	
T	T	2	0.074	0.078	0.071	0.350	
C	T	1	0.141	0.033	0.064	0.001	13.73 (2.81 - 67.13)
C	C	2	0.038	0.021	0.025	0.410	
C	T	2	0.000	0.0123	0.010	N/A	

Se observaron diferencias estadísticamente significativas para el caso de la combinación T-T-1 (p=0.002; OR =5.24, 95%, CI=1.82-15.14), que se observó aumentada en un 17.7% en los pacientes (35.5% vs 17.8%), y para la combinación C-T-1 (p=0.001; OR =13.73, 95%, CI=2.81-67.13) que también se encontró aumentada en los pacientes en un 10.8% (14.1% vs 3.3%), ambos con respecto a los sujetos control. Las otras combinaciones posibles de los polimorfismos estudiados no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

La arteritis de Takayasu es presumiblemente el resultado de mecanismos idiopáticos autoinmunes puesto que señales inespecíficas de inflamación y una respuesta favorable hacia el tratamiento inmunosupresivo lo sugieren ⁽⁴⁴⁾. Existen datos que implican a la activación de los linfocitos contra el endotelio y la inflamación de los vasos grandes como las probables causas de la patogénesis de la enfermedad ⁽¹⁸⁾. Se han encontrado niveles elevados de IL-1 en el suero de los pacientes con TA ⁽²⁷⁾, además de incrementos en el número de linfocitos activados y macrófagos que liberan interleucinas ⁽⁶⁾.

Existen muy pocos reportes acerca de la relación entre los polimorfismos de los genes de la familia de la IL-1 y la susceptibilidad para desarrollar la arteritis de Takayasu. En este trabajo se compararon las distribuciones de dos SNP en el gen *IL1B* (posiciones -511 y +3954) y un VNTR en el intrón 2 del gen *IL1RN* entre pacientes con arteritis de Takayasu y sujetos control.

Para el SNP en el promotor (posición -511) del gen *IL1B*, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ningún genotipo en nuestra población de estudio. Algunos estudios han relacionado la presencia del alelo C en la posición -511 con un incremento en los niveles de IL-1 β en el hígado como respuesta a infecciones con el virus de hepatitis B ⁽⁴⁵⁾. También se ha asociado a este mismo alelo en estado homocigoto con infarto al miocardio en jóvenes ⁽⁴⁶⁾. Zhang y cols. ⁽⁴⁷⁾ mostraron igualmente una asociación del alelo C en estado homocigoto con daño a arterias coronarias. Estos resultados no son contundentes ya que en otros estudios no se han encontrado diferencias en este polimorfismo en pacientes con enfermedades de tipo inflamatorio ⁽²⁶⁾. Un ejemplo de ello es un estudio en pacientes caucásicas con cáncer de mama, en donde no se encontró asociación de este polimorfismo con la enfermedad, aunque existe un ligero incremento del alelo T en los pacientes ⁽⁴⁸⁾. A pesar de que existen diversos trabajos en donde tratan de relacionar este SNP con enfermedades de tipo inflamatorio, los resultados son controversiales en las distintas poblaciones ⁽⁴⁶⁾.

Un dato interesante es la baja frecuencia del genotipo CC en nuestros controles (12.4%), y a que se encuentra por debajo de la reportada en otras poblaciones (tabla 19). La mayoría de las variaciones en la frecuencia tanto alélica como genotípica se encuentran de forma similar en todas las poblaciones humanas. Sin embargo, algunas variantes alélicas pueden evidenciar diferencias notables de frecuencia entre grupos de poblaciones ⁽¹⁴⁾.

Tabla 19. Frecuencias del SNP en la posición -511 del gen *IL1B* en los grupos control de diferentes poblaciones.

Población	Frecuencia <i>IL1B</i> (-511)			Referencia
	CC	CT	TT	
Mexicana	12.4	24.2	63.4	En este trabajo
Indú	22	43	35	Wilkinson y col. 1999 ⁽⁴⁹⁾
Turca	30	74	45	Arman y col. 2008 ⁽⁴⁶⁾
Caucásica (Europea central)	43.7	42.6	13.7	Endler y col. 2006 ⁽⁵⁰⁾
Escocesa	38	44	18	Crilly y col. 2000 ⁽⁵¹⁾
Eslovaca	42.7	45.2	12.1	Hutyrova y col. 2002 ⁽⁵²⁾
Coreana	21.4	51.5	27.1	Kim y col. 2008 ⁽²⁷⁾
China	26.1	47.4	26.5	Zhang y col 2004 ⁽²³⁾
Caucásica (Reino Unido)	48.4	41.6	10	Gordon y col 2008 ⁽⁵³⁾
China	27.6	51.3	21.1	Guo y col. 2009 ⁽⁵⁴⁾

En cuanto al SNP del exón 5 (posición + 3954) del gen de la *IL-1β* se observó una marcada diferencia en la frecuencia del alelo T, con un incremento del 21.5% en nuestros pacientes con respecto al grupo control. Se ha reportado que este polimorfismo regula la producción de *IL-1β* *in vitro* en células mononucleares de sangre periférica ⁽⁵³⁾, y existen reportes acerca de que la presencia del alelo T, tanto en estado homocigoto como heterocigoto, está

asociada con un incremento marcado en la cantidad de IL-1 β producida ^(29, 45, 46). Aunque estos resultados no son congruentes en todos los estudios, ya que existen reportes acerca de que la presencia del alelo C incrementa de forma moderada la cantidad de IL-1 β producida en respuesta a infecciones por *M. tuberculosis* ⁽⁵⁵⁾ y en la enfermedad inflamatoria intestinal ⁽⁵⁶⁾. Aun más, se ha reportado la presencia de este alelo como un factor de riesgo hacia la severidad en pacientes con cáncer de colon en fase II ⁽⁵⁶⁾. Nuestros datos nos muestran que la presencia del alelo T podría desencadenar una mayor producción en IL-1 β , y podría ser un factor de riesgo (OR=2.4) hacia la susceptibilidad a padecer la enfermedad.

Es de llamar la atención que la presencia del genotipo TT no mostró significancia estadística, pero si el genotipo CT, que está marcadamente incrementado en los pacientes con arteritis de Takayasu con respecto a los controles. Además, se observó que este genotipo tiene un riesgo relativo de 4.5 veces hacia la susceptibilidad a la enfermedad, lo que explica la significancia estadística del alelo T. Este genotipo se ha relacionado con la susceptibilidad hacia infección por *M. tuberculosis* ^(49, 57), aunque estos resultados no son consistentes, ya que algunos estudios han relacionado la presencia del genotipo TT con un marcado aumento en la producción de proteína en diversas enfermedades ^(52, 58, 59) y como un factor de riesgo hacia padecer una forma agresiva de cáncer de próstata en población caucásica ⁽⁶⁰⁾.

Por otro lado, el genotipo CC también mostró una diferencia estadística, ya que se encontró más frecuentemente en los controles y el cálculo del riesgo relativo nos dio un valor de 0.5 veces, por lo que la presencia de este genotipo podría ser un factor de protección hacia padecer la enfermedad. Estudios al respecto de este genotipo han sido muy escasos, pero se ha observado que la presencia de este genotipo se relaciona con un riesgo reducido hacia desarrollar la enfermedad d uodenal ul cerativa ⁽⁴⁵⁾. También se ha relacionado con un incremento moderado de la cantidad de IL-1 β producida en respuesta a LPS ⁽⁴⁹⁾. Interesantemente, nuestros sujetos control muestran una de las frecuencias más

bajas para el genotipo CC y de las más elevadas para TT para el SNP en +3954 a nivel mundial al compararlas con diversas poblaciones previamente estudiadas (tabla 20). En nuestro país se han reportado resultados controversiales al respecto de las frecuencias genotípicas para este polimorfismo en los sujetos control de estudios acerca de cáncer gástrico en población mexicana ^(61, 62), lo que nos muestra la gran heterogeneidad (mestizaje) en nuestra población ⁽⁶²⁾.

Tabla 20. Frecuencias polimórficas del SNP en la posición +3954 del gen *IL1B* en diferentes poblaciones.

<i>Población</i>	Frecuencia <i>IL1B</i> (+3954)			Referencia
	CC	CT	TT	
Mexicana	41.6	46.0	12.4	En este trabajo
México	85.1	13.4	1.5	Sicinski y col. 2006 ⁽⁶²⁾
México	32.6	47.4	20	Garza y col. 2005 ⁽⁶³⁾
Indú	72	24	4	Wilkinson y col. 1999 ⁽⁴⁹⁾
Alemana	61	34	5	Moos y col. 2000 ⁽⁵⁸⁾
Turca	54.7	40	5.3	Arman y col. 2008 ⁽⁴⁶⁾
Caucásica (Europea central)	56.5	37.2	6.2	Endler y col. 2006 ⁽⁵⁰⁾
Española	63.6	33	3	García y col. 2001 ⁽⁵⁵⁾
Eslovaca (Rep. Checa)	57.6	38.4	4.0	Hutyrova y col. 2002 ⁽⁵²⁾
Coreana	95.7	2.9	1.4	Kim y col. 2008 ⁽²⁷⁾
Caucásica (Reino unido)	54.3	40.4	5.3	Gordon y col. 2008 ⁽²⁸⁾
China	97.8	2.2	0	Guo y col. 2009 ⁽⁵⁴⁾

Para el caso del VNTR del gen par a IL-1Ra (*IL1RN*), los alelos que mostraron tener una mayor relevancia para nuestro estudio son los alelos 1 y 2, pues ambos tuvieron diferencias estadísticamente significativas en nuestras poblaciones de estudio. El alelo 1 presenta un riesgo relativo de 2.12, lo que nos indica que los portadores de este alelo presentan poco más de dos veces mayor riesgo a padecer la enfermedad; más aún cuando este alelo se encuentra en estado homocigoto se observa que los portadores de este genotipo tienen 2.3 veces mayor riesgo a padecer la enfermedad de arteritis de Takayasu, no así

cuando se encuentra en estado heterocigoto, ya que no se alcanzó a observar significancia estadística. Por el contrario, el alelo 2 presenta un riesgo relativo de 0.42, lo que nos indica que este alelo podría ser un factor de protección hacia padecer la enfermedad. Nuestros datos correlacionan con lo observado en otros estudios ^(29, 49, 58, 63), y a que si consideramos que la presencia del alelo 2 incrementa la cantidad de IL-1Ra producida, ésta bloquea a los receptores tipo I de IL-1 y no permite que una cantidad elevada (por sobreproducción) de IL-1 tenga efecto, esto protege de que se produzca un daño o por una reacción inflamatoria excesiva y/o crónica que pudiese desencadenar la patogénesis de la arteritis de Takayasu; aunque se requiere de diversos estudios para acercarse a dilucidar el verdadero trasfondo de este padecimiento ^(58, 63).

Existe evidencia nuestra que este polimorfismo en el gen *IL1RN* se relaciona con la susceptibilidad hacia enfermedades individuales como la psoriasis, lupus eritematoso sistémico y enfermedades inflamatorias del intestino ^(24, 26, 45, 57). También se ha reportado un incremento de la presencia del alelo 2 en diversas enfermedades que cursan con una inflamación crónica, como colitis ulcerativa, esclerosis múltiple, nefropatías diabéticas, psoriasis ^(58, 64) y en pacientes con sepsis severa ⁽⁶⁵⁾.

Reportes previos han indicado que el alelo 2 está asociado con un incremento en la producción de la proteína de IL-1Ra *in vitro* ⁽²⁹⁾, en monocitos ^(49, 58, 63) así como también en pacientes con osteoartritis ⁽⁴⁶⁾; además, este alelo se ha reportado como un factor de protección para la severidad de la demencia en la enfermedad de Alzheimer esporádico ⁽⁴⁵⁾, y también con una baja velocidad de estenosis en pacientes con enfermedades de un solo vaso ⁽⁶⁶⁾. Por el contrario otros estudios han reportado que este mismo alelo está asociado con una reducción en la producción de la proteína, por ejemplo en células epiteliales de la columna ^(49, 67) y en células endoteliales ^(51, 52, 63). Ante la ambigüedad en el papel del alelo 2 del VNTR del gen *IL1RN*, el impacto de este polimorfismo en la

producción basal de IL-1Ra posee un interés considerable debido a que implica un posterior nivel de regulación de la proteína IL-1 β ^(27, 56).

Es interesante el especular que el impacto de este polimorfismo varía en las células que sintetizan diferentes tamaños de ARN mensajero por el proceso de corte y empalme (*splicing*) alternativo; aquellas que sintetizan la forma intracelular producen una cantidad menor de IL-1Ra cuando portan el alelo 2, en contraste con los monocitos que sintetizan predominantemente IL-1Ra soluble y producen más proteína cuando portan el genotipo 2,2 ⁽⁶⁸⁾. Aunado a esto, se sabe que un exceso molar de IL-1Ra se requiere para inhibir la acción de la IL-1 en un estado de enfermedad ⁽⁶⁸⁾. Esta puede ser una explicación acerca de las diferencias observadas con otros estudios, pero la compleja relación que puede existir entre el alelo 2 de este polimorfismo con otros polimorfismos y/o mutaciones en el gen *IL1RN* o con genes vecinos a esta región genética podrían determinar los niveles absolutos de proteína producidos ^(20, 21).

Una explicación potencial de estos resultados puede ser provista por el hecho de que los portadores del alelo 2 del VNTR del *IL-1RN* se han asociado con una baja liberación de IL-1 β ^(45, 52, 64), lo que sugiere que este alelo polimórfico reduce la probabilidad de daño a los vasos sanguíneos y de ahí que se podría especular que la asociación de este alelo con otros polimorfismos en el agrupamiento genético de la IL-1, más que la presencia del alelo 2 en sí mismo, pudiese ser crítica hacia la susceptibilidad a padecer arteritis de Takayasu en nuestra población. Los resultados presentados en este trabajo sugieren que la presencia del alelo 1 podría ser un factor de riesgo hacia padecer la enfermedad mientras que la presencia del alelo 2 podría tener un papel protector para desarrollar la enfermedad, lo cual provee evidencia acerca de la importancia de este polimorfismo en la patogénesis de la arteritis de Takayasu.

Finalmente, el análisis de asociación múltiple mostró una diferencia significativa para los portadores de las combinaciones T-T-1 y C-T-1 de los polimorfismos *IL1B* -511 / *IL1B* +3954 / *IL1RN* VNTR respectivamente. Ambas se

observaron como factores de riesgo (OR= 5.24 y 13.73 respectivamente) hacia la susceptibilidad a padecer la arteritis de Takayasu en nuestra población. Esto coincide con los resultados observados para el SNP en la posición +3954 del gen *IL1B*, ya que encontramos la presencia del alelo T como un factor de riesgo hacia la susceptibilidad hacia la enfermedad. Lo mismo ocurre en el caso del alelo 1 para el VNTR del gen *IL1RN*, que también se encontró asociado como un factor de riesgo hacia la enfermedad. Por lo que la combinación de estos alelos puede suponerse como un alto factor de riesgo hacia padecer la arteritis de Takayasu en nuestra población estudiada.

En un estudio de pacientes con cáncer de colon en fase II, Lurge y col. ⁽⁵⁶⁾ reportaron que aquellos pacientes que comparten el haplotipo C-T-1 (*IL1B* -511/*IL1B* +3954/*IL1RN* VNTR) presentaban un mayor riesgo de desarrollar recurrencia al tumor. Smith y col. ⁽⁶⁹⁾ encontraron que la presencia del haplotipo extendido de 2C-CTC-1TT (en el siguiente orden: *IL1A* IVS4 (TTA)_n, *IL1A* -889 C>T, *IL1B* Exón 5 +14 C>T, *IL1B* -31 C>T, *IL1B* -511 C>T, *IL1RN* IVS2 86 bp VNTR, *IL1RN* IVS3 +59 T >C, *IL1RN* Exón 4 + 72 T>C) como factor de riesgo hacia padecer osteoartritis, este haplotipo contiene a los polimorfismos estudiados en el presente trabajo. Aunque no se ha demostrado asociación múltiple de estos mismos polimorfismos en diversos estudios de enfermedades que cursan procesos inflamatorios crónicos con fundamento autoinmune ^(59, 61, 62, 70).

La genotipificación de estos polimorfismos, en especial del SNP en +3954 del gen *IL1B* y del VNTR en el intrón 2 del gen *IL1RN*, y la determinación de asociación múltiple de estos polimorfismos de riesgo, pueden ayudar hacia identificar posibles factores de riesgo o de protección y contribuir en una aproximación hacia el diagnóstico de la enfermedad. Hasta el momento, la investigación acerca del papel que juegan los genes de las citocinas de la familia de la IL-1 en la patogénesis de la arteritis de Takayasu se encuentra aún en un estado temprano, y este trabajo es uno de los primeros que determina la influencia de estos factores hacia la etiología de la enfermedad.

CONCLUSIÓN

Para nuestro conocimiento, éste es uno de los primeros trabajos en los que se analizan las bases genéticas para la arteritis de Takayasu y el primero sobre esta enfermedad en población mexicana. Este trabajo muestra que en la arteritis de Takayasu en la población mexicana, el SNP en el promotor (posición -511) del gen *IL1B* no contribuye a la susceptibilidad a padecer la enfermedad; mientras que para el SNP del exón 5 (posición +3954) del gen *IL1B*, la presencia del alelo T en estado heterocigoto es un factor de riesgo hacia padecer la enfermedad, y la presencia del alelo C en estado homocigoto como factor de protección contra la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. Además, la presencia del alelo 1 (4 repetidos - 410pb) en el VNTR del intrón 2 del gen *IL1RN* en estado homocigoto de manera individual podrían ser factor de riesgo hacia la susceptibilidad a padecer la enfermedad. Aunado a esto, la presencia de las combinaciones de alelos T-T-1 y C-T-1 en los polimorfismos *IL1B* -511 / *IL1B* +3954 / *IL1RN* VNTR, respectivamente, está asociada como un factor de riesgo hacia la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad en nuestra población; aunque se requiere de diversos estudios para acercarse a dilucidar el verdadero trasfondo de este padecimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Johnston S, Lock R, Gompels M. Takayasu arteritis: a review. *J Clin Pathol.* 2002; 55(7): 481-6.
2. Numano F, Okawara M, Inomata H, Kobayashi Y. Takayasu's arteritis. *Lancet.* 2000; 356(9234): 1023-5.
3. Bermudes U, Arteritis de Takayasu. *Alergia, asma e inmunología pediátricas.* 2000; 9(3): 100-5.
4. Numano F. The story of Takayasu arteritis. *Rheumatology.* 2002; 41(1): 103-6.
5. Seko Y. Takayasu arteritis: insights into immunopathology. *Jpn Heart J.* 2000; 41(1): 15-26.
6. Noris M, Daina E, Gamba S, Bonazzola S, Remuzzi G. Interleukin-6 and RANTES in Takayasu arteritis: a guide for therapeutic decisions?. *Circulation.* 1999; 100(1): 55-60.
7. Martínez D, Dabague J, Reyes P. Arteritis de Takayasu en México una serie de 65 casos consecutivos. *R Mex Reum.* 1999; 14(4): 121-9.
8. Seko Y, Minota S, Kawasaki A, Shinkai Y, Maeda K, Yagita H, Okumura K, Sato O, Takagi A, Tada Y, Yasaki Y. Perforin-secreting killer cell infiltration and expression of a 65 kD heat-shock protein in aortic tissue of patients with Takayasu's arteritis. *J Clin Invest.* 1994; 93(2): 750-8.
9. Lagneau P, Michel J, Vuong P. Surgical treatment of Takayasu's disease. *Ann Surg.* 1987; 205(2): 157-66.
10. Numano F, Kobayashi Y. Takayasu arteritis beyond pulselessness. *Intern Med.* 1999; 38(3): 226-32.
11. Nussbaum L, McInnes R, Willard F. Thompson & Thompson genética e n medicina. 7ª ed; *Elsevier Masson.* Barcelona, España. 2008: 175-203.
12. Roitt I, Davies P, Martin S, Burton D. Inmunología fundamentos. 11ª e d; *Editorial médica panamericana.* Buenos Aires, Argentina. 2008: 180-223.
13. Eichhorn J, Sima D, Thiele B, Lindschau C, Turowski A, Schmidt H, Schneider W, Haller H, Luft F. Anti-endothelial cell antibodies in Takayasu arteritis. *Circulation.* 1996; 94(10): 2396-401.

14. Nussinovitch N, Morag B, Rosenthal T. Takayasu pulseless disease. *J Hum Hypertens*. 2001; 15(7): 503-4.
15. Blank M, Krause I, Goldkorn T, Raprotnik S, Livneh A, Langevitz P, Kaganovsky E, Morgenstern S, Cohen S, Barak V, Eldor A, Weksler B, Shoenfeld Y. Monoclonal anti-endothelial cell antibodies from a patient with Takayasu arteritis activate endothelial cells from large vessels. *Arthritis Rheum*. 1999; 42(7): 1421-32.
16. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. inmunología celular y molecular. 6a ed; *Elsevier Saunders*. China. 2008: 267-301.
17. García F. Fundamentos de inmunobiología. Ciudad de México, México; *UNAM*. 1997: 349-93.
18. Dinarello Ch. Inflammation: basic principles and clinical correlates. 2a ed; *Raven Press*. New York, Estados Unidos de Norteamérica. 1992: 211-225.
19. Vicenová B, Vopálenský V, Burýšek L, Pospíšek M. Emerging role of interleukin-1 in cardiovascular diseases. *Physiol Res*. 2009; 58(4): 481-98.
20. Dinarello Ch. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27(1): 519-50.
21. Bujak M, Frangogiannis N. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch Immunol Ther Exp*. 2009; 57(3):165-76.
22. Kataoka T. Chemical biology of inflammatory cytokine signaling. *J Antibiot*. 2009; 62(12): 655-67.
23. Zhang P, Li Y, Xu P, Wu J. Polymorphisms of interleukin-1B and interleukin-1 receptor antagonist genes in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol*. 2004; 10(12): 1826-9.
24. Dinarello Ch. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996; 87(6): 2095-147.
25. Kay J, Calabrese L. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2004; 43 (3): iii2-iii9.
26. Galea J, Armstrong J, Gadsdon P, Holden H, Francis S, Holt C. Interleukin-1 beta in coronary arteries of patients with ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996; 16(8): 1000-6.

27. Kim S, Mok J, Kim H, Jo C. Association of -31T>C and -511C>T polymorphisms in the interleukin 1 beta (*IL1B*) promoter in Korean keratoconus patients. *Mol Vis*. 2008; 14(1): 2109-16.
28. Francis S, Camp, Dewerry R, Gunn J, Syrria P, Carter N, Jeffery S, Kaski J, Cumberland D, Duff G, Crossman D. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and coronary artery disease. *Circulation*. 1999; 99(7): 861-66.
29. Kirii H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y, Asano M, Moriwaki H, Seishima M. Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23(4): 656-60.
30. Rajavashisth T, Liao J, Galis Z, Tripathi S, Laufs U, Tripathi J, Chai N, Xu X, Jovinge S, Shah P, Libby P. Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem*. 1999; 274(17): 11924-9.
31. Galis Z, Muszynski M, Sukhova G, Simo E, Libby P. Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions. *Ann N Y Acad Sci*. 1995; 748(1): 501-7.
32. Shah P, Falk E, Badimon J, Fernandez A, Mailhac A, Villareal G, Fallon J, Regnstrom J, Fuster V. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques, potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation*. 1995; 92(6): 1565-9.
33. Kamari Y, Werman R, Shaish A, Werman A, Harari A, Gonen A, Voronov E, Grosskopf I, Sharabi Y, Grossman E, Iwakura Y, Dinarello C, Apte R, Harats D. Differential role and tissue specificity of interleukin-1alpha gene expression in atherogenesis and lipid metabolism. *Atherosclerosis*. 2007; 195(1) :31-8.
34. Merhi F, Kwak B, Magne D, Chadji Christos C, Berti M, Pelli G, James R, Mach F, Ga bay C. Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E -knockout mice. *Cardiovasc Res*. 2005; 66(3): 583-93.

35. Salven P , Ha ttori K , He issig B , Ra fii S . Interleukin-1alpha pr omotes angiogenesis in v ivo via V EGFR-2 pat hway b y inducing i nflammatory ce ll VEGF synthesis and secretion. *FASEB J.* 2002; 16(11): 1471-3.
36. Voronov E , S houval D, K relin Y , Cagnano E , B enharroch D , I wakura Y , Dinarello C, Apte R. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(5): 2645-50.
37. Nicklin M, Hughes D, Barton J, U re J, Duff G. Arterial i nflammation i n mice lacking the i nterleukin 1 r eceptor antagonist gene. *J Exp Med.* 2000; 191(2): 303-12.
38. Schwager I, Jungi T. Effect of human recombinant cytokines on the induction of macrophage procoagulant activity. *Blood.* 1994; 83(1): 152-60.
39. Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, Mendoza L, Li N, Reddy A, Frangogiannis N. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am J Pathol.* 2008 Jul;173(1):57-67.
40. Murtuza B, Suzuki K, Bou G, Beauchamp J, Smolenski R, Partridge T, Yacoub M. Transplantation of skeletal myoblasts secreting an IL-1 inhibitor modulates adverse remodeling in infarcted murine myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(12): 4216-21.
41. Eriksson U, Kurrer M, Sonderegger I, Iezzi G, Tafuri A, Hunziker L, Suzuki S, Bachmaier K, Bingisser R, Penninger J, Kopf M. Activation of dendritic cells through the interleukin 1 receptor 1 is critical for the induction of autoimmune myocarditis. *J Exp Med.* 2003; 197(3): 323-31.
42. Brasile L, C larke J, A brams A, C erilli J. Risk factors in t he d evelopment of antibodies to vascular endothelial cells. *Transplant Proc.* 1989; 21(1): 716-7.
43. Van der Zee J, Miltenburg A, Siegert C, Daha M, Breedveld F. Antiendothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus: enhanced antibody binding to interleukin-1-stimulated e ndothelium. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994; 104(2): 131-6.

44. Matsuyama A, Sakai N, Ishigami M, Hiraoka H, Kashine S, Hirata A, Nakamura T, Yamashita S, Matsuzawa Y. Matrix metalloproteinases as novel disease markers in Takayasu arteritis. *Circulation*. 2003; 108(12): 1469-73.
45. Garcia M, Lanas A, Santolaria S, Cruzius J, Serrano M, Peña A. The polymorphic IL-1B and IL-1RN genes in the aetiopathogenesis of peptic ulcer. *Clin Exp Immunol*. 2001; 125(3): 368-75.
46. Arman A, Soylu O, Yildirim A, Furman A, Ercelen N, Aydogan H, Coker A, Tezel T. Interleukin-1 receptor antagonist gene VNTR polymorphism is associated with coronary artery disease. *Arq Bras Cardiol*. 2008; 91(5): 293-8.
47. Zhang Y, Zhong L, He B, Li W, Nie J, Wang X, Chen X. The correlation between polymorphism at position -511C/T in the promoter region of interleukin 1B and the severity of coronary heart disease: *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2006; 23 (1): 86-8.
48. Lurje G, Hendifar A, Schultheis A, Pohl A, Husain H, Yang D, Manegold P, Ning Y, Zhang W, Lenz H. Polymorphisms in interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor antagonist associated with tumor recurrence in stage II colon cancer. *Pharmacogenet Genomics*. 2009; 19(2): 95-102.
49. Wilkinson R, Patel P, Llewelyn M, Hirsch C, Pasvol G, Snounou G, Davidson R, Toossi Z. Influence of polymorphism in the genes for the interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1beta on tuberculosis. *J Exp Med*. 1999; 189(12): 1863-74.
50. Endler G, Marculescu R, Starkl P, Binder A, Geishofer G, Müller M, Zöhrer B, Resch B, Zenz W, Mannhalter C. Polymorphisms in the interleukin-1 gene cluster in children and young adults with systemic meningococemia. *Clin Chem*. 2006; 52(3): 511-4.
51. Crilly A, Maiden N, Capell H, Madhok R. Predictive value of interleukin 1 gene polymorphisms for surgery. *Ann Rheum Dis*. 2000; 59(9): 695-9.
52. Huttyrová B, Pantelidis P, Drábek J, Zůrková M, Kolek V, Lenhart K, Welsh K, Du R, Petrek M. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 165(2): 148-51.

53. Gordon A, Kiss E, Stockley I, Eastell R, Wilkinson J. Polymorphisms in the interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 genes affect risk of osteolysis in patients with total hip arthroplasty. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(10): 3157-65.
54. Guo Z, Li C, Lin Z, Huang J, Wei Q, Wang X, Xie Y, Liao Z, Chao S, Gu J. Association of IL-1 gene complex members with ankylosing spondylitis in Chinese Han population. *Int J Immunogenet.* 2010; 37(1): 33-7.
55. Dewberry R, Holden H, Crossman D, Francis S. Interleukin-1 receptor antagonist expression in human endothelial cells and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(11): 2394-400.
56. Hefler L, Grimm C, Lantzsch T, Lampe D, Leodolter S, Koelbl H, Heinze G, Reinthaller A, Tong D, Tempfer C, Zeillinger R. Interleukin-1 and Interleukin-6 gene polymorphisms and the risk of breast cancer in caucasian women. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(16): 5718-21.
57. Naslednikova I, Urazova O, Voronkova O, Strelis A, Novitsky V, Nikulina E, Hasanova R, Kononova T, Serebryakova V, Vasileva O, Sihalentseva N, Churina E, Kolosova A, Fedorovich T. Allelic polymorphism of cytokine genes during pulmonary tuberculosis. *Bull Exp Biol Med.* 2009; 148(2): 175-80
58. Moos V, Rudwaleit M, Herzog V, Höhlig K, Sieper J, Müller B. Association of genotypes affecting the expression of interleukin-1beta or interleukin-1 receptor antagonist with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43(11): 2417-22.
59. Cordeiro C, Moreira P, Costa G, Dutra W, Campos W, Oréfice F, Teixeira A. Interleukin-1 gene polymorphisms and toxoplasmic retinochoroiditis. *Mol Vis.* 2008; 14 (1): 1845-49.
60. Zabaleta J, Su L, Lin H, Sierra R, Hall M, Sartor A, Clark P, Hu J, Ochoa A. Cytokine genetic polymorphisms and prostate cancer aggressiveness. *Carcinogenesis.* 2009; 30(8): 1358-62.
61. Sicinschi L, Lopez L, Camargo M, Correa P, Sierra R, Henry R, Chen J, Zabaleta J, Piazuelo M, Schneider B. Gastric cancer risk in a Mexican population: role of Helicobacter pylori CagA positive infection and

- polymorphisms in interleukin-1 and -10 genes. *Int J Cancer*. 2006; 118(3): 649-57.
62. Garza E, Bosques F, El-Omar E, Hold G, Tijerina R, Maldonado H, Pérez G. Role of the polymorphic *IL1B*, *IL1RN* and *TNFA* genes in distal gastric cancer in Mexico. *Int J Cancer*. 2005; 114(2): 237-41.
63. Hirankarn N, Kimkong I, Kummee P, Tangkijvanich P, Poovorawan Y. Interleukin-1beta gene polymorphism associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*. 2006; 12(5): 776-9.
64. Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. *Eur J Immunol*. 1998; 28(8): 2598-602.
65. Bosco P, Guéant R, Anello G, Romano A, Namour B, Spada R, Caraci F, Tringali G, Ferri R, Guéant J. Association of IL-1 RN*2 allele and methionine synthase 2756 AA genotype with dementia severity of sporadic Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004; 75(7): 1036-8.
66. Francis S, Camp N, Burton A, Dewberry R, Gunn J, Stephens A, Cumberland D, Gershlick A, Crossman D. Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism and restenosis after coronary angioplasty. *Heart*. 2001; 86(3): 336-40.
67. Dewberry R, Crossman D, Francis S. Interleukin-1 receptor antagonist (*IL1RN*) genotype modulates the replicative capacity of human endothelial cells. *Circ Res*. 2003; 92(12): 1285-7.
68. Moreno G, Blanco J, Lacasaña M, Rothenberg S, Aguilar C, Gamboa R, Pérez O. Maternal exposure to floricultural work during pregnancy, PON1 Q192R polymorphisms and the risk of low birth weight. *Sci Total Environ*. 2009; 407(21): 5478-85.
69. Smith A, Keen L, Billingham M, Perry M, Elson C, Kirwan J, Sims J, Doherty M, Spector T, Bidwell J. Extended haplotypes and linkage disequilibrium in the *IL1R1-IL1A-IL1B-IL1RN* gene cluster: association with knee osteoarthritis. *Genes Immun*. 2004; 5(6): 451-60.

70. Grimm C, K antelhardt E , H einze G , P olterauer S , Z eillinger R , K ölbl H , Reinthaller A , Hefler L. T he pr ognostic value of f our interleukin-1 gene polymorphisms in Caucasian women with breast cancer: a multicenter study. *BMC Cancer*. 2009; 9(1): 78-84.

ANEXOS

ANEXO 1

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHAVEZ"

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre del paciente: _____

Domicilio: _____

Teléfono casa: _____ cel. _____

No de expediente/afiliación: _____

Por medio de la presente doy mi consentimiento para participar de manera voluntaria y sin percepción económica alguna, en el protocolo de investigación intitulado "RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO GENÉTICO DE LA INTERLEUCINA-1 Y EL ANTAGONISTA DEL RECEPTOR DE LA INTERLEUCINA-1 SOBRE LA INCIDENCIA DE LA ARTERITIS DE TAKAYASU EN PACIENTES MEXICANOS".

Por lo cual acepto donar una muestra de sangre para la obtención de suero, plasma, leucocitos y material genético (ADN y ARN); y a que se me realice un ultrasonido de la arteria carotídea. Entiendo que los datos generados así como el nombre (s) del (los) participante (s) son totalmente confidenciales y anónimos.

Me han explicado la importancia y utilidad de la investigación, así como he comprendido las explicaciones las cuales se me han dado de manera clara y sencilla, y que el médico que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado. También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que ahora presto.

NOMBRE Y FIRMA DEL RESPONSABLE
DEL PROYECTO

NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE

NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO

NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO

MÉXICO D.F. A _____ DEL MES DE _____ DE 20__.

ANEXO 2

Técnica de obtención de DNA por el método de precipitación salina.

1. Recolectar 8-10mL de sangre total periférica con anticoagulante (EDTA).
2. En un tubo Falcon de 50mL poner 40mL de solución de lisis (SL 1X) y vaciar toda la sangre. Mezclar vigorosamente la solución.
3. Centrifugar la solución a 1200 rpm/10min. Quitar el sobrenadante con pipeta con cuidado, sin tocar el paquete.
4. Agregar nuevamente solución SL 1X hasta 40mL. Centrifugar a 1200 rpm/10min.
5. Quitar nuevamente el sobrenadante, sin tocar el paquete. En este paso se puede invertir el tubo y dejar escurrir. Repetir el lavado hasta que el paquete este limpio (color blanco).
6. Agregar al tubo Falcon: 260mL de agua estéril; 160µL de amortiguador de proteinasa k; 40µL de SDS al 20% y 40µL de proteinasa k.
7. Resuspender el paquete con la solución. Transferir a un tubo Eppendorf de 1.5mL previamente marcado. Mezclar vigorosamente.
8. Incubar a 37° C toda la noche o a 55° C durante 3-4 horas (en este caso agregar 20µL más de proteinasa).
9. Terminada la incubación agregar 240µL de NaCl 5M. mezclar vigorosamente. Centrifugar a 1400 rpm/10min.
10. Recuperar el sobrenadante en otro tubo Eppendorf previamente marcado sin tomar el precipitado.
11. Centrifugar nuevamente a 14000/10min. Recuperar el sobrenadante. Repetir este paso hasta que el sobrenadante no tenga sedimentos.
12. Agregar etanol frío al 95% e invertir el tubo hasta que aparezca un precipitado blanco (DNA). Se recomienda dejarlo en el congelador unos minutos.
13. Centrifugar a 14000/10min. Eliminar el sobrenadante por decantación y agregar etanol frío al 70% (lavado).
14. Centrifugar nuevamente a 14000 rpm/5min. Se elimina el sobrenadante por decantación y se deja escurrir el tubo boca abajo.

15. Secar el tubo a 37°C o en el concentrador de DNA.
16. Agregar de 50 a 100µL de agua estéril y dejar a temperatura ambiente durante 2 horas hasta que se resuspenda el DNA en el agua.
17. Medir la absorbancia del DNA a 260nm y la absorbancia de las proteínas a 280nm, la relación entre las absorbancias (260/280) nos da la pureza. Este valor debe corresponder entre 1.7-1.8

Procedimiento para ajustar la concentración del DNA.

$$(\text{Abs}_{260\text{nm}}) \times (50 \text{ ng}) \times (100\mu\text{L}^{-1}) = \text{ng}/\mu\text{L} \times (\text{Vol. total del tubo}) = \text{ng totales en el tubo}$$

Para ajustar a 200ng/µL dividir los ng totales entre 200 y al resultante restarle el volumen total del tubo Eppendorf y ese valor es el que hay que agregar de agua al tubo para ajustar la concentración del DNA a 200ng/µL.

UDO: unidad de densidad óptica a 260nm = 50ng X 100µL (Vol. de dilución) = 5000

Ejemplo:

$$\text{Abs}_{260\text{nm}} (0.0565) \times 50\text{ng} \times 100 (\text{factor de dilución}) = 282.5\text{ng}/\mu\text{L}.$$

$$282.5\text{ng} \times 90\mu\text{L} (\text{Vol. del tubo}) = 25425\text{ng en } 90\mu\text{L} (\text{concentración total})$$

$$25425/200 (\text{concentración deseada}) = 127.125\text{mL} - 90\text{mL} (\text{volumen en tubo}) = 37.125\mu\text{L} (\text{volumen a agregar para ajustar a } 200 \text{ gm}/\mu\text{L}).$$

ANEXO 3

Amplificación por PCR.

En un tubo matriz se coloca la mezcla de reacción para, posteriormente, distribuir en los microtubos para PCR.

Cantidades utilizadas para la amplificación por PCR:

<u>Reactivos:</u>	<u>volumen 25 μl</u>
Mezcla de dNTP [1.25 mM]	4 μ l
Amortiguador libre de Mg [10X]	2.5 μ l
MgCl ₂ [25mM]	1.5 μ l
Iniciador 1 [10 μ M]	2.5 μ l
Iniciador 2 [10 μ M]	2.5 μ l
Taq Polimerasa	0.125 μ l
Agua	10.6 μ l
DNA [200ng/ μ l]	2.5 μ l

ANEXO 4

Preparación para gel de agarosa al 3% para electroforesis horizontal.

Soluciones	Cámara de 35x40
Agarosa	3 g
Amortiguador TAE (Tris-acetato-EDTA) 50X	2mL
AGUA	Llevar a 100 ml con agua destilada.

1. Pesar la agarosa y agregar el amortiguador TAE 50X.
2. Aforarlo con agua destilada; calentar en el microondas 30 segundos.
3. Agitar y volver a calentarlo por 10 segundos, aproximadamente, hasta que se disuelva la agarosa. Dejar enfriar hasta $\pm 50^{\circ}\text{C}$. Verter el gel en la cámara de electroforesis sin que se formen burbujas. Colocar el peine y esperar hasta que polimerice (20 min aprox).
4. Llenar la cámara de electroforesis con amortiguador TAE 1X.
5. Para separar las muestras de DNA mezclarlas con solución de amortiguador de siembra para electroforesis a razón de 1:4 μL .
6. Aplicar una carga de 80 V durante 30 min, para que los amplificados de la PCR se separen.
7. Para teñir el gel, se coloca en un recipiente con 100mL de agua y 7 μL de bromuro de etidio (10 mg/mL).

ANEXO 5

Preparación para gel de acrilamida al 8% para electroforesis vertical

Soluciones	Cámara de 10 x 10
Agua	4.6 mL
Acrilamida	2.6 mL
Amortiguador TBE (Tris-borato EDTA) 10x	0.8 mL
TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilenediamina)	16µL
Persulfato de amonio 10%	64µL

1. Lavar los vidrios con dextran, verificar que se encuentren desengrasados (si es necesario limpiarlos con etanol).
2. Montar los vidrios a la cámara, asegurarse que esté limpia y que no presente fugas.
3. Preparar el gel con las cantidades de las soluciones mencionadas de acuerdo al tamaño de la cámara, agregar hasta el final el TEMED y el persulfato de amonio (agentes polimerizantes).
4. Verter el gel de manera rápida y cuidadosa a la cámara para evitar la presencia de burbujas y la solidificación del gel. Colocar los peines inmediatamente, antes de que polimerice.
5. Esperar que polimerice y cargar la muestra de DNA con solución de amortiguador de siembra para electroforesis a razón de 1:4 µL.
6. Correr a 80 V por 4 horas.

ANEXO 6

Tinción con plata.

1. Solución fijadora del gel (preparar 300 mL) (10-15 min)

Etanol al 10%: agregar 30 mL

Acido acético al 0.5%: agregar 1.5 mL

2. Solución de tinción (preparar 100 mL) (5 min)

AgNO₃ al 0.2%: pesar 200mg

Disolver en 100 mL de la solución fijadora (1)

3. Solución de revelado (preparar 100 mL) (10 min)

NaOH al 3%: pesar 3 gr.

Formaldehido: agregar 300 µL

Aforar con agua destilada a 100 mL

4. Solución de paro (preparar 100 mL)

Acido acético glacial al 1.5%: agregar 1.5 mL

Aforar al 100 mL con agua destilada.

- Enjuagar el recipiente con agua destilada y con la solución fijadora
- Agregar 200 mL de la solución fijadora (1) al recipiente
- Poner el gel en el recipiente con la solución, agitando levemente por 10-15 min
- Quitar la solución fijadora y agregar la solución de tinción (2), agitando levemente por 5 min.
- Quitar la solución fijadora y enjuagar con agua destilada.
- Agregar la solución de revelado (10 ml) enjuagar bien para que precipite el nitrato de plata (AgNO₃). Volver a enjuagar con agua destilada
- Agregar los 90mL restantes a la solución de revelado (3) y agitar levemente hasta que aparezcan las bandas (10 minutos aproximadamente)
- Parar la reacción inmediatamente después de que se visualicen bien las bandas que se esperan con la solución de paro (4).

ANEXO 7

Cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Es una relación matemática sencilla para el cálculo de las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas en una población. El principio de Hardy-Weinberg se basa en los supuestos fundamentales. El primero es que, en determinadas condiciones ideales, existe una relación simple entre las frecuencias alélicas y las genotípicas en una población. Supongamos que p es la frecuencia del alelo A y q la del alelo a en el conjunto genético, y que los alelos se combinan al azar para formar genotipos, es decir que los apareamientos en la población ocurren completamente al azar con respecto a los genotipos en ese sitio genético. La ley de Hardy-Weinberg postula que la frecuencia de los tres genotipos, AA , Aa y aa , viene dada por los términos de la fórmula binomial:

$$(p+q)^2=p^2 + 2pq + q^2$$

Un segundo componente del principio de Hardy-Weinberg es que las frecuencias de los genotipos permanecerán constantes, en el equilibrio, de generación en generación, si las frecuencias alélicas p y q permanecen constantes. Cuando los emparejamientos se dan al azar en una población que está en equilibrio y donde los genotipos AA , Aa y aa están presentes en las proporciones $p^2: 2pq: q^2$, entonces las frecuencias genotípicas en la generación siguiente mantendrán las mismas proporciones relativas de $p^2: 2pq: q^2$

Ejemplo: Cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg para el SNP en -511 en nuestra población de estudio:

Tabla 13. Frecuencias genotípicas (Fg) para la conformidad con EHW del SNP en la posición -511 del gen *IL1B* en la población de estudio.

IL1B (-511)	Pacientes con TA (n=58) Fg	Controles (n=161) Fg	Total observado (n=219) Fg	Total esperado (n) Fg
CC	(9) 0.155	(12) 0.075	(21) 0.096	(15.4) 0.059
CT	(15) 0.259	(59) 0.366	(74) 0.338	(85.3) 0.367
TT	(34) 0.586	(90) 0.559	(124) 0.566	(118.4) 0.574
χ^2				3.831
p				0.05032

Primero obtenemos las frecuencias alélicas (F_a) para la población de estudio:

$$\begin{aligned} \text{Alelos C totales} &= 21 + 21 + 74 = 116 & F_{a_C} &= \frac{116}{438} = 0.265 \\ \text{Alelos T totales} &= 124 + 124 + 74 = 322 \\ \text{alelos totales} &= 438 & F_{a_T} &= \frac{322}{438} = 0.735 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} p^2 + 2pq + q^2 &= 1 & CC_{ESP} &= n * p^2 = 219 * (0.265)^2 = 15.4 \\ \text{Donde :} & & CT_{ESP} &= n * 2pq = 219 * [2(0.265 * 0.735)] = 85.3 \\ p = F_{a_C} &= 0.265 & TT_{ESP} &= n * q^2 = 219 * (0.735)^2 = 118.4 \\ q = F_{a_T} &= 0.735 & n &= \text{población total} = 219 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \chi^2 &= \sum \frac{(OBS - ESP)^2}{ESP} \\ \chi^2 &= \frac{(21 - 15.4)^2}{15.4} + \frac{(74 - 85.3)^2}{85.3} + \frac{(124 - 118.4)^2}{118.4} \\ \chi^2 &= 2.070 + 1.492 + 0.269 = 3.831 \end{aligned}$$