



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHAVEZ”

**RELACION ENTRE EL POLIMORFISMO DEL GEN DEL
RECEPTOR P2X7 CON ENFERMEDADES AUTOINMUNES
INFLAMATORIAS (LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO Y
ARTRITIS REUMATOIDE)**

TESINA PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

PRESENTA:

BIOQ.CLIN. MARIA JOSE JARAMILLO ESTRELLA

TUTOR: DR. RICARDO GAMBOA ÁVILA



MÉXICO, D.F.

2012



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: Dra. Rosenda Peñaloza Espinosa

VOCAL: Dr. Vicente Castrejón Téllez

SECRETARIO: M. en C. Guadalupe Ortiz López

1er. SUPLENTE: Dra. Claudia Huesca Gómez

2do. SUPLENTE: M. en C. Isela Montúfar Robles

TRABAJO REALIZADO EN:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA " IGNACIO CHAVEZ"

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

ASESOR DEL TEMA

DR. RICARDO GAMBOA AVILA

SUSTENTANTE

BIOQ.CLIN. MARIA JOSE JARAMILLO E.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por brindarme la oportunidad de continuar con mis sueños y permitirme estar donde estoy.

Agradezco a mis padres por ser mi fuente de inspiración, estar siempre a mi lado y brindarme todo su apoyo.

Agradezco a la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, fuente de sapiencia, y testigo silencioso de tanto sacrificio y constancia, por guardar tantas risas y lágrimas que han sido parte de este proceso.

Agradezco a todos los profesores por su sabiduría, conocimiento y paciencia, por brindarme su apoyo y hacerme entender los misterios de la ciencia y a su vez de la vida.

Al Dr. Ricardo Gamboa, mi tutor y amigo por colaborar, guiarme y ser parte fundamental en la elaboración de este trabajo investigativo.

Un especial agradecimiento a la Dra. Claudia Huesca y al Dr. Vicente Castrejón, quienes forman parte del equipo investigativo del Laboratorio de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, por su ayuda, colaboración y consejos prácticos para enaltecer la investigación.

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación quiero dedicar con mucho amor:

A mis papis Bolívar y Yolanda, por su amor, confianza, apoyo incondicional, por ser mis pilares, mis amigos, los mejores consejeros, mi ejemplo y mi guía en cada paso; gracias a ellos he podido cumplir otra meta más.

A mis hermanos Luis y Hugo, con quienes he compartido muchos momentos de alegría y gracias a su cariño se han convertido en los guardianes de mis pasos y compañeros de vida.

A toda mi familia por estar pendientes de mis estudios y alegrarse con mis triunfos.

A mis amigas, amigos, compañeras y compañeros por haber compartido momentos de distracción, alegría y compañerismo, por estar en los momentos tristes, en los días difíciles y formar parte de mi familia en México.

A mis amigas y amigos en Ecuador que siempre han estado para mí a pesar de la distancia, y se han convertido en un apoyo importante.

Dedico además este trabajo a todos los colegas profesionales y estudiantes por tener la fuerza, la resistencia y la convicción necesaria para formar parte de una gran familia, sintiéndonos orgullosos de ser Bioquímicos Clínicos.

ABREVIATURAS

ACR (Colegio Americano de Reumatología)	IRF5 (Factor de interferón 5)
ADP (Adenosin difosfato)	KN-62 [4-[2-[(5-isoquinolinilsulfonil)metilamino-3-oxo-3-(4-fenil-1-piperazinil)propiléster fenilol]
AINE`S (Anti-inflamatorio no esteroideos)	LES (Lupus eritematoso sistémico)
AMP (Adenosin monofosfato)	LPS (Lipopolisacáridos)
AR (Artritis reumatoide)	MP (Membrana plasmática)
ATP (Adenosin trifosfato)	NMDG (N-metil-D-glutamina)
BzATP (3'-O-(4-benzoil) benzoil adenosin -5'-trifosfato)	PLD (Fosfolipasa D)
C(n) (Factor de complemento)	PNTP22 (Proteína tirosin-fosfatasa tipo 22)
CALMIDAZOLIUM {1 - [bis (4-clorofenil) metil] -3 - [2 - (2,4-diclorofenil) -2 - (2,4-dichlorophenylmethoxy)-etil]-1Himidazolium}	PPADS (Piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfonato)
CTLA4 (Antígeno 4 asociado a linfocito T-citotóxico)	ROS (Especies reactivas de oxígeno)
DS (Desviación estándar)	SNP`s (Polimorfismos de un solo nucleótido)
HLA (Antígeno leucocitario humano)	STAT4 (Proteína STAT, factor de transcripción)
HLA-DRn (Antígeno leucocitario humano clase II)	TLRn (Receptor tipo Toll)
H-W (Hardy-Weinberg)	VSG (Velocidad de sedimentación globular)
IL (Interleucina)	

ÍNDICE DE CONTENIDO

JURADO ASIGNADO	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
ABREVIATURAS	v
ÍNDICE DE CONTENIDO	6
RESUMEN.....	9
PALABRAS CLAVE.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 AUTOINMUNIDAD.....	10
1.2 ENFERMEDADES AUTOINMUNES	11
1.3 LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO.....	11
1.3.1 HISTORIA	12
1.3.2 EPIDEMIOLOGIA	13
1.3.3 PREVALENCIA.....	13
1.3.4 PATOGENIA.....	13
1.3.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	15
1.3.6 LABORATORIO	19
1.3.7 TRATAMIENTO.....	19
1.4 ARTRITIS REUMATOIDE	21
1.4.1 HISTORIA.....	21
1.4.2 EPIDEMIOLOGIA.....	22

1.4.3 ETIOLOGÍA.....	22
1.4.4 LABORATORIO.....	23
1.4.5 TRATAMIENTO.....	23
1.5 GENETICA DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES	24
1.6 GEN <i>P2X7</i>	24
1.6.1 RECEPTOR P2X7.....	25
1.6.2 AGONISTAS DEL RECEPTOR P2X7.....	27
1.6.3 ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR P2X7.....	28
1.6.4 PERMEABILIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA A TRAVÉS DEL RECEPTOR P2X7.....	29
1.6.5 MUERTE CELULAR Y RECEPTOR P2X7.....	31
1.6.6 REGULACIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA POR EL RECEPTOR P2X7 COMPOSICIÓN Y TRÁFICO.....	32
1.6.7 POLIMORFISMOS.....	32
JUSTIFICACION.....	34
OBJETIVOS.....	35
HIPOTESIS	35
METODOLOGÍA.....	36
5.1 METODOS.....	36
5.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	36
5.1.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	36
5.1.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	36
5.1.4 VARIABLES.....	37

5.2	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	41
5.2.1	DIAGNOSTICO DE LUPUS Y ARTRITIS.....	41
5.2.2	EXTRACCION DE DNA.....	42
5.2.3	ESTUDIOS MOLECULARES.....	42
5.2.4	ANALISIS ESTADISTICO.....	43
	RESULTADOS	43
	DISCUSION.....	58
	CONCLUSIONES.....	64
	REFERENCIAS	65
	ANEXOS.....	72

RESUMEN

El Lupus eritematoso sistémico (LES) y la Artritis reumatoide (AR) son enfermedades autoinmunes inflamatorias; LES se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra componentes del núcleo celular, que conlleva a un incremento en la apoptosis de células linfoides y la AR se manifiesta por la inflamación crónica de múltiples articulaciones.

Existe una gran diversidad de genes implicados en procesos inflamatorios, por ejemplo el gen *P2X7* se expresa principalmente en células derivadas de médula ósea como monocitos, macrófagos y linfocitos, que están involucrados en diversas funciones como: proliferación celular, fusión de macrófagos, inducción de apoptosis, y liberación de interleucina 1- β . Por lo tanto se sugiere que la expresión del *P2X7* podría estar involucrada en la patogénesis de procesos inflamatorios.

En este trabajo se analizó el polimorfismo A1513C del gen *P2X7* a 251 pacientes: 69 con LES, 70 con AR y 112 controles, en el departamento de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. Para los sujetos con LES se observó una frecuencia alélica para A del 77.5% y para C del 22.5% y una frecuencia genotípica para AA: 58%; CC: 2.9% y AC: 39.1%. En AR la frecuencia alélica fue para A 77.8% y para C 22.2%, y la frecuencia genotípica fue para AA 60%; CC 4.3% y AC 35.7%. Para el grupo control la frecuencia alélica fue para A 81.3% y C 18.7%, y la frecuencia genotípica para AA fue de 64.3% para CC de 1.8% y para AC de 33.9%. Al realizar el análisis estadístico entre controles y pacientes no se encontró diferencias significativas tanto en lupus eritematoso sistémico como en artritis reumatoide, por lo que se puede inferir que no existe relación entre el polimorfismo del gen *P2X7* y la incidencia de estas enfermedades en población mexicana.

PALABRAS CLAVE: Autoinmunidad, Polimorfismo, Receptor *P2X7*

INTRODUCCIÓN

1.1 AUTOINMUNIDAD

La autoinmunidad consiste en la pérdida de la tolerancia inmunológica a los constituyentes propios, y la tolerancia inmunológica se define como una falta de respuesta controlada (Peakman, 2011). Los seres humanos tenemos la capacidad y el potencial de organizar respuestas inmunes debido a la autoinmunidad fisiológica por linfocitos T reguladores y a la autoinmunidad patológica.

La autoinmunidad fisiológica se clasifica de acuerdo a la naturaleza de los tejidos diana y los mecanismos autoinmunes subyacen en varias enfermedades: algunas son órgano-específicas y otras con distribución sistémica. Las enfermedades autoinmunes pueden superponerse es decir un individuo puede tener más de un desorden órgano-específico, ó más de una enfermedad sistémica (Peakman, 2011).

La autoinmunidad patológica se define por reacciones de base inmunológica, habitualmente persistentes y de larga duración, en las que intervienen antígenos propios (autoantígenos) (Lind, et al., 2005). Su expresión clínica es la consecuencia de la alteración orgánica o funcional de las células, u órgano donde reside el antígeno que interviene en la reacción (enfermedades autoinmunes órgano-específicas).

Cuando complejos de autoantígeno-autoanticuerpos, circulan por la sangre y se depositan en diversos lugares del organismo dan lugar a patologías en diferentes órganos, y constituyen la base de las denominadas enfermedades autoinmunes sistémicas o no órgano específicas (Peakman, 2011).

1.2 ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan porque el sistema inmunitario actúa contra las células del propio organismo. En este caso, el sistema inmunitario se convierte en el agresor y destruye partes constitutivas del cuerpo en vez de protegerlo.

Durante este proceso existe una respuesta inmune exagerada contra sustancias y tejidos que normalmente están presentes en el cuerpo. Las causas son aún desconocidas, pero está relacionada con el reconocimiento proteico entre las superficies de las membranas celulares del sistema inmunitario (Rioux, et al., 2005).

Las enfermedades autoinmunes se clasifican en:

- Enfermedades autoinmunes específicas de órganos donde hay una lesión irreparable de las células diana, provocando pérdida de las secreciones endocrinas.
- Enfermedades autoinmunes no específicas de órganos o enfermedades autoinmunes sistémicas donde la inflamación y la afectación pueden ser difusas, con frecuencia sobre articulaciones o vasos sanguíneos de pequeño calibre.

Dentro de las enfermedades autoinmunes sistémicas podemos encontrar al lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide que son las 2 enfermedades de este estudio.

1.3 LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

Lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad multisistémica, autoinmune y crónica con un componente inflamatorio muy importante, que se caracteriza por una alteración en la respuesta inmunológica con producción de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos celulares.

El resultado final es la afección tisular de múltiples órganos, aparatos y sistemas (Font, et al., 2003). La expresión clínica de este padecimiento es muy variable como resultado del compromiso sistémico y posiblemente la intervención de factores relacionados entre sí como genéticos, inmunológicos y ambientales. Se identifica por sus manifestaciones clínicas y diversos autoanticuerpos circulantes, en particular los autoanticuerpos dirigidos contra los componentes del núcleo celular, los mismos que desempeñan un papel diagnóstico y patogénico fundamental (Conti, et al., 2012). LES es una enfermedad rara del tejido conectivo, que afecta a algunos órganos, como pulmones, ojos, esqueleto, corazón y vasos sanguíneos. Afecta a una de cada 10,000 personas (Pisetsky, et al., 2000).

1.3.1 HISTORIA

Se establecen tres períodos en la historia de LES: el período clásico, el neoclásico y el moderno. En el **período clásico** la enfermedad fue reconocida por primera vez en la edad media donde se describieron las primeras manifestaciones dermatológicas de la enfermedad. Y en el siglo XII el médico Rogerius¹ atribuyó el término Lupus para describir el eritema malar clásico. Durante el **período neoclásico** Móric Kaposi² en 1872 reconoce la manifestación sistémica de la enfermedad.

¹ Rogerius, cirujano de Salerno que vivió en el siglo XII (1140-1195). Se le conoció también como Rogerius Salernitanus (<http://www.galenusrevista.com/spip.php?article144>).

² Moritz Kaposi (nacido el 23 de octubre 1837 en Kaposvár, Hungría - 6 de marzo 1902 en Viena, Austria) fue un importante médico húngaro y dermatólogo, descubridor del tumor de piel que lleva su nombre (http://es.wikipedia.org/wiki/Moritz_Kaposi)

El **período moderno** empieza en 1948 con el descubrimiento de las células del lupus eritematoso; este período se caracteriza por avances en fisiología patológica, y las características clínicas y de laboratorio de la enfermedad, así como los avances en el tratamiento (Wakeland, et al., 1999).

1.3.2 EPIDEMIOLOGIA

LES es una enfermedad de distribución mundial, afecta a todas las poblaciones humanas con mayor trascendencia en la población africana (Font, et al., 2003) tiene predominio por el género femenino en la proporción de 9:1; se manifiesta en cualquier edad siendo más frecuente en la etapa productiva y reproductiva de la vida (entre 20 y 40 años).

1.3.3 PREVALENCIA

LES en la población general a nivel mundial tiene una prevalencia entre 4 y 250 casos por cada 100.000 habitantes. En Norteamérica, Asia y en el norte de Europa afecta a 40 de cada 100.000 habitantes, y también se ha reportado que existe una mayor incidencia entre la población hispana y afroamericana (Hochberg, 1997).

1.3.4 PATOGENIA

Aun cuando no se conoce su etiología, se han identificado tres factores básicos relacionados con la patogenia LES: genéticos, hormonales y ambientales

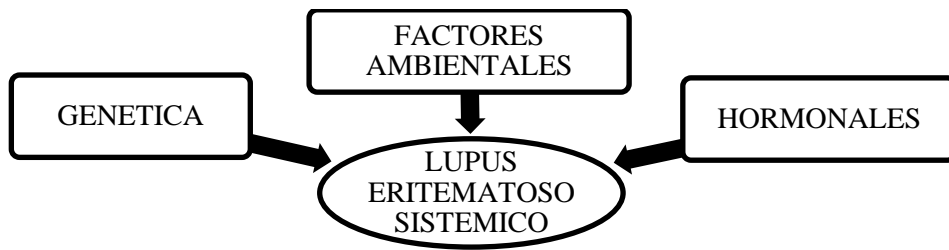
Los **factores genéticos** se presentan más frecuente (hasta 10 veces) en familiares de pacientes con LES que en la población general. Existe una mayor concordancia entre gemelos idénticos (monocigotos) comparada con heterocigotos (60% vs 9%) (Conti, et al., 2012).

Se ha visto una asociación de LES con antígenos HLA clase II (HLA-DR2 y HLA-DR3) tanto en población caucásica como africana (Smyth, et al., 2009). Además se ha relacionado a LES con enfermedades hereditarias por deficiencia de complemento: C1r, C1s, C1, C4, C2, C5 y C8 principalmente con deficiencia de C2.

La deficiencia parcial de C2 en heterocigotos es también más frecuente, del 6% en LES vs 1% en normales. Esta anomalía congénita se asocia con HLA-A10 y HLA-B18 (Conti, et al., 2012).

Los **factores hormonales** se presentan principalmente en mujeres e inicia con frecuencia en los periodos cercanos a la menarquia, durante el embarazo o en el periodo postparto, además se lo ha relacionado con el consumo de anticonceptivos orales, en particular con los que contienen estrógenos (Smyth, et al., 2009). Los estrógenos aumentan la producción de autoanticuerpos y son capaces de ocasionar depresión de la inmunidad celular (Al, et al., 2009).

Diversos **factores ambientales** están relacionados con LES entre ellos está: la relación entre la exposición a la luz solar y/o infecciones víricas o bacterianas con el inicio o exacerbación de LES. La exposición ocupacional a metales pesados como cadmio, mercurio, oro y otros elementos relacionados con la producción de anticuerpos antinucleares como sílice, pesticidas y polivinilo. La participación de medicamentos en la inducción de anticuerpos antinucleares como la procainamida, hidralazina, clorpromazina, isoniazida y anticonvulsivantes, así como la colocación de implantes de silicona y la desnutrición proteico-calórica (Alonso-Pérez, et al., 2011).



Cuadro 1. Factores implicados en la patogenia de Lupus eritematoso sistémico (M.J.J.E.)

1.3.5 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Entre las manifestaciones más frecuentes de LES se encuentran la fatiga, astenia, fiebre en la mayoría de los casos, pérdida de peso y malestar general. Las alteraciones en piel, pelo y las mucosas ocupan el segundo lugar entre las manifestaciones clínicas (85% de los casos). El eritema facial clásico en alas de mariposa (Figura 1) ocurre en 52% y es consecuencia frecuente de fotosensibilidad; también se puede localizar en el tórax, espalda y brazos incluyendo lesiones eritematosas simétricas superficiales con zonas centrales atróficas anulares (Wallace, et al., 2007).



Figura 1 Eritema Malar Clásico
(Adaptada de <http://www.institutferran.org/lupus.htm>)

El lupus eritematoso discoide se localiza en la piel cabelluda, pabellones auriculares, cara y cuello y se asocia con frecuencia a fotosensibilidad y fenómeno de Raynaud. La alopecia y la fragilidad del pelo aparecen en el 70% de los pacientes y en general se correlaciona con la actividad de la enfermedad. En el 40% de los pacientes con LES se observan ulceraciones en mucosas orales y pueden presentarse vasculitis, lesiones bulosas, púrpura, equimosis y petequias (Wallace, et al., 2007).

Entre otras manifestaciones clínicas están las **músculo-esqueléticas** que se caracterizan por la presencia de artralgias y artritis en 95% de los casos y en ocasiones se prestan a confusión con artritis reumatoide en particular en la etapa inicial, sobre todo porque se localizan con frecuencia en las manos y en las rodillas. Algo semejante son la rigidez o entumecimiento articular matutino y los nódulos subcutáneos. Radiológicamente, no hay disminución en el espacio articular y pocas veces ocurren cambios como los descritos para la artritis reumatoide (osteopenia yuxtaarticular y erosiones) (Deng, et al., 2010).

También se encuentran **manifestaciones renales** en donde el 50% de los casos se expresan clínicamente como proteinuria. La biopsia renal es importante y la información es mayor cuando se aplica microscopía electrónica o inmunofluorescencia (Wallace, et al., 2007).

Existen **manifestaciones neuro-psiquiátricas** que se caracterizan por un daño directo mediado por mecanismos inmunológicos o secundarios a daños en otros órganos o por complicaciones del tratamiento. Puede estar afectada cualquier área del sistema nervioso central, periférico o autónomo (Deng, et al., 2010).

Se pueden presentar convulsiones en una sexta parte de los casos coincidiendo con actividad del LES; con una frecuencia semejante para neuropatía periférica (mononeuritis múltiple); además de estados depresivos y psicosis (en estas últimas no debe soslayarse la posible intervención de los corticoesteroides utilizados frecuentemente en LES).

Dentro de las **manifestaciones cardiovasculares** la pericarditis se presenta en 25% a 30% de los casos, a veces asociada con miocarditis. La valvulopatía mitral o aórtica, en ocasiones asociada con tromboembolia. La aterosclerosis es 9 veces más frecuente en estos pacientes en relación con la población general. Se puede observar un bloqueo cardíaco congénito en recién nacidos de madres con LES. Fenómeno de Raynaud³ a veces precediendo la aparición de las manifestaciones generales con tromboflebitis en 10% de los casos y con mayor frecuencia cuando coincide con la presencia de un anticoagulante circulante (Smyth, et al., 2009).

Los pacientes con LES pueden presentar **manifestaciones pleuropulmonares** donde la más frecuente es la pleuritis con y sin derrame, pueden verse afectadas las vías respiratorias incluyendo los pulmones; además pueden mostrar **manifestaciones gastrointestinales** como la presencia de dolor abdominal (más frecuente en niños), síntomas digestivos altos, pancreatitis y arteritis mesentérica. Además de ascitis en 10% de los pacientes, úlcera péptica, apendicitis y diverticulitis con hepatomegalia en cerca del 30% de los pacientes, más frecuente en la infancia.

³ Raynaud, Maurice Auguste Gabriel Raynaud, fue un médico francés (* 5 de julio 1834 - 29 de junio 1881) quien describió por primera vez el fenómeno vasomotor hoy conocido como síndrome de Raynaud (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/raynaudsdisese.html>)

En cuanto a las **manifestaciones hematológicas** la presencia de púrpura trombocitopénica que a veces es una manifestación inicial y anticuerpos antifosfolípidos son de mayor relevancia. Lo más común son la leucopenia y la anemia normocítica crónica; con prueba de Coombs positiva para la detección de anticuerpos positivos fijados a la superficie de los glóbulos rojos y presencia de adenopatía en un 50% de los pacientes (Antolin, et al., 1991; Keeling, et al., 1993).

Además podemos encontrar otro tipo de manifestaciones como la conjuntivitis, epiescleritis, la oclusión de la arteria central de la retina, la asociación con el síndrome de Sjögren y en muchos casos hay amenorrea. El parto normal sin complicaciones es lo habitual en las pacientes lúpicas bien controladas pero LES puede exacerbarse antes del parto y con mayor frecuencia en el posparto. Los abortos suelen ser más frecuentes en mujeres con LES (Snaith, et al., 1996).

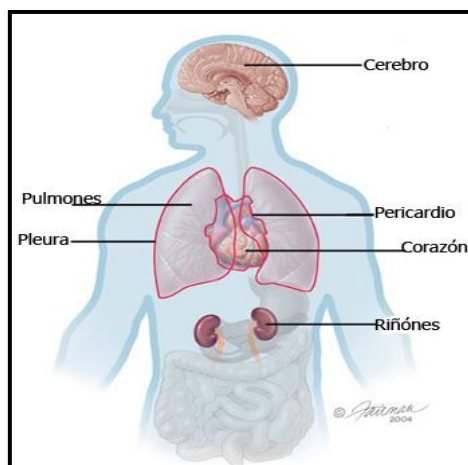


Figura 2. El lupus es una enfermedad que puede producir inflamación de diversos órganos, incluidos los riñones, el tejido que recubre el corazón y los pulmones (pleuritis y pericarditis) y el cerebro, así como articulaciones y la piel. (Taumau, 2004)

1.3.6 LABORATORIO

En pacientes con LES la anemia normocítica normocrómica por trastornos en la eritropoyesis es muy frecuente. La leucopenia leve a moderada de menos de $4,000/\text{mm}^3$ se presenta en la quinta parte de los casos, así como linfopenia. La velocidad de sedimentación globular (VSG) está invariablemente aumentada. La proteína C reactiva (PCR) rara vez es positiva (excepto cuando se añaden serositis o procesos infecciosos). En un 25% de los casos se encuentra la prueba de VDRL (diagnostico serológico para sífilis) falso positivo. El complemento sérico disminuye durante la etapa activa de LES.

Los anticuerpos antinucleares están presentes en casi todos los pacientes y el patrón más común es el homogéneo (Hochberg, 1997). Los anticuerpos anti-DNA se consideran característicos de LES. Existe una producción excesiva de autoanticuerpos debido a la falla en la tolerancia inmunológica que parece constituir el elemento central de la alteración en el LES y es el mecanismo del daño tisular (Tan, et al., 1982).

1.3.7 TRATAMIENTO

Lo primero es informar al paciente que el concepto de LES se ha modificado favorablemente en el curso de los dos últimos decenios y que se dispone ahora de mayores recursos para su tratamiento, en donde el pronóstico también es mucho más favorable (Wallace, 2010).

Es importante orientar al paciente sobre los factores desencadenantes como la exposición prolongada al sol, situaciones de fatiga o estrés, procesos infecciosos, embarazo y postparto, así como el efecto potencial de algunos medicamentos capaces de inducir la formación de anticuerpos antinucleares.

En general se recomienda reposo adecuado, dieta baja en grasas de origen animal y protección contra el sol. Siempre tener presente el potencial de infecciones oportunistas. Las medidas anticonceptivas deben considerarse con precaución por los inconvenientes con los estrógenos y progestágenos orales y los dispositivos intrauterinos (Wallace, 2010).

En el tratamiento sintomático para pacientes con LES se recomienda la ingesta de AINEs (antiinflamatorios no esteroideos) útiles para controlar los síntomas musculoesqueléticos. Cuando hay alteraciones dermatológicas y de fotosensibilidad, se aconsejan las cloroquinas sin olvidar la poco frecuente pero posible afección retiniana relacionada tanto con la dosis como con el tiempo de administración de estos medicamentos. La mayoría de los pacientes responden a los corticoesteroides a dosis variables dependiendo de los órganos comprometidos y la gravedad del caso (Yildirim-Toruner y Diamond, 2011).

Los corticoesteroides deben administrarse durante la etapa activa del LES y reducir la dosis gradualmente según la respuesta clínica y las cifras de complemento (Barber, 2011). El medicamento más empleado es la prednisona. Se ha propuesto el empleo de pulsos o mega dosis de metilprednisolona parenteral cuando no hay una respuesta satisfactoria a la vía oral y a otras medidas; en ocasiones se añaden pulsos de inmunodepresores como la ciclofosfamida.

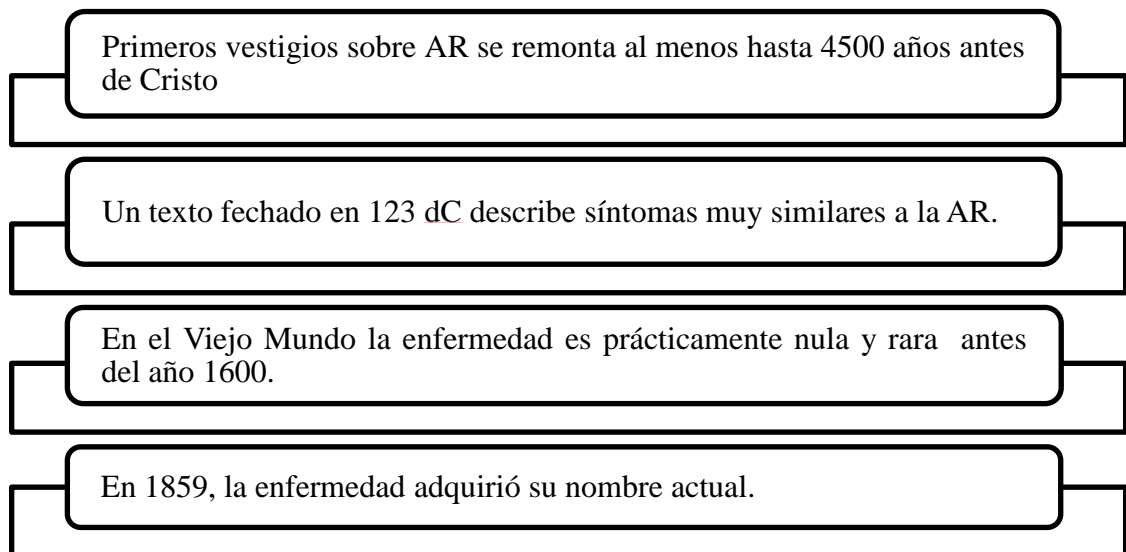
Lo mismo es pertinente con otras drogas citotóxicas como los análogos de las purinas (azatioprina) y del ácido fólico (metotrexate) e inmunodepresores de linfocitos T como es la ciclosporina A. Otras medidas a mencionar son la plasmaféresis y la radiación total con resultados no concluyentes. La esplenectomía se practica eventualmente en casos de púrpura trombocitopénica y anemia hemolítica cuando no hay respuesta a corticoesteroides y/o inmunodepresores (Yildirim-Toruner y Diamond, 2011).

1.4 ARTRITIS REUMATOIDE

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica que implica la inflamación de las articulaciones y tejidos circundantes. También puede afectar otros órganos (Oda, et al., 2012).

Caracterizada por una actividad exagerada de ciertas células del sistema inmune, como los linfocitos y macrófagos, los cuales producen anticuerpos y citocinas, que promueven y mantienen la inflamación, produciendo engrosamiento de la membrana sinovial (Peakman, 2011).

1.4.1 HISTORIA



Cuadro 2. Artritis reumatoide a través de la historia (M.J.J.E.)

1.4.2 EPIDEMIOLOGIA

En la población en general la prevalencia de la artritis reumatoide es de un 1% aproximadamente, y varía sustancialmente según el criterio de diagnóstico utilizado. La incidencia es de aproximadamente 3 casos nuevos cada año por cada 10 mil habitantes. La distribución de la enfermedad es mundial, no obstante hay zonas con mayor prevalencia, como los nativos americanos y zonas con menor gravedad, como el África subsahariana y la población africana del Caribe (Pfleger y Simmons, 2006).

Existe también una establecida variación entre géneros: varón/mujer en razón de 1:3 aproximadamente, probablemente por la influencia de los estrógenos, la variación disminuye con la edad (Speroff, et al., 1999; Felson y Nevitt, 1998). En las mujeres, la enfermedad suele iniciarse entre los 30 y los 50 años, mientras que en los hombres unos años más tarde y la prevalencia aumenta con la edad para ambos sexos mostrándose una progresión temporal, datos recientes abogan por una disminución progresiva de la incidencia (Pfleger, 2006).

1.4.3 ETIOLOGIA

La causa de la AR sigue siendo desconocida, pero existen datos que indican que la enfermedad podría ser desencadenada por una infección en individuos genéticamente predispuestos (Scott, et al., 2010). Existen factores genéticos y ambientales que pueden tener relación con AR.

Dentro de los **factores genéticos** se encuentran pruebas de asociación de AR con alelos específicos del HLA-DR4 (70% frente al 30% del grupo control) y HLA-DR1. Estudios epidemiológicos muestran una concordancia bastante baja de AR en los gemelos homocigotos (12-15%), en cualquier caso es más alta que en heterocigotos (3-5%).

Esto implica que los factores genéticos juegan un papel importante. Asimismo, la probabilidad de aumentar el riesgo de padecer la enfermedad en familiares de primer grado de pacientes con AR es de 1.5% (Neer, 1974)

Los **factores ambientales** que se toman en consideración son el género femenino dado que los estrógenos intervienen en la patogenia, inhibiendo a los linfocitos T inhibidores y estimulando a los linfocitos T colaboradores o facilitadores; el tabaquismo y diversas infecciones bacterianas y virales pueden influir en el padecimiento de AR (Majithia, 2007).

1.4.4 LABORATORIO

Una de las pruebas de laboratorio solicitadas con mayor frecuencia en la evaluación de pacientes con dolores articulares o en sospecha de enfermedad reumática es el factor reumatoide, en pacientes con artritis reumatoide la prueba es positiva en el 75 a 90% de los casos (Symmons, 2003). Otras pruebas son la velocidad de sedimentación globular (VSG) y la proteína C reactiva las cuales no son específicas, debido a que se pueden observar valores altos en algunas enfermedades o patologías que cursan con inflamación o infección.

1.4.5 TRATAMIENTO

El tratamiento para pacientes con AR consiste en la administración de leflunomida 20mg/día durante 3 meses, en caso de intolerancia o efectos adversos a esta dosis estándar se puede disminuir a 10 mg/diarios (Van Jaarsveld, et al., 2000).

El metotrexato en dosis 7,5 mg semanales durante el primer mes, si al mes persiste artritis en cualquier localización se aumentará la dosis a 15 mg semanales y la sulfasalazina 2 g diarios durante 3 meses son parte del tratamiento para AR (Mottenen, et al., 2002).

1.5 GENÉTICA DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Dentro de los factores genéticos estudiados para las enfermedades autoinmunes, los más importantes se encuentran en los genes del Complejo principal de Histocompatibilidad (CMH), que codifican para la traducción del antígeno leucocitario humano (HLA) (Lie y Thorsby, 2005). Sin embargo hay genes no HLA, que también están involucrados en la génesis de estas enfermedades (Michou, et al., 2007).

En los últimos cinco años se han encontrado cientos de variantes genéticas que predisponen a diversas enfermedades autoinmunes (Cho y Gregersen, 2011), varias de estas enfermedades comparten ciertas variantes genéticas (Cotsapas, et al., 2011).

Algunos genes que están involucrados en enfermedades autoinmunes son: *HLA-DRB1*, *PNT22*, *CTLA4*, *IRF5*, *STAT4*, *P2XR* (Harley, et al., 2008; Graham, et al., 2008; Kochi, et al., 2010).

1.6 GEN *P2X7*

El gen *P2X7* pertenece a la familia de genes *P2XR*, conformada por siete miembros (*P2X1-7*). Este gen ha sido encontrado en mamíferos y en ovíparos, pero no en invertebrados.

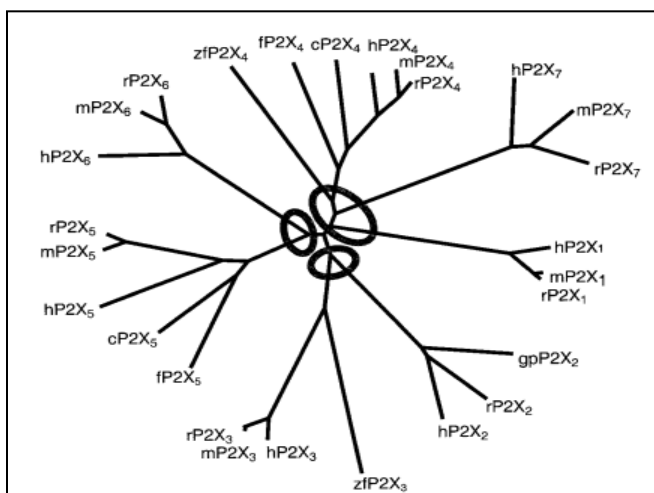


Figura 3. El dendrograma muestra la relación de 29 subtipos del gen *P2X*. La familia de genes *P2X7* en *Homo sapiens* (h), *Rattus norvegicus* (m), *Mus musculus* (m), *Cavia porcellus* (gp), *Gallus gallus* (c), *Danio rerio* (zf), *Rana catesbeianaz* (bf), *Xenopus laevis* (x), *Rubripes Takifugu* (f). Las elipses indican una aparente relación entre subfamilias (North, 2002)

El gen *P2X7* tiene un tamaño de 53 kb con 13 exones y se localiza en la región cromosómica 12q24.31 (Niño-Moreno, et al., 2007). Codifica para un polipéptido de 595 aminoácidos de largo denominado “Receptor P2X7” se expresa en la membrana celular y se activa principalmente por adenosin -5'-trifosfato (ATP) (Adinolfi, et al., 2005). Otros tipos de células donde se expresa este receptor son neuronas, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, linfocitos y células endoteliales (Coutinho-Silva, et al., 2009).

1.6.1 Receptor P2X7

El receptor P2X7 (Figura 4) pertenece a la familia de receptores P2X (P2XR) ATP-dependientes permeables y no selectivos a iones como: Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Su capacidad de actuar directamente sobre los conductos para la entrada de Ca^{2+} o indirectamente como activadores de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se basa en sus múltiples respuestas en los tejidos. Los canales son complejos oligoméricos compuestos por subunidades de la proteína codificada por siete genes diferentes *P2XR* (*P2X1-P2X7* nombrados así por el orden de clonación) expresados en los genomas de los mamíferos y otros vertebrados.

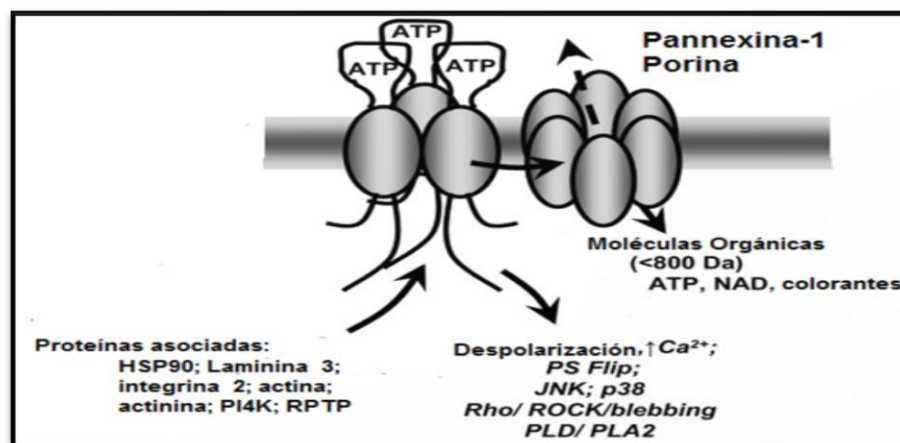


Figura 4. Esquema del Receptor P2X7 y proteínas asociadas (Gu-Ben, et al., 2009)

Los genes humanos *P2X7* y *P2X4* están situados muy cerca uno del otro en el cromosoma 12, posición 12q24.31 y están separados por menos de 24 kilobases (Gu-Ben, et al., 2009).

Los siete tipos de receptores comparten una estructura similar que comprende dos segmentos transmembranales con proteínas de 472 aminoácidos (Freist, et al., 1998), un bucle extracelular que contiene 10 cisteínas distribuidas homogéneamente, residuos conservados de lisina y de glicina además de tres sitios de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr), y sus amino y carboxilo-terminal se localizan del lado intracelular (Surprenant, et al., 1996; Buell, et al., 1998), seguidas por un tramo largo de aminoácidos Phe 188 - Val 321 que forma seis hojas antiparalelas tipo β (Dubyak, 2007).

Los extremos amino y carboxilo-terminal de *P2X7* (AA 352 y 595) son de mayor tamaño comparados con los demás miembros de la familia *P2X*. Estos extremos son cruciales para la formación del canal (poro) en *P2X7*, la transducción y la señalización. Varios estudios sugieren que *P2X7* puede funcionar como un sistema de señalización complejo al interactuar con diversas proteínas intracelulares a través de su C-terminal (Gu-Ben, et al., 2009).

Se han encontrado similitudes entre la región de hojas β y el dominio del catalizado de clase II de la sintetasa aminocil-tRNA sintetisas. Estas hojas β son parecidas a residuos que comprenden el sitio de unión a ATP, desde la sustitución de 2 aminoácidos comprendidos en la región Lys193 y Lys311 (Gu-Ben, et al., 2009; Dubyak, 2007).

1.6.2 Agonistas del receptor P2X7

Se ha encontrado moléculas que funcionan como agonistas para el receptor P2X7 como el 2, 3 - (benzoil-4-benzoil)-ATP (BzATP) que estimula al receptor P2X7 de manera más potente que el ATP y se evidencia a través de la reducción de la concentración de calcio y magnesio, pero BzATP no es un agonista selectivo para P2X7, debido a que estimula otros receptores P2X. Otras moléculas como el ADP (adenosin difosfato) y AMP (adenosin monofosfato) son agonistas muy débiles del receptor P2X7 (Donnelly-Roberts y Jarvis, 2007).

Sin embargo, después de una breve exposición al ATP, la eficacia de ADP y AMP aumenta, esto ha hecho suponer que una breve estimulación inicial con ATP provoca un cambio más duradero en el receptor, que altera su capacidad selectiva para discriminar entre ATP, ADP y AMP (North, 2002).

La Figura 5 muestra la estructura molecular de los agonistas para el receptor P2X7.

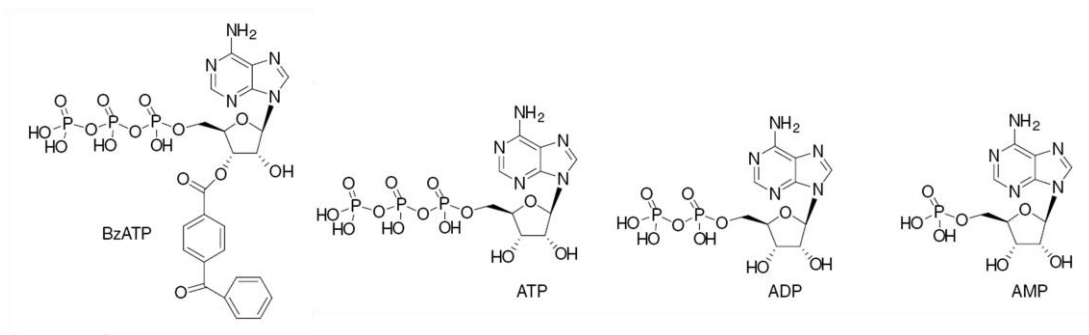


Figura 5. Estructura molecular de agonistas del Receptor P2X7 (Donnelly-Roberts y Jarvis, 2007).

1.6.3 Antagonistas de receptor P2X7

Existen cinco tipos de antagonistas para este receptor (Figura 6), en el primer grupo se encuentran los iones como el calcio, magnesio, zinc y cobre que inhiben la corriente generada por el ATP, en un proceso independiente del voltaje. El segundo tipo son los receptores similares a P2X7 como la surimina, PPADS y el inhibidor más potente es el azul brillante G, que es capaz de inhibir al receptor en concentraciones nano-molares (Gunosewoyo, et al., 2009).

El tercer grupo involucra dos grandes cationes orgánicos: calmidazolium y KN-62, el calmidazolium bloquea también otros canales iónicos incluyendo los canales dependientes de nucleótidos cíclicos. Calmidazolium tiene un núcleo imidazólico cargado, rodeado por cuatro restos de clorobencenos. KN-62 es una piperazina que se utiliza como un inhibidor de la proteinquinasa tipo II calcio/calmodulina-dependiente.

La cuarta clase de antagonistas P2X7 es el 17- β -estradiol, se ha reportado que bloquea corrientes provocadas por BzATP (Gunosewoyo, et al., 2009). El último, antagonista es un anticuerpo monoclonal específico para el receptor P2X7 (Buell, et al., 1998; Chessell, et al., 1999).

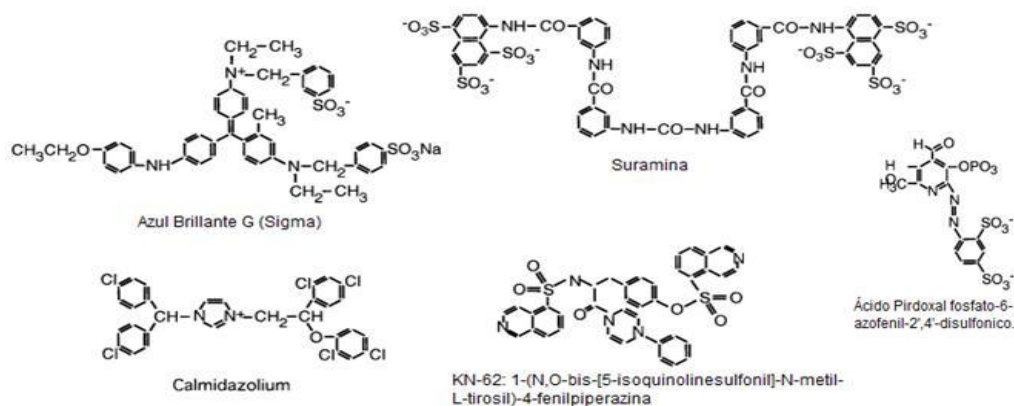


Figura 6. Estructura molecular de antagonistas del Receptor P2X7 (Gunosewoyo, et al., 2009)

1.6.4 Permeabilidad de la membrana plasmática a través del receptor P2X7.

La permeabilidad de este receptor ha sido estudiada mediante el uso de colorantes como el bromuro de etidio, debido a sus propiedades fluorescentes además, que se intercala en los ácidos nucleicos dando así una medida directa de su entrada a las células (Erb, et al., 2006).

P2X7 es un receptor ionotrópico del canal de cationes, que bajo la acción de dosis bajas de ATP abre el canal catiónico de manera reversible permitiendo influjo de Na^+ , Ca^{2+} y eflujo de K^+ , provocando inducción en la apoptosis y liberación de interleucina madura (IL)-1 β (Yoshioka y Nakata, 2004).

La activación de P2X7 inicia una serie de eventos que incluyen la activación de panexina-1, la activación de la cascada de caspasas, el ensamble del inflamasoma generando la liberación de IL-1 β hacia el espacio extracelular provocando inflamación (Figura 7) (Faustin, et al., 2007).

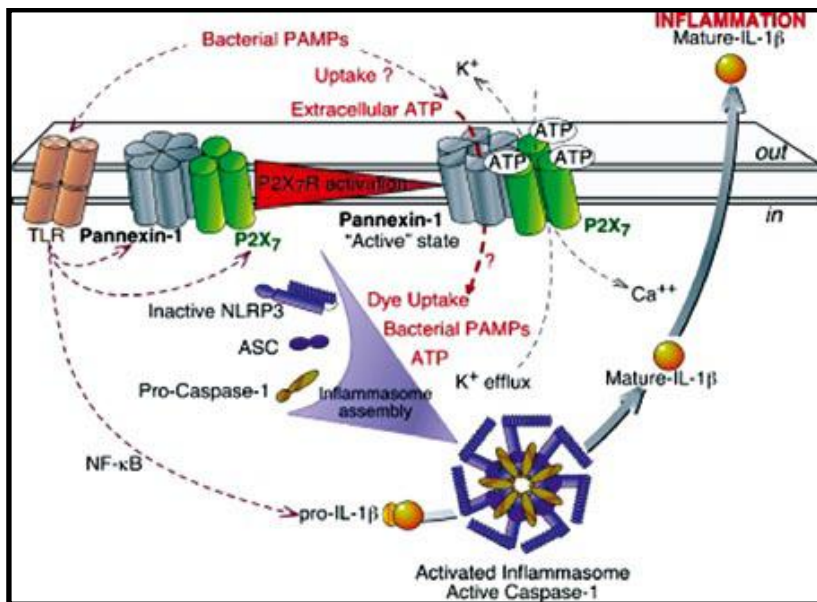


Figura 7. Esquema de la función del Receptor P2X (Vasileiou, et al., 2010)

La estimulación sostenida con mayores dosis de ATP o la estimulación repetida con pulsos secuenciales de ATP, induce la formación de un poro permeable a grandes moléculas de peso molecular (100-457 Da), como N-metil-D-glutamato (NMDG) (Dinarello, 2005); que genera en linfocitos B y T un poro con un tamaño molecular de poco más de 300 Da.

En la Figura 8 se observa la apertura de los canales iónicos a través del receptor P2X7 dependiente de ATP, (A) muestra la apertura del canal permeable a moléculas pequeñas como cationes Na^+ , K^+ , Ca^{2+} por inducción de bajas concentraciones de ATP; (B) indica la apertura del canal a moléculas de mayor tamaño debido a la estimulación de altas concentraciones de ATP.

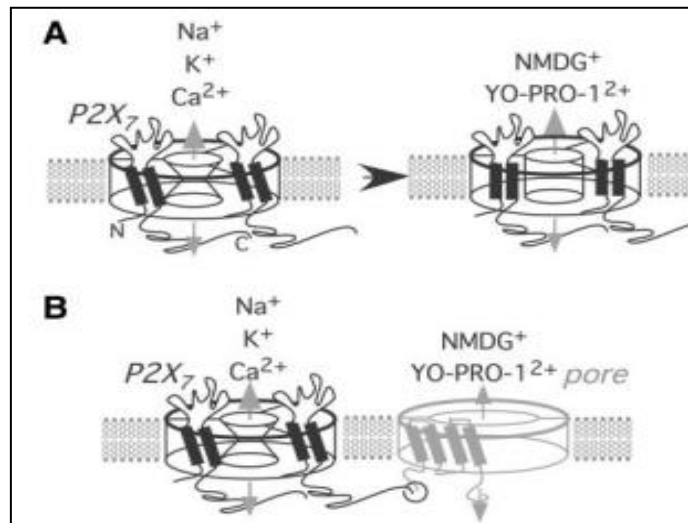


Figura 8. Apertura de canales iónicos a través del Receptor P2X7 dependiente de ATP (North, 2002)

1.6.5 Muerte celular y receptor P2X7

La estimulación de P2X7 puede conducir a la apoptosis o necrosis de macrófagos infectados y células epiteliales (Figura 9), que se produce a través de la activación de fosfolipasa D (PLD) que da lugar a la fusión de lisosomas y vacuolas infectadas, la acidificación de las vacuolas, así como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

La inhibición de la señalización P2X7 parece ser crítico para la propagación de algunas infecciones, ya que la muerte celular mediada por P2X7 tiene un mayor impacto en el desarrollo de patógenos intracelulares, que la muerte de la célula huésped inducida a través de otros receptores de superficie como TLR1, TLR2 (Qu, et al., 2007).

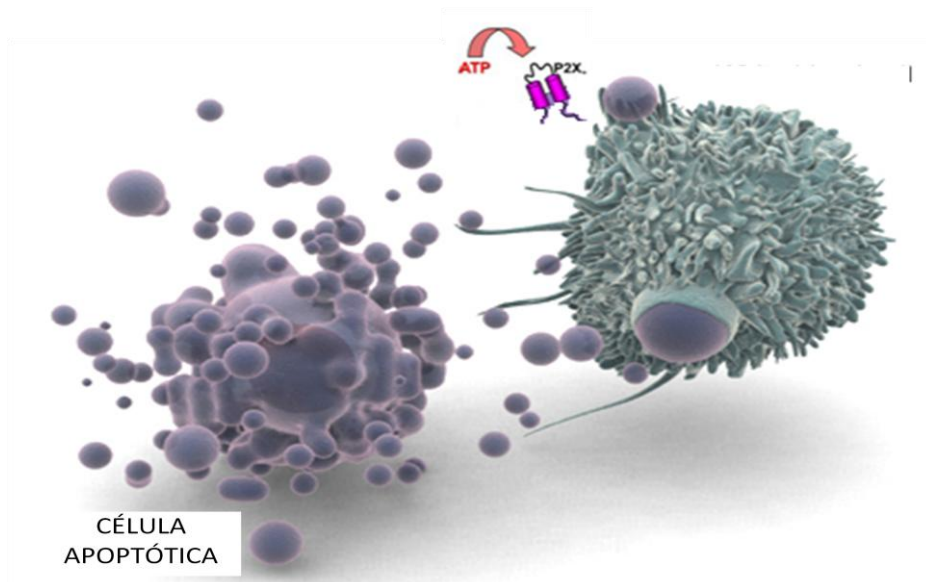


Figura 9. Muerte de un linfocito por el receptor P2x7

(Adaptada de U.S. National Library of Medicine)

1.6.6 Regulación de la membrana plasmática por el receptor P2X7: composición y el tráfico

La regulación del receptor P2X7 en el paso de fosfatidilserina (PS) desde el medio extracelular al espacio intracelular y su distribución en la membrana plasmática (MP) es una señal bien caracterizada que facilita:

1.- La apoptosis de células senescentes o cuerpos apoptóticos por fagocitos especializados o no especializados.

2.- La activación de las plaquetas mediada por la respuesta hemostática. La parte exterior de la bicapa de la membrana plasmática de eucariotas contiene predominantemente esfingomielina y fosfatidilcolina, mientras que la parte interior se encuentra enriquecida con aminofosfolípidos, como la fosfatidiletanolamina. La distribución de fosfolípidos en la parte exterior e interior de la MP está estrechamente regulada por mecanismos enzimáticos especializados que incluyen "Flippases", "floppases", y "scramblases" (North, 2002).

1.6.7 POLIMORFISMOS

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) son variaciones de una secuencia de ADN que ocurren cuando un solo nucleótido en la secuencia es diferente de la normal en más del 1% de la población.

Cuando los SNP's ocurren dentro de un gen, crean diferentes variantes, o alelos del gen. El gen *P2X7* es altamente polimórfico y se han relacionado 32 variantes dependiendo el aminoácido alterado (Benjamin, 1994).

En general la presencia de polimorfismos se relaciona con la pérdida de la función del receptor, dentro de los polimorfismos más comunes del gen *P2X7* se encuentra el **polimorfismo A1513C**.

De los polimorfismos del gen *P2X7*, el A1513C cambia ácido glutámico por alanina en el residuo 496 (Glu496 a Ala) en una zona conservada del carboxilo terminal del receptor, tiene una frecuencia alélica de 0.14-0.18 en condiciones normales en las poblaciones caucásicas. Esta región está implicada en las interacciones proteína-proteína, que incluyen sitios de unión a lipopolisacáridos bacterianos, así como la unión a α -actina. Este polimorfismo es de origen natural y la pérdida de la función del receptor causa la incapacidad para desencadenar la formación de poros e inducción de la apoptosis (Starczynski, et al., 2003).

Diferentes estudios han demostrado que la homocigosis para el alelo C (C / C) lleva a la pérdida casi completa de la función *P2X7* y alrededor del 50% de reducción en los individuos heterocigotos. En esta pérdida de función es probable que se bloquee la unión de ATP al dominio extracelular del receptor. Por otro lado debido a que la apoptosis mediante el receptor *P2X7* se altera en presencia del alelo C (alelo menor) su expresión podría dar lugar a la acumulación de células neoplásicas (Wiley, et al., 2002).

El polimorfismo A1513C en cuanto a procesos infecciosos, se lo ha relacionado con la liberación reducida de IL1- β e IL18 en monocitos humanos (Sluyter, 2004). La IL1- β se encuentra en cantidades elevadas en pacientes con AR (Sluyter, 2004; Oda, et al., 2012). Además la presencia de este polimorfismo se ha asociado a una alteración de la respuesta inmune como la muerte de micobacterias por macrófagos humanos y a la patogénesis de leucemia linfocítica crónica y tuberculosis (Saunders, et al., 2003; Houlston, et al., 2003).

JUSTIFICACION

El lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide son enfermedades autoinmunes que involucran una inflamación crónica por la presencia de múltiples autoanticuerpos dirigidos contra los componentes del núcleo celular, citoplasma y superficie celular. Existe una activación de los linfocitos T y una síntesis anormal de citocinas.

Tanto LES como AR se consideran enfermedades poligénicas en las cuales los genes que están involucrados no se han caracterizado completamente pero existen varios loci para la susceptibilidad de LES en humanos y algunos de estos se han identificado en la región 12q24, región en donde se localiza el gen que codifica para el receptor P2X7. El receptor P2X7 participa en la liberación de IL1 β misma que se encuentra en cantidades elevadas en pacientes con AR.

El gen *P2X7* es un gen que participa en una variedad de trastornos infecciosos e inflamatorios debido que se expresa principalmente en células derivadas de médula ósea (monocitos, macrófagos y linfocitos), en donde se conoce que participa en diversas funciones como proliferación celular, fusión de macrófagos, activación y maduración de células T, muerte bacteriana intracelular en macrófagos, inducción de apoptosis, liberación de IL1- β , entre otras.

La estimulación de P2X7 puede conducir a la apoptosis o necrosis de las células, por tal motivo los polimorfismos del gen *P2X7* podrían tener un papel importante en la respuesta inmunológica y la susceptibilidad a la patogénesis de las enfermedades autoinmunes como LES y AR.

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la relación entre el polimorfismo A1513C del gen *P2X7* con la patogénesis de 2 enfermedades autoinmunes inflamatorias.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Conocer las frecuencias alélicas y genotípicas del gen *P2X7* en una población mexicana con enfermedades autoinmunes inflamatorias (lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide) y un grupo control sano.
- Relacionar las frecuencias genéticas de lupus eritematoso sistémico y de artritis reumatoide con sus parámetros clínicos y bioquímicos.
- Conocer la asociación del polimorfismo A1513C del gen *P2X7* con la susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes inflamatorias (lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide).
- Relacionar estadísticamente las frecuencias genéticas con otras poblaciones previamente reportadas a nivel mundial.

HIPOTESIS

Una alta frecuencia del alelo menor (alelo mutado) del gen *P2X7*, se asociará con las enfermedades autoinmunes inflamatorias y por lo tanto se podrá evidenciar un aumento en la susceptibilidad de las mismas.

METODOLOGÍA

5.1 MÉTODOS

5.1.1 TIPO DE INVESTIGACION

Estudio transversal de casos y controles

5.1.2 POBLACION Y MUESTRA

Pacientes del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” de la ciudad de México: 80 pacientes con Lupus eritematoso sistémico, 80 pacientes con Artritis reumatoide y 114 pacientes control.

5.1.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

De inclusión:

- Pacientes diagnosticados con LES y AR de acuerdo a los criterios del Colegio Americano de Reumatología (American College of Rheumatology ACR)
- Pacientes que acepten participar en el estudio y que firmen una carta de consentimiento informado. (Ver anexo 1).

De exclusión

- Pacientes en desacuerdo con el estudio y /o que no firmen la carta de consentimiento.

5.1.4 VARIABLES

En la Tabla 1, se muestran todas las variables, así como, la definición, medición, indicador y escala de acuerdo a la enfermedad: lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide.

Tabla 1. Definición y operacionalización de variables (M.J.J.E.)

VARIABLES	ENFERMEDAD	DEFINICION	MEDICION	INDICADOR	ESCALA
GENERO	LES/AR	El del nombre que puede ser acompañado por atributos femeninos y que no es común ni epiceno. Lo mismo para atributos masculinos	Masculino	Porcentaje de varones	Cualitativo
			Femenino	Porcentaje de mujeres	
EDAD	LES/AR	Tiempo que una persona ha vivido desde que nació	Años	Promedio de años	Cuantitativo
TIEMPO DE EVOLUCIÓN	LES/AR	Tiempo desde que inició la enfermedad	Años	Promedio de años	Cuantitativo
TABAQUISMO	LES/AR	Hábito de fumar	Si/No	Porcentaje de personas que fuman	Cualitativo
ALCOHOLISMO	LES/AR	Hábito de ingesta de alcohol	Si/No	Porcentaje de personas que consumen alcohol	Cualitativo
LEUCOCITOS	LES/AR	Células sanguíneas que son los efectores celulares de la respuesta inmune	(4000-10000/ μ l)	Promedio de leucocitos	Cuantitativo
PLAQUETAS	LES/AR	Fragmentos citoplasmáticos pequeños que están involucrados en la hemostasia para la formación de coágulos	(150000-450000/ μ l)	Promedio de plaquetas	Cuantitativo

VARIABLES	ENFERMEDAD	DEFINICION	MEDICION	INDICADOR	ESCALA
LINFOCITOS	LES/AR	Tipo de leucocito de menor tamaño, con jerarquía inmunológica principalmente en la inmunidad específica o adquirida	(1500-4000/ μ l)	Promedio de linfocitos	Cuantitativo
FACTOR REUMATOIDE	LES/AR	Mide la presencia de IgM específica contra las inmunoglobulinas IgG anormales producidas por los linfocitos de la membrana sinovial	Positivo/Negativo	Porcentaje de pacientes con factor reumatoide positivo	Cualitativo
PRESION ARTERIAL	AR	Presión que ejerce la sangre circulante sobre las paredes de los vasos	Normal 120/80	Promedio de la presión arterial	Cuantitativo
C3	LES	Complemento que tiene un papel importante en la inflamación	(70-162mg/dl)	Promedio de C3	Cuantitativo
C4	LES	Complemento que tiene un papel importante en la inflamación	(10-32mg/dl)	Promedio de C4	Cuantitativo
CH50	LES	Complemento hemolítico al 50%, indica la actividad del sistema del complemento al 50%	(80-320UH)	Promedio de CH50	Cuantitativo
VSG	LES	Mide la velocidad con la que sedimentan los eritrocitos en un período determinado tiempo	Hasta 12mm/h	Promedio de VSG	Cuantitativo
PCR	LES	Proteína plasmática que aumenta sus niveles en respuesta a la inflamación	(0.06-10.9mg/L)	Promedio de PCR	Cuantitativo

VARIABLES	ENFERMEDAD	DEFINICION	MEDICION	INDICADOR	ESCALA
CICLOFOSFAMIDA	LES	Medicamento que se utiliza en el tratamiento de linfomas, algunas leucemias y lupus eritematoso sistémico	Si/No	Porcentaje de personas que recibieron ciclofosfamida	Cualitativo
ANTICARDIOLIPINA	LES	Anticuerpos anticardiolipina, están dirigidos contra la cardiolipina y se encuentra en diversas enfermedades con sífilis, síndrome antifosfolípido o LES son anticuerpos antimitocondriales	Si/No	Porcentaje de personas con anticardiolipina	Cualitativo
FATIGA	LES	Sensación abrumadora de cansancio y disminución del trabajo mental y físico	Si/No	Porcentaje de personas que refieren fatiga	Cualitativo
ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD	LES	Enfermedad con signos y síntomas que indican actividad como caída de cabello, fatiga, rash, etc.	Si/No	Porcentaje de pacientes con enfermedad activa	Cualitativo
ANTICUERPOS ANTINUCLEARES	LES	ANA: anticuerpos que tiene como blanco el contenido del núcleo celular	Positivo/ Negativo	Porcentaje de pacientes con ANA positivo	Cualitativo
ANTI SM	LES	Anti Smith, determina si existen anticuerpos contra una proteína ribonucleica	Si/No	Porcentaje de pacientes con especificidad para anti Sm	Cualitativo
ANTI DNA	LES	Determina si existen anticuerpos contra el ácido desoxirribonucleico DNA	Si/No	Porcentaje de pacientes con especificidad para anti DNA	Cualitativo

VARIABLES	ENFERMEDAD	DEFINICION	MEDICION	INDICADOR	ESCALA
ANTI RNP	LES	Determina anticuerpos contra ribonucleoproteínas	Si/No	Porcentaje de pacientes con especificidad para anti RNP	Cualitativo
ANTI RO/SSA	LES	Anticuerpos contra ribonucleoproteínas Ro	Si/No	Porcentaje de pacientes con especificidad para anti Ro	Cualitativo
ANTI LA/SSB	LES	Anticuerpos contra ribonucleoproteínas Ro	Si/No	Porcentaje de pacientes con especificidad para anti La	Cualitativo
RASH MALAR	LES	Signo médico que consiste en enrojecimiento facial conocido como alas de mariposa	Si/No	Porcentaje de pacientes que refieren rash malar	Cualitativo
ARTRITIS	LES	Inflamación o desgaste de las articulaciones	Si/No	Porcentaje de pacientes que refieren artritis	Cualitativo
ARTRALGIAS	LES	Dolor de las articulaciones	Si/No	Porcentaje de pacientes que refieren artralgiás	Cualitativo

5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

5.2.1 DIAGNOSTICO DE LUPUS Y ARTRITIS

El diagnóstico de LES y AR, fue realizado por 2 médicos pertenecientes a la consulta de reumatología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” de la ciudad de México.

Para el diagnóstico de LES se tomó en consideración los siguientes criterios:

- Síntomas que cuenta el paciente.
- Exploración física.
- Análisis de sangre y orina, en sangre la disminución del número de leucocitos, linfocitos, hematíes y plaquetas y en orina la presencia de proteinuria.
- Detección de anticuerpos antinucleares (ANA) y anticuerpos anti DNA positivos.

En el diagnóstico de AR fueron considerados los siguientes puntos:

- Rigidez matutina articular y peri-articular, mayor de 1 hora de duración.
- Artritis de 3 o más áreas articulares afectadas simultáneamente.
- Artritis de al menos 1 área incluyendo la muñeca y articulaciones de la mano. Artritis simétrica afectando la misma área articular.
- Nódulos reumatoides.
- Factor Reumatoide positivo en sangre.
- Cambios radiográficos típicos de la artritis reumatoide en manos y muñecas: estos cambios fueron erosiones y descalcificación ósea.

Todos los pacientes fueron diagnosticados y que estuvieron de acuerdo con participar en este estudio firmaron una carta de consentimiento firmando para ser incluidos en la investigación.

5.2.2 EXTRACCION DE DNA

La extracción de DNA se realizó por la técnica de expulsión salina (Miller, et al., 1988) como se muestra en el anexo 2.

5.2.3 ESTUDIOS MOLECULARES

A. POLIMORFISMO A1513C

Este polimorfismo se determinó mediante una PCR en tiempo real en un equipo **CFX96 Real-time System BIORAD** (Figura 10); siguiendo los parámetros mostrados en la Figura 11.

- Alelo1 (FAM) = Alelo C: GCTGTGCTGCCGAAAAAGCCGGGG
- Alelo2 (VIC) = Alelo A: CCTGAGAGCCACAGGTGCCTGGAGG



Figura 10. Equipo CFX 96 Real-time System BIORAD

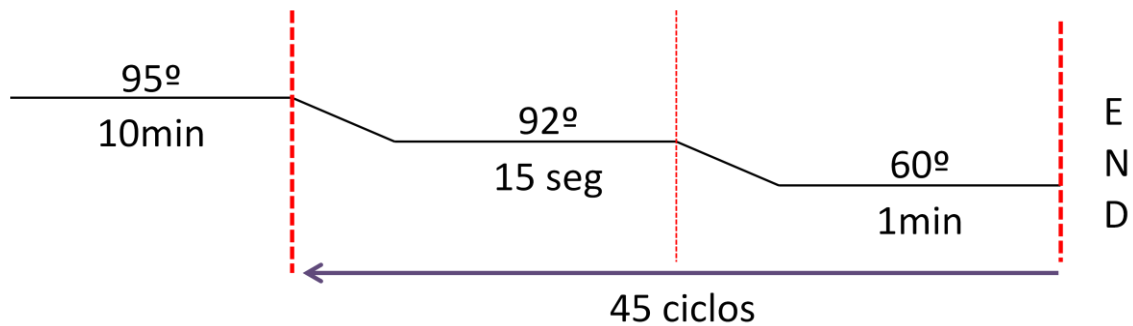


Figura 11. Parámetros de la PCR en Tiempo Real

5.2.4 ANALISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias tanto alélicas como genotípicas del polimorfismo A1315C del gen *P2X7* se obtuvieron por conteo directo.

Los datos se expresan como la media desviación estándar (SD). Las frecuencias se expresan como porcentajes. La asociación entre las variables continuas se llevó a cabo por correlación de Pearson.

La fuerza de las asociaciones se calculó como riesgo relativo por el método de Woolf, razón de momios (OR), para lo cual se realizó una tabla de contingencia de 2 X 2, también se realizó la prueba de chi cuadrado (χ^2) para determinar la significancia estadística de las asociaciones. Un valor de p menor de 0.05 fue considerado significativo. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico SPSS v.17 (SPSS Inc. Chicago, IL)

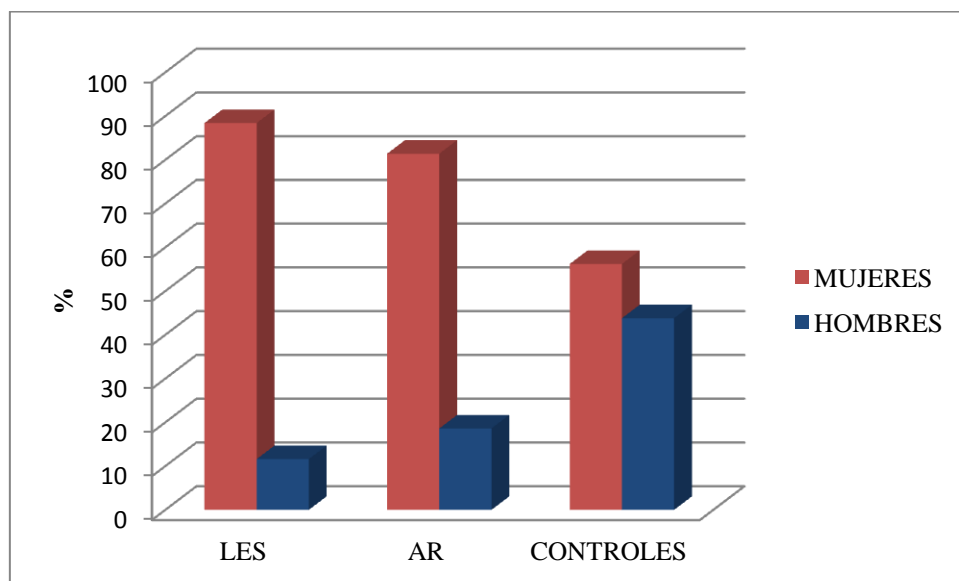
RESULTADOS

De un total de 274 pacientes que cumplían los requisitos de inclusión, únicamente se analizaron 251 pacientes, esto se debió a que 23 pacientes no estuvieron de acuerdo en participar en el protocolo. Se estudiaron 69 pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico, 70 pacientes con Artritis reumatoide y 112 pacientes controles.

El equilibrio de Hardy–Weinberg mostró los siguientes resultados para el grupo de pacientes con LES el valor de $\chi^2=1.05$, $p=0.30$, mientras que para el grupo de AR fue $\chi^2=0.08$, $p=0.76$, y para los controles fue $\chi^2=1.44$, $p=0.23$, lo que significa que la población de estudio es heterogénea y cumple el equilibrio de H-W.

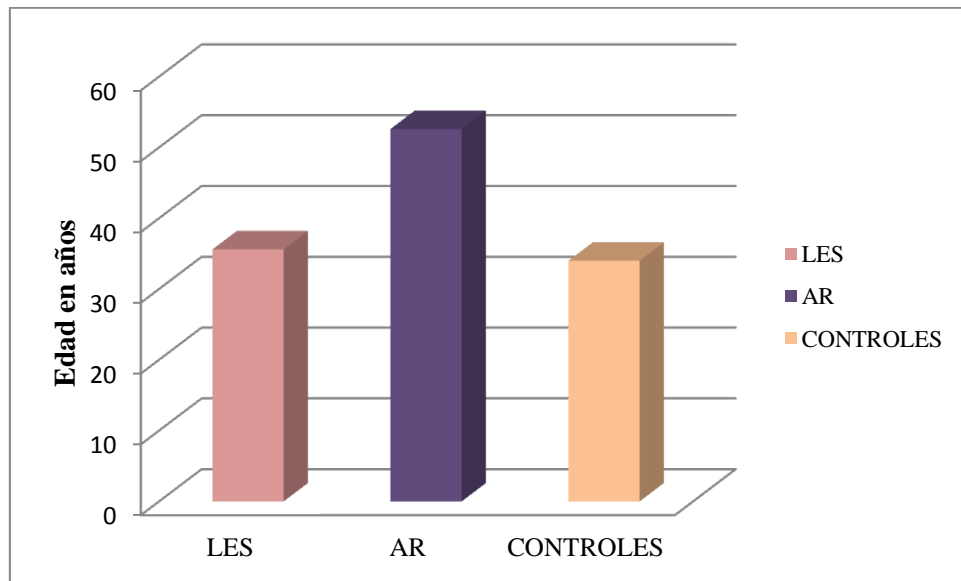
Para las dos enfermedades en estudio, se realizó el análisis de las características clínicas y bioquímicas, posteriormente se realizó la genotipificación de cada paciente para conocer las frecuencias alélicas y genotípicas, finalizando con la distribución de las características clínicas por genotipo.

La Gráfica 1 indica la distribución de los 3 grupos de estudio por género: para LES, las mujeres representaron el 88.4% y los hombres el 11.6%, para AR el 81.4% fueron mujeres y el 18.6% fueron hombres; mientras que para el grupo control el 56.2% fueron mujeres y los hombres representaron el 43.8%.



Gráfica 1. Distribución de los grupos (LES, AR y Controles) por género

La Grafica 2 muestra la edad promedio para los 3 grupos de este estudio, para los pacientes con LES la edad promedio fue de 35.6 ± 14.7 años, para los pacientes con AR la edad promedio fue de 52.6 ± 17.5 años y para el grupo control la edad promedio fue de $34 \pm 10,1$ años.



Gráfica 2. Edad promedio de los grupos en estudio

ANALISIS PARA LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

La Tabla 2 muestra las principales características clínicas de los pacientes con LES, donde se observa que el valor de la media de los linfocitos es de 1253.6 ± 567.3 que se encuentra por debajo del valor de referencia que va desde 1500 a 4000 linfocitos/ μl .

Se pudo evidenciar un incremento en la velocidad de sedimentación globular (VSG) con un valor de 24.8 ± 12.28 excediendo al valor de referencia (hasta 12mm/h). Las demás características clínicas se encuentran dentro de los valores de referencia.

Tabla 2. Características clínicas de LES expresadas como valores de media±DS y en porcentaje (%)

CARACTERISTICAS CLINICAS DE LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO		RESULTADOS	VALOR DE REFERENCIA
EDAD (años)		35.6 ± 14.7	
GENERO	FEMENINO %	88.4	Cualitativo
	MASCULINO %	11.6	Cualitativo
TIEMPO DE EVOLUCION (años)		6.26 ± 4.2	
LEUCOCITOS / μ l		5734.7 ± 2288.6	4000 – 10000
PLAQUETAS/ μ l		210144 ± 85178.5	150000 – 450000
LINFOCITOS/ μ l		1253.6 ± 567.3	1500 – 4000
C3 (mg/dl)		81.4 ± 23.8	70 – 162
C4 (mg/dl)		13.3 ± 7.2	10 – 32
CH50 (UH)		128.2 ± 99.1	80 – 320
VSG (mm/h)		24.8 ± 12.28	Hasta 12
PCR (mg/L)		9.8 ± 22.08	0.06 – 10.9
TABAQUISMO %		13	Cualitativo
ALCOHOLISMO %		5.8	Cualitativo
CICLOFOSFAMIDA %		15.9	Cualitativo
ANTICARDIOLIPINA %		26.1	Cualitativo
FATIGA %		5.8	Cualitativo
ACTIVIDAD DE ENFERMEDAD %		8.7	Cualitativo
ANTICUERPOS ANTINUCLEARES %		66.7	Cualitativo
ANTI SM %		15.9	Cualitativo
ANTI DNA %		39.1	Cualitativo
ANTI RNP %		20.3	Cualitativo
ANTI RO/SSA %		11.6	Cualitativo
ANTI LA/SSB %		2.9	Cualitativo

FACTOR REUMATOIDE %	8.7	Cualitativo
RASH MALAR %	23.2	Cualitativo
ARTRITIS %	10.1	Cualitativo
ARTRALGIAS %	24.6	Cualitativo

En todos los casos se obtuvo el DNA y se realizó la amplificación de DNA mediante la técnica de PCR en Tiempo Real. (Figura 12). Por discriminación alélica se determinó el genotipo de cada paciente (Figura 13) para el polimorfismo A1513C.

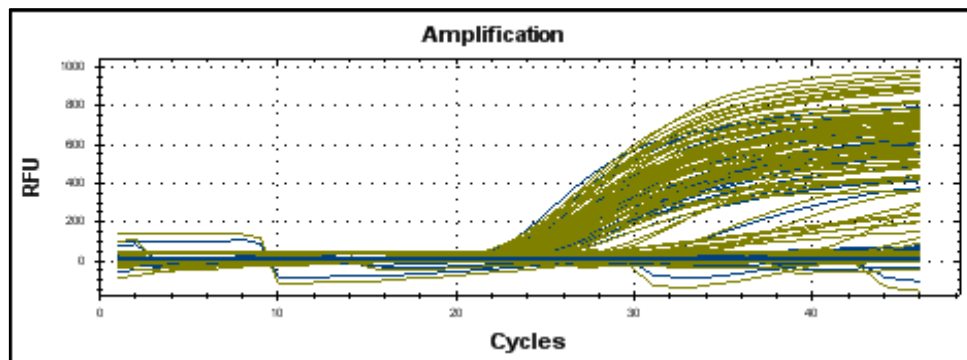


Figura 12. Amplificación de DNA por PCR en Tiempo Real

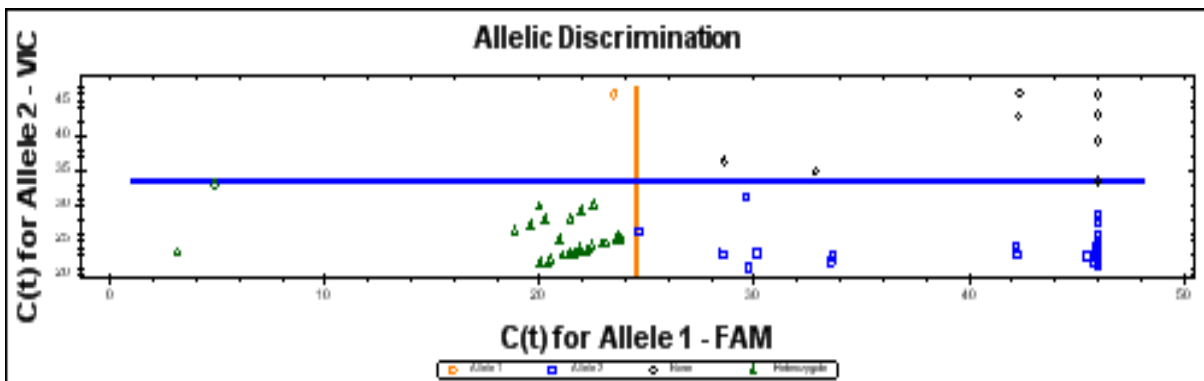
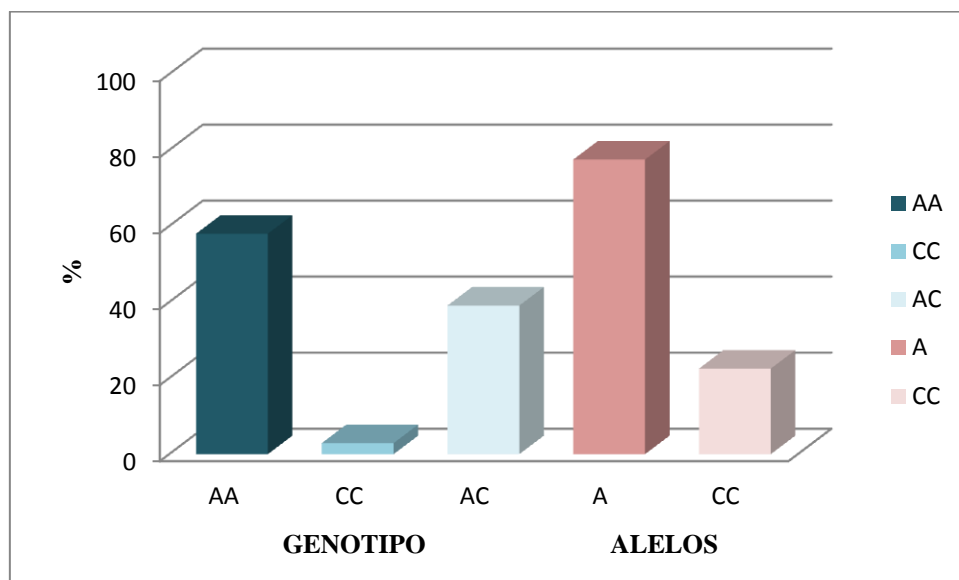


Figura 13. Discriminación alélica para el polimorfismo A1513C

En los pacientes con LES, la frecuencia observada fue: genotipo AA de 58.0%, para el genotipo CC de 2.9% y para el genotipo AC de 39.1%. La frecuencia alélica para el alelo A es de 77.5% y para el alelo C es de 22.5%. (Grafica 3).



Gráfica 3. Frecuencias genotípicas y alélicas para Lupus Eritematoso Sistémico

La tabla 3 muestra las características clínicas de LES de acuerdo al genotipo, en donde se encontró niveles bajos de linfocitos ($1222.5 \pm 550.7 / \mu\text{l}$) en homocigotos AA, en homocigotos CC de $1300 \pm 848.5 / \mu\text{l}$ y en heterocigotos AC de $1296.3 \pm 596.5 / \mu\text{l}$; además de un valor bajo para C4 para los homocigotos CC de 8.85 ± 6.6 y para CH50 10 ± 0.0 un valor por debajo de lo normal; en cuanto la velocidad de sedimentación globular (VSG) los valores se encuentran elevados en los 3 genotipos para el genotipo AA de 25 ± 11 , para el genotipo AC de 24 ± 14.26 y para CC de 32 ± 11.3 , mientras que el valor de PCR también se encuentra elevado para el genotipo AC (11 ± 32.06) y el genotipo CC (13.9 ± 14.23). El resto de parámetros clínicos se encuentran dentro del valor de referencia para los tres genotipos.

Existe una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los pacientes de LES con los genotipos AC vs AA en cuanto al género, VSG, alcoholismo, fatiga, anti-Sm, anti-Ro/SSA y el factor reumatoide. Entre los genotipos AC vs CC hay diferencia significativa en el tiempo de evolución, tabaquismo, fatiga y anticuerpos antinucleares. Comparando al genotipo AA con el genotipo CC existe una significancia en tabaquismo, alcoholismo, anticardiolipina, fatiga, anticuerpos antinucleares, anti-Sm y anti-Ro/SSA.

Tabla 3. Características clínicas de LES por genotipo

CARACTERISTICAS CLINICAS DE LES POR GENOTIPO		AA	AC	CC
EDAD		37.25 ± 15.24	33.78 ± 14.13	29.0 ± 16.9
GENERO	FEMENINO %	60.65 ♦	36.06	3.27
	MASCULINO %	37.5	62.5	
TIEMPO DE EVOLUCION		7.03 ± 4.63 ∇	5.41 ± 3.6	2.50 ± 0.70
LEUCOCITOS / μ l		5447.5 ± 2051.6	6218.5 ± 2638.7	4950 ± 353.6
PLAQUETAS/ μ l		203950 ±	219370 ±	209500 ±
LINFOCITOS/ μ l		1222.5 ± 550.7	1296.3 ± 596.5	1300 ± 848.5
C3 (mg/dl)		79.9 ± 21.3	83.3 ± 27.6	81 ± 22.6
C4 (mg/dl)		13.4 ± 6.7	13.6 ± 8	8.85 ± 6.6
CH50 (UH)		121.5 ± 96.1	160 ± 104.74	10 ± 0.0
VSG (mm/h)		25 ± 11 ♦	24 ± 14.26	32 ± 11.3
PCR (mg/L)		8 ± 12.06	11 ± 32.06	13.9 ± 14.23
TABAQUISMO %		66.6 ∇, ♣	33.3	
ALCOHOLISMO %		50 ♦, ♣	50	
CICLOFOSFAMIDA %		54.5	45.5	
ANTICARDIOLIPINA %		44.44 ♣	44.44	11.11
FATIGA %		25 ♦, ∇, ♣	50**	25
ACTIVIDAD DE		66.66 ∇	16.6	16.6
ANTICUERPOS		52.17 ∇, ♣	43.47	4.34
ANTI SM %		18.18 ♦, ♣	72.7	9.09
ANTI DNA %		44.44	51.85	3.7
ANTI RNP %		42.85	50	7.14
ANTI RO/SSA %		12.5 ♦, ♣	75	12.5
ANTI LA/SSB %		50	50	

FACTOR	83.3♦	16.7	
RASH MALAR %	50	37.5	12.5
ARTRITIS %	57.14	28.57	14.28
ARTRALGIAS %	58.82	35.29	5.88

♦ $p \leq 0.05$ AC vs AA; ∇ $p \leq 0.05$ AC vs CC; ♣ $p \leq 0.05$ AA vs CC

Se realizaron comparaciones mediante el análisis de ANOVA Post-hoc entre grupos utilizando la prueba de Tamhane divididas por genotipo para los pacientes con LES en donde hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) ente el genotipo AC vs CC en el tiempo de evolución, tabaquismo, ciclofosfamida, anticardiolipina, anticuerpos antinucleares, factor reumatoide y rash malar (Ver Tabla 4).

Tabla 4. Comparaciones Post-hoc entre grupos por la prueba Tamhane divididos por genotipo para LES

LES	AC vs CC			AA vs CC		
	Diferencia de medias	Error	p	Diferencia de medias	Error	P
TIEMPO DE EVOLUCIÓN	2.907*	0.856	0.031	-4.525*	0.887	0.002
TABAQUISMO	0.519*	0.172	0.017	0.950*	0.160	0.000
CICLOFOSFAMIDA				-0.300*	0.114	0.037
ANTICARDIOLIPINA	1.000*	0.151	0.000	1.325*	0.126	0.000
AC. ANTINUCLEARES	0.519*	0.172	0.017	0.750*	0.151	0.000
FACTOR REUMATOIDE				-0.275*	0.107	0.043
RASH MALAR	0.926*	0.118	0.000	1.125*	0.114	0.000

* La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05

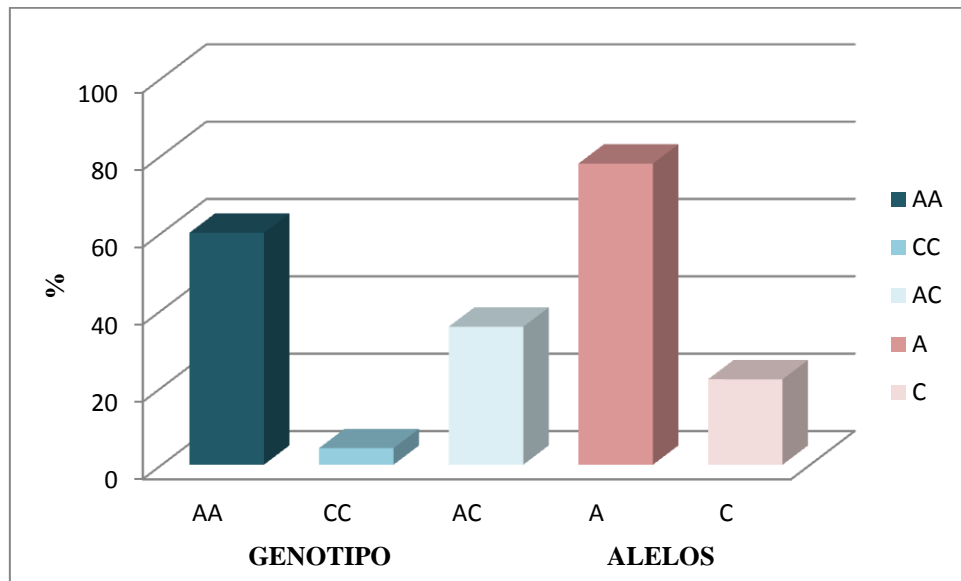
ANALISIS PARA ARTRITIS REUMATOIDE

Para los pacientes con AR, la Tabla 5 resume las características clínicas en donde se pudo evidenciar un valor bajo de linfocitos de $1395.7 \pm 617.2/\mu\text{l}$ que se encuentra por debajo del valor de referencia. Las demás características clínicas se mantienen dentro de los valores de referencia.

Tabla 5. Características clínicas de AR expresadas en valores de media \pm DS y en porcentaje %

CARACTERISTICAS CLINICAS DE ARTRITIS REUMATOIDE		RESULTADO	VALOR DE REFERENCIA
EDAD		52.6 ± 17.5	
GENERO	FEMENINO %	81.4	Cualitativo
	MASCULINO %	18.6	Cualitativo
TIEMPO DE EVOLUCION (años)		7.7 ± 5.5	
LEUCOCITOS $/\mu\text{l}$		5745.2 ± 2528.7	4000 – 10000
PLAQUETAS $/\mu\text{l}$		224175.7 ± 99369.4	150000 – 450000
LINFOCITOS $/\mu\text{l}$		1395.7 ± 617.2	1500 – 4000
TABAQUISMO %		17.1	Cualitativo
ALCOHOLISMO %		4.3	Cualitativo
P. SISTOLICA (mmHg)		115.4 ± 23.8	120
P. DIASTOLICA (mmHg)		73.1 ± 15.3	80
FACTOR REUMATOIDE %		62.85	Cualitativo

En pacientes con Artritis Reumatoide se encontró una frecuencia para el genotipo AA de 60%, para el genotipo CC de 4.3% y para el genotipo AC de 35.7%. Lo que significa que la frecuencia para el alelo A es de 77.9% y para el alelo C es de 22.1% (Grafica 4).



Gráfica 4. Frecuencias genotípicas y alélicas para Artritis Reumatoide

La Tabla 6, muestra las características clínicas de los pacientes con AR distribuidas por su genotipo, en donde se hizo evidente el valor de linfocitos bajo para los tres genotipos, para AA fue de 1359.5 ± 604.8 , para AC fue de 1456 ± 654.52 y para CC fue de 1400 ± 655.74 .

Entre los pacientes de AR con los genotipos AC vs AA existe una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en género y alcoholismo.

Comparando a los genotipos Ac vs CC hay significancia en género, tiempo de evolución, tabaquismo y alcoholismo. Entre los genotipos AA vs CC se evidenció una diferencia significativa en tabaquismo y alcoholismo.

Tabla 6. Características clínicas de AR por genotipo

CARACTERISTICAS CLINICAS DE ARTRITIS REUMATOIDE POR GENOTIPO				
		AA	AC	CC
EDAD		49.6±17.9	56.6±16.22	62±17.32
GENERO	FEMENINO %	63.15♦,∇	31.57	5.26
	MASCULINO	46.15	53.84	
TIEMPO DE EVOLUCION (años)		7.29±5.99∇	8.24±5.10	10±0.0
LEUCOCITOS /μl		5242.14±2396.3	6492±2611.02	6566±3360.5
PLAQUETAS /μl		227740.4±98324.4	214448±102904.	255333.3±111791.
LINFOCITOS /μl		1359.5±604.8	1456±654.52	1400±655.74
TABAQUISMO %		58.33∇,♣	41.66	
ALCOHOLISMO %		100♦,∇,♣		
P. SISTOLICA (mmHg)		113.76±28.6	117.5±14.4	122.67±14.18
P. DIASTOLICA (mmHg)		71.3±18.5	76±8.66	73.33±5.77
FACTOR REUMATOIDE %		61.36	34.09	4.54

♦ p≤0.05 AC vs AA; ∇ p≤0.05 AC vs CC; ♣ p≤0.05 AA vs CC

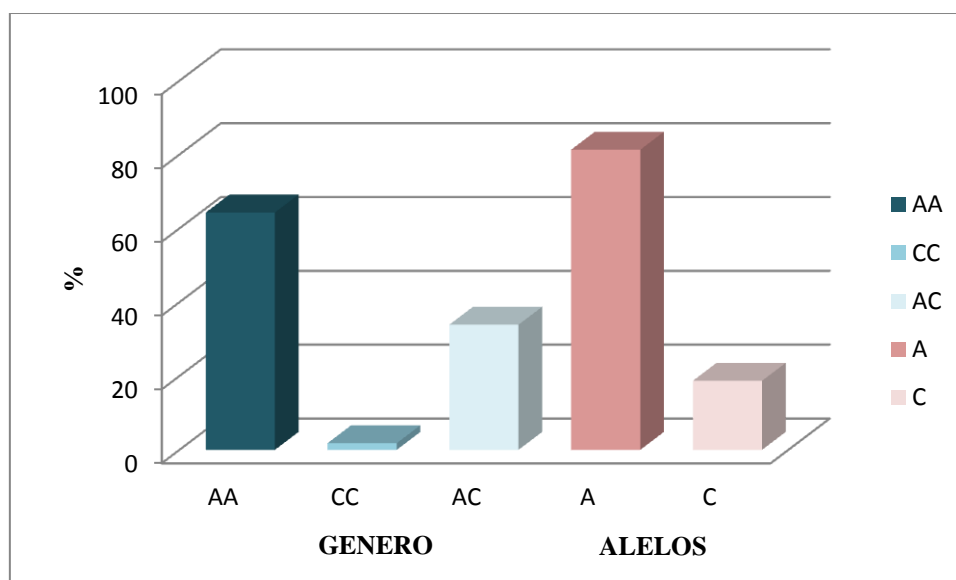
Para los pacientes con AR se realizó comparaciones por el método de ANOVA Post-hoc entre grupos utilizando la prueba de Tamhane divididas por genotipo donde se encontró diferencias significativas (p≤0.05) entre el genotipo AC vs CC género, tabaquismo y alcoholismo; mientras que entre el genotipo AA vs CC hubo diferencia significativa en género, tiempo de evolución, tabaquismo y alcoholismo como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Comparaciones Post-hoc entre grupos utilizando la prueba Tamhane divididos por genotipo para pacientes con AR

AR	AC vs CC			AA vs CC		
	Diferencia de medias	Error	p	Diferencia de medias	Error	P
GENERO	0.280*	0.092	0.016	0.143*	0.055	0.037
TIEMPO DE EVOLUCIÓN				-2.714*	0.925	0.016
TABAQUISMO	-0.880*	0.218	0.001	1.095*	0.148	0.000
ALCOHOLISMO	-1.240*	0.273	0.000	1.286*	0.171	0.000

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Para los pacientes control la frecuencia para el genotipo AA fue de 64.3%, para el genotipo CC de 1.8% y para el genotipo AC de 33.9%. Como consecuencia obtuvimos una frecuencia para el alelo A de 81,25% y para el alelo C de 18,75%. (Grafica 5)



Gráfica 5. Frecuencias genotípicas y alélicas para Controles

Al realizar el análisis de las frecuencias tanto alélicas como genotípicas en los 3 grupos de estudio para el polimorfismo A1513C se encontró una alta frecuencia del genotipo AA así como del alelo A en los 3 grupos.

La Tabla 8 muestra las frecuencias genotípicas de los tres grupos de estudio para el polimorfismo A1513C, mientras que en la Tabla 9, se observan las frecuencias alélicas.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas del polimorfismo A1513C

GENOTIPOS	LES (n)	FRECUENCIAS %	AR (n)	FRECUENCIAS %	CONTROLES (n)	FRECUENCIAS %
AA	40	58	42	60	72	64.3
CC	2	2.9	3	4.3	2	1.8
AC	27	39.1	25	35.7	38	33.9
TOTAL	69		70		112	

Tabla 9. Frecuencias alélicas del polimorfismo A1513C

ALELOS	LES (n)	FRECUENCIAS %	AR (n)	FRECUENCIAS %	CONTROLES (n)	FRECUENCIAS %
AA	107	77.5	109	77.8	182	81.3
CC	31	22.5	31	22.2	42	18.7

El análisis entre las frecuencias genotípicas y alélica de los pacientes con lupus eritematoso sistémico y de los pacientes con artritis reumatoide, en relación con el grupo control, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa. (Tabla 10.)

Tabla 10. Comparación de frecuencias entre pacientes control con LES y AR

	LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO						ARTRITIS REUMATOIDE					
	CASOS (n)	%	CONTROLES (n)	%	p	OR	CASOS (n)	%	CONTROLES (n)	%	p	OR
AA	40	58	72	64.3	0.39	0.76	42	60	72	64.3	0.56	0.83
CC	2	2.9	2	1.8	0.62	1.64	3	4.3	2	1.8	0.31	2.46
AC	27	39.1	38	33.9	0.47	1.25	25	35.7	38	33.9	0.80	1.08
TOTAL	69		112				70		112			
A	107	77.5	182	81.3	0.39	0.79	109	77.8	182	81.3	0.43	0.81
C	31	22.5	42	18.7	0.39	1.25	31	22.2	42	18.7	0.43	1.23
TOTAL	138		224				140		224			

p= casos vs controles; OR= odds ratio

Con el objetivo de conocer la carga genética de nuestra población con respecto a otras poblaciones previamente reportadas se realizó un análisis comparando las frecuencias tanto genotípicas como alélicas de controles.

El análisis mostró que las frecuencias tanto alélicas como genotípicas del gen A1513C de nuestra población control en estudio fue muy similar a una población Mexicana previamente reportada (Niño-Moreno et al, 2007), así como para una población de origen Asiático (Fernando et al, 2007). Sin embargo, se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) para el genotipo AA ($p < 0,04$) y para el genotipo AC ($p < 0,03$) de nuestra población control vs la población de origen Ruso-Caucásico (Mokrousov et al, 2008). Ver Tabla 11.

Tabla 11. Comparación de las frecuencias de datos de este estudio con frecuencias de otros estudios previamente reportados

GENOTIPOS	NUESTRO ESTUDIO		MEXICANA			ASIATICA			RUSA-CAUCASICA		
	n	%	n	%	p	n	%	p	n	%	P
AA	72	64.3	70	63.64	0.91	105	62.87	0.81	96	76.19	0.04
CC	2	1.8	2	1.81	0.98	7	4.2	0.26	3	2.38	0.74
AC	38	33.9	38	34.55	0.92	55	32.93	0.86	27	21.43	0.03
TOTAL	112		110			167			126		
ALELOS											
A	182	81.3	178	80.9	0.92	265	79.34	0.57	219	86.9	0.09
C	42	18.7	42	19.1	0.92	69	20.66	0.57	33	13.1	0.09
TOTAL	224		220			334			252		

DISCUSION

La autoinmunidad es la pérdida de la tolerancia inmunológica a los propios constituyentes, es decir, la tolerancia inmunológica se define como una falta de respuesta controlada. Las enfermedades de tipo inmunitario son causadas cuando el sistema inmune actúa contra las células del propio organismo (autoinmunidad). En este caso, el sistema inmunitario se convierte en el agresor y reacciona contra las células del cuerpo en vez de protegerlas. Las causas son aún desconocidas, pero se relaciona con el reconocimiento proteico entre las superficies de las membranas celulares del sistema inmunitario y las que forman el organismo.

Dentro de las diversas enfermedades de tipo autoinmune encontramos al Lupus Eritematoso Sistémico (LES), el cual es un padecimiento autoinmune crónico con un componente inflamatorio importante, que cursa con periodos de remisiones y exacerbaciones, que causa daño tisular mediado por mecanismos inmunológicos en diferentes órganos, aparatos y sistemas, sin embargo, su etiología no es del todo comprendida hasta el momento.

Se identifica por sus manifestaciones clínicas y diversos auto-anticuerpos circulantes. En particular los auto-anticuerpos dirigidos contra los componentes del núcleo desempeñan un papel diagnóstico y patogénico fundamental (Peakman, 2011).

Por otro lado, la artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica que lleva a la inflamación de las articulaciones y tejidos circundantes. También puede afectar otros órganos. Caracterizada por una actividad exagerada de ciertas células del sistema inmune, como los linfocitos y macrófagos, los cuales producen anticuerpos y citocinas, que promueven y mantienen la inflamación, produciendo engrosamiento de la membrana sinovial (Peakman, 2011).

El receptor P2X7 abre canales dependientes de ATP, potenciando la respuesta inmune innata, activando la apoptosis, y la cascada de caspasas. La activación de P2X7 en las plaquetas tiene un efecto citolítico para las células y los derivados de nucleótidos de adenina conducen a la formación de poros (900Da), y desencadena diversos eventos de señalización.

El receptor P2X7 es sensible a mensajeros sinergistas con lipopolisacáridos (LPS) dando lugar a la producción de mediadores proinflamatorios en monocitos y macrófagos, que incluyen el factor de necrosis tumoral (TNF- α), IL-1, IL-18, y óxido nítrico (Starczynski, et al., 2003).

Los receptores P2X7 están regulados en los macrófagos en respuesta a estímulos inflamatorios (el interferón [IFN- γ], factor de necrosis tumoral y lipopolisacáridos), debido a la estimulación con ATP, se forman grandes poros en la membrana no selectivos que son permeables a moléculas de 0,9 kDa, lo que da como resultado la muerte de los macrófagos por una combinación de apoptosis y lisis osmótica (apolisis). En esta pérdida de función es probable que se bloquee la unión de ATP al dominio extracelular del receptor.

Aunque LES y AR son considerados como enfermedades poligénicas, los genes que están involucrados no han sido completamente caracterizados. Existen varios loci para la susceptibilidad a LES que han sido identificados en humanos y algunos genes candidatos muy asociados se han localizado en la región 12q24. En este contexto, es interesante que el gen que codifica para el receptor pro-inflamatorio P2X7 se localice dentro del locus LES-B4 (SLE-B4) en la posición 12q24.

En este trabajo, se estudió el polimorfismo A1513C de este receptor P2X7 en 2 enfermedades de tipo autoinmune (LES y AR) con el propósito de conocer una posible relación con la susceptibilidad a estas enfermedades.

Estudios en otras poblaciones como la peruana (Taype, 2010) han demostrado que la homocigosis para el alelo C (C/C) lleva a la casi completa pérdida de la función P2X7 y alrededor del 50% de reducción en los individuos heterocigotos. Sin embargo, al realizar el análisis tanto de las frecuencias alélicas como genotípicas de nuestros grupos de estudio para ambas enfermedades con respecto al grupo control, no encontramos diferencias significativas en ninguna de ellas.

Se encontró una alta frecuencia del alelo C cerca del 22% en nuestros pacientes tanto de LES como de AR y un 18.7 % en nuestros controles, pero la frecuencia para homocigotos para este alelo fue baja 2% para nuestros controles y nuestros pacientes con LES mientras que para los pacientes con AR la homocigosis para CC fue de alrededor del 4%, no encontrándose ninguna asociación con la enfermedad.

Los linfocitos representan del 24 al 32% del total en la sangre periférica. Los linfocitos se encargan de la inmunidad específica mediante la producción de anticuerpos y la destrucción de células anormales, pero existen ciertos factores como la quimioterapia, infecciones y leucemias que disminuyen la cantidad de los linfocitos provocando un desbalance en la funcionalidad de los linfocitos⁴.

En este estudio para los pacientes con LES y AR la cuenta de linfocitos es baja en los tres genotipos, y esto puede deberse a que estos pacientes reciben inmunosupresores como parte del tratamiento de la enfermedad autoinmune por lo tanto se ve reflejado en la disminución de los linfocitos.

⁴ USPHS/IDSA Guidelines for the Prevention of opportunistic infections in persons infected with human immunodeficiency virus: a summar. MMWR.Vol.44.N| RR-8-2006.

La velocidad de sedimentación (VSG) es una prueba analítica análoga a los reactantes de fase aguda, es un marcador inespecífico y no se lo relaciona con ninguna enfermedad en particular, pero la elevación de la VSG implica procesos inflamatorios, infecciosos o neoplásicos. Los pacientes con LES presentaron altos valores de la VSG en los tres genotipos, esto puede deberse que los pacientes cursaban por algún proceso inflamatorio o infeccioso el momento de la toma de muestra.

La proteína C reactiva pertenece a los miembros de reactantes de fase aguda, que aumenta sus niveles en respuesta a procesos inflamatorios, este incremento se debe a la elevación de la concentración plasmática de IL-6 producida por macrófagos, células endoteliales y linfocitos T. En nuestro estudio fue evidente un alto valor de proteína C reactiva en pacientes con LES del genotipo homocigoto CC y en heterocigotos, debido al proceso inflamatorio propio de la enfermedad.

El papel fisiológico principal del complemento es aumentar la lisis de las bacterias mediadas por los neutrófilos y solubilizar y eliminar inmunocomplejos, por lo tanto un déficit del complemento como C4 generan el deterioro de la inmunidad específica y generan un aumento de las infecciones bacterianas y una tendencia mayor de padecer enfermedades con depósitos de inmunocomplejos provocando inflamación como en el lupus eritematoso sistémico, en nuestro estudio fue evidente un valor bajo de C4 en el genotipo CC, por lo que se puede inferir que los pacientes con genotipo CC tienen susceptibilidad a presentar lupus eritematoso sistémico por la deficiencia de C4.

La actividad hemolítica del complemento CH50 muestra la actividad general del sistema del complemento dando una medida global de la integridad de la vía clásica del complemento y del mecanismo de ataque a membranas.

De acuerdo a la literatura, los niveles bajos de CH50 indican activación del sistema de complemento o deficiencia congénita de alguno de los componentes del sistema, y esto lo podemos corroborar en nuestros pacientes con LES con genotipo CC que presentan un valor bajo de CH50, relacionándolo de esta manera con el déficit de C4.

Las demás características clínicas que se mantienen dentro de los valores de referencia podemos atribuir a que los pacientes se encontraban bajo tratamiento es por esto que los valores como C3, plaquetas, leucocitos, etc, se encuentran dentro de lo normal para los 2 grupos de estudio LES y AR.

Hemos encontrado mayor correlación de las características clínicas de los pacientes con LES en relación a los pacientes con AR, esto puede deberse a que las historias clínicas de los pacientes con LES se encontraba mucho más completa que la de los pacientes con AR.

Existen estudios donde indican el efecto del tabaco sobre la activación de las caspasas 1 incrementando de esta manera el proceso inflamatorio, en nuestro estudio existe una diferencia significativa en pacientes con LES y en pacientes con AR con el consumo de tabaco, por lo tanto el tabaquismo puede ser un factor predisponente para aumentar la susceptibilidad de presentar lupus eritematoso sistémico o artritis reumatoide, y sería mucho más evidente esta susceptibilidad si se presenta la existencia del alelo C (alelo menor).

La literatura reporta que estas enfermedades LES y AR tienen una mayor prevalencia en mujeres que en hombres, las frecuencias de nuestro estudio concuerdan con las estadísticas porque efectivamente existe una mayor prevalencia de pacientes femeninas que muestran estas enfermedades, esto puede deberse a factores hormonales que están predisponiendo a las mujeres a ser más susceptibles de padecer una de estas enfermedades autoinmunes en estudio.

Frecuencias muy similares a las de nuestro estudio han sido reportadas para poblaciones amerindias Perú (Taype, 2006), asiáticas (Fernando-Saunders, et al., 2007) y mexicanas (Niño-Moreno, et al., 2007), en donde se ha reportado una asociación con otras enfermedades como la tuberculosis.

Portales-Cervantes, et al., 2010, reportó un estudio similar en linfocitos de pacientes con LES y AR mostrando una asociación con el genotipo A1513C y una disminución en la expresión de P2X7, sin embargo esta asociación no la encontraron en los sujetos control, lo que puede mostrar que este fenómeno pueda deberse a la presencia de otros SNP's, los cuales pueden estar en asociación al desequilibrio con A1513C.

En base a lo anterior, es importante analizar otros polimorfismos como el -762 C/T, 946 G/A, y 1096 C/G, en los cuales se ha visto que afectan la función de este receptor (Sluyter, et al., 2004; Shemon, et al., 2005; Gu, et al., 2004).

En este trabajo no se encontró ninguna asociación o participación del polimorfismo del gen del receptor P2X7 en la patogenia de enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide, esto puede deberse a que nuestra población es bastante heterogénea.

Sin embargo los resultados de esta investigación coinciden con muchos estudios previos en cuanto a la frecuencia genotípica y alelica, probablemente es necesario que en un futuro se tengan que analizar otros polimorfismos que puedan estar involucrados en este tipo de enfermedades de tipo autoinmune.

CONCLUSIONES

- La frecuencia alelica del polimorfismo A1513C para LES es: A (77.5%) y para C (22.5%). La frecuencia genotípica es: AA (58%); CC (2.9%) y AC (39.1%).

Para AR la frecuencia alelica es: A (77.8%) y para C (22.2%). La frecuencia genotípica es: AA (60%); CC (4.3%) y AC (35.7%).

La frecuencia alélica de A para nuestro grupo control fue de 81.3% para el alelo C fue de 18.7%, la frecuencia genotípica para AA fue de 64.3%, para AC fue de 33.9% y para CC fue de 1.8%.

- El 13% de los pacientes con LES son fumadores, el 5.8% consume alcohol, el 26.1% tienen anticuerpos anticardiolipina positivo, el 23.2% presenta rash malar, el 66.7% tienen anticuerpos antinucleares positivos. En los pacientes con AR el 17.1% son fumadores, el 4.3% ingieren alcohol, y el 62.85% tienen factor reumatoide positivo.
- No hay diferencias significativas entre los 2 grupos de estudio (casos y controles), tanto en pacientes con lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide, por lo tanto podemos inferir que no existe una asociación entre el polimorfismo con estas enfermedades.
- El grupo control de este estudio al compararlo con el grupo control de una población rusa-caucásica previamente reportada se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) para el genotipo AA y para el genotipo AC.

REFERENCIAS

1. Adinolfi, E., Pizzirani, C., Idzko, M., Panther, E., Norgauer, J., DiVirgilio, F., Feraari, D., 2005. P2X7 receptor: Death or life? *Purinergic Signalling*. 1, 219-227.
2. Al, M., Ng, L., Tyrrel, P., 2009. Adopokines as novel biomarkers in pediatric systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. 48, 497-501.
3. Alonso-Perez, E., Suarez-Gestal, M., Calaza, M., Witte, T., Papasteriades, C., 2011. Association of Systemic Lupus Erythematosus Clinical Features with European Population Genetic Substructure. *PLoS.ONE* 6(12).
4. Antolin, J., Gómez, A., Acosta, M., Martín, J., Cárdenas, M., 1991. Manifestaciones hematológicas en 111 pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico. *An. Med. Interna*. 8, 170-173.
5. Barber, G.N., 2011. Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 10-20.
6. Benjamin, L., 1994. *Genes V*. International student edition. USA.
7. Buell, G., Chessell, I.P., Michel, A.D., Collo, G., Salazzo, M., Herren, S., 1998. Blockade of human P2X7 receptor function with a monoclonal antibody. *Blood*. 92, 3521-3528.
8. Buell, G.N., Talabot, F., Gos, A., Lorenz, J., Lai, E., Morris, M.A., Antonarakis, S.E., 1998. Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor. *Receptors Channels*. 5, 347-354.
9. Conti, G., Coppo, R., Amore, A., 2012. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). *G. Ital. Nefrol.* 584-90.
10. Cotsapas, C., Voight, B.F., Rossin, E., Lage, K., Neale, B.M., 2011. Pervasive sharing of genetic effects in autoimmune disease. *PLoS. Genet.* 7.
11. Coutinho-Silva, R., Corrêa, G., Sater, A., Ojeius, D.M., 2009. The P2x7 receptor and intracellular pathogens. *Purinergic Signalling*. 5, 197-204.
12. Chessell, I.P., Michel, A.D., Humphrey, P.P.A., 1999. Determinants of human P2X7 large pore formation. *Br. J. Pharmacol.* 126, 19.

13. Cho, J.H., Gregersen, P.K., 2011. Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *N. Engl. J. Med.* 365, 1612–1623.
14. Deng, Y., Tsao, B.P., 2010. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6, 683-692.
15. Dinarello, C.A., 2005. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med.* 201, 1355-1359.
16. Donnelly-Roberts, D.L., Jarvis, M.F., 2007. Discovery of P2X7 receptor selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *British Journal of Pharmacology.* 151, 571-579.
17. Dubyak, G.R., 2007. Go it alone no more P2X7 joins the society of heteromeric ATP-Gated receptor channels. *Molecular Pharmacology.* 72, 1402-1405.
18. Erb, L., Liao, Z., Seye, C.I., Weisman, G.A., 2006. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch.* 452, 552-562.
19. Faustin, B., Lartigue, L., Bruey, J.M., Luciano, F., Sergienko, E., Bailly-Maitre, B., 2007. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell.* 25, 713–724.
20. Felson, D.T., Nevitt, C.C., 1998. The effects of estrogen on osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 10(3), 269-272.
21. Fernando, S.L., Saunders, B.M., Sluyter, R., Skarratt, K.K., Goldberg, H., Marks, G.B., Wiley, J.S., Britton, W.J., 2007. A polymorphism in the P2X7 gen increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 175(4), 360-6.
22. Font, J., Espinosa, G., Cervera, R., 2003. Enfermedades sistémicas autoinmunes. *Jano.* 2003. 65(1491), 10-18.
23. Freist, W., Verhey, J.F., Stuhmer, W., Gauss, D.H., 1998. ATP binding site of P2X channel proteins: structural similarities with class II aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett.* 434, 61- 6514.
24. Graham, R.R., Cotsapas, C., Davies, L., Hackett, R., Lessard, C.J., Leon, J.M., Burt, N.P., Guiducci, C., Parkin, M., Gates, C., 2008. Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 40, 1059-1061.

25. Gu, B.J., Rathsam, C., Stokes, L., MvGeachle, A., Wiley J., 2009. Extracellular ATP dissociates nonmuscle myosin from P2X7 pore formation. *American Journal Phystology Cellular Phystology*. 297, 430-439.
26. Gu, B.J., Sluyter, R., Skarratt, K.K., Shemon, A.N., Dao-Ung, L.P., Fuller, S.J., 2004. An Arg-307 to Gln polymorphism within the ATP-binding site causes loss of function of the human P2X7 receptor. *J. Biol. Chem.* 23, 31287-95.
27. Gunosewoyo, H., Coster, M.J., Bennett, M.R., Kassiou, M., 2009. Purinergic P2X7 receptor antagonists: Chemistry and fundamentals of biological screening. *Bioorganic & Medical Chemistry*. 17, 4861-4865.
28. Harley, J.B., Alarcon-Riquelme, M.E., Criswell, L.A., Jacob, C.O., Kimberly, R.P., Moser, K.L., Tsao, B.P., Vyse, T.J., Langefeld, C.D., Nath, S.K., 2008. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX, KIAA1542 and other loci. *Nat. Genet.* 40, 204–210.
29. Hochberg, M.C., 1997. Updating the American College of Rheumatology revised criteria, for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 40 (9), 1725.
30. Houlston, R.S., Sellick, G., Yuille, M., Matutes, E., Catovsky, D., 2003. Causation of chronic lymphocytic leukemia-insights from familial disease. *Leuk. Res.* 27, 871-6.
31. Keeling, D., Isenber, D., 1993. Haematological manifestations of systemic lupus erythematosus. *Blood. Rev.* 7, 199-207.
32. Kochi, Y., Okada, Y., Suzuki, A., Ikari, K., Terao, C., Takahashi, A., Yamazaki, K., Hosono, N., Myouzen, K., Tsunoda, T., 2010. A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Nat. Genet.* 42, 515-519.
33. Lie, B.A., Thorsby, E., 2005. Several genes in the extended human MHC contribute to predisposition to autoimmune diseases. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 526-31.
34. Lind, R., Arslan, G., Eriksen, H.R., Kahrs, G., Haug, T.T., Florvaag, E., Berstad, A., 2005. Subjective health complaints and modern health worries in patients with subjective food hypersensitivity. *Dig. Dis.Sci.* 50, 1245-51.
35. Majithia, V., Geraci, S.A., 2007. Rheumatoid arthritis: diagnosis and management. *Am. J. Med.* 120 (11), 936–9.

36. Michou, L., Lasbleiz, S., Rat, A.C., Migliorini, P., Balsa, A., Westhovens, R., 2007. Linkage proof for PTPN22, a rheumatoid arthritis susceptibility gene and a human autoimmunity gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 1649-54.
37. Miller, S.A., Dikes, D.D., Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acids Res.* 1, 1215.
38. Mottinen, T., Hannonen, P., Korpela, M., 2002. Delay in institution of therapy of remission using single-drug or combination-disease-modifying antirheumatic drug therapy in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46, 894-8.
39. Mokrousov, I., Vyazovaya, A., Kolodkina, V., Limeschenko, E., Titov, L., Narvskaya, O., 2008. Novel macroarray-based method of *Corynebacterium diphtheriae* genotyping: evaluation in a field study in Belarus. *Eur. J. Clin. Microbiol.*
40. Neer, C.S., 1974. Replacement arthroplasty for glenohumeral osteoarthritis. *Journal of Bone and Joint Surgery.* 56 (1), 1-13.
41. Niño-Moreno, P., Portales-Pérez, D., Hernández-Castro, B., Portales-Cervantes, L., 2007. P2X7 and NARAMP1/SLC11A1 gene polymorphisms in Mexican mestizo patients with pulmonary tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology.* 148, 469-477.
42. North, A.R., 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological Reviews.* 82 (4), 1013-1067.
43. Peakman, M., 2011. Tolerancia y mecanismos de autoinmunidad. En: (Eds.), *Inmunología básica y clínica.* Elsevier. España, 2,122-132.
44. Pflieger, B., Simmons, D., 2006. The global burden of rheumatoid arthritis in the year 2000. *Arthritis Rheum.* 5.
45. Pisetsky, D.S., Gilkeson, G., Clair, E.W., 2000. Systemic lupus erythematosus. Diagnosis and treatment. *Med. Clin. North. Am.* 81, 113-2.
46. Portales-Cervantes, L., Niño-Moreno, P., Dóniz-Padilla, L., Baranda-Candido, L., García-Hernández, M., Salgado-Bustamante, M., González-Amaro, R., 2010. Expression and function of the P2X7 purinergic receptor in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Human Immunology.* 71, 818-825.

47. Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G., Dubyak, G.R., 2007. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J. Immunol.* 179(3), 1913–1925.
48. Rioux, J.D., Abbas, A.K., 2005. Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. *Nature.* 435, 584-589.
49. Saunders, B.M., Fernando, S.L., Sluyter, R., Britton, W.J., Wiley, J.S., 2003. A loss-of-function polymorphism in the human P2X7 receptor abolishes ATP-mediated killing of mycobacteria. *J. Immunol.* 171, 5442-6.
50. Scott, D.L., Wolfe, F., Huizinga, T.W., 2010. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 376(9746), 1094-108.
51. Shemon, A.N., Sluyter, R., Fernando, S.L., Clarke, A.L., Dao-Ung, L.P., Skarratt, K.K., 2005. A Thr-357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X7 function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. *J. Biol. Chem.* 27, 2079–86.
52. Sluyter, R., Shemon, A.N., Wiley, J.S., 2004. Glu496 to Ala polymorphism in the P2X7 receptor impairs ATP-induced IL1- β release from human monocytes. *J. Immunol.* 172, 3399-405.
53. Smyth, A., Garovic, V.D., 2009. Systemic lupus Erythematosus and pregnancy. *Minerva Urol Nefrol.* 61(4), 457-74.
54. Snaith, M., Isemberg, D., 1996. Systemic lupus erythematosus and related disorders. In Weatherall, D., Ledingham, J., Warrell, D., (Eds.), *Oxford Textbook of Medicine* 3^o ed. Oxford University Press. Oxford. 3017-3027
55. Speroff, L., Glass, R.H., Kase, N., 1999. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility.* Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore. 6.
56. Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R.A., Buell, G., 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science.* 272, 735-738.

57. Starczynski, J., Pepper, C., Pratt, G., 2003. The P2X7 receptor gene polymorphism 1513 A/C has no effect on clinical prognostic markers, in vitro sensitivity to fludarabine, Bcl-2 family protein expression or survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br. J. Haematol.* 123, 66-71.
58. Symmons, D.P., Hazes, J.M., Silman, A.J., Cases of early inflammatory polyarthrititis should not be classified as having rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 30, 902-904.
59. Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F., Masi, A.T., McShane, D.J., Rothfield, N.F., 1982. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25, 1271-7.
60. Taype, C.A., Shamsuzzaman, S., Accinelli, R.A., Espinoza, J.R., Shaw, M.A., 2010. Genetic susceptibility to different clinical forms of tuberculosis in the Peruvian population. *Infect. Genet. Evol.* 10 (4), 495-504.
61. Taype, C.A., Castro, J.C., Accinelli, R.A., Herrera-Velit, P., Shaw, M.A., Espinoza, J.R., 2006. Association between SCL11A1 polymorphisms and susceptibility to different clinical forms of tuberculosis in the Peruvian population. *Infect. Genet. Evol.* 6(5), 361-7.
62. U.S. National Library of Medicine.
63. USPHS/IDSA. 2006. Guidelines for the Prevention of opportunistic infections in persons infected with human immunodeficiency virus: a summar. *MMWR.* 44. N| RR-8.
64. Van Jaarsveld, C.H.M., Jacobs, J.W.G., Van der Veen, M.J., 2000. Aggressive treatment in early rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* 59, 468-77.
65. Wakeland, E.K., Wandstrat, A.E., Liu, K., Morel, L., 1999. Genetic dissection of systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 701-707.
66. Wallace, D.J., 2010. Advances in drug therapy for systemic lupus erythematosus. *BMC. Med.* 8, 77.
67. Wallace, D.J., Hahn, B., Dubois, E.L., 2007. Dubois` lupus erythematosus. Lippincott Williams & Wilkin. Philadelphia. 17, 1414.

68. Wiley, J.S., Dao-Ung, L.P., Gu, B.L., Sluyter, R., Shemon, A.N., Li, C., 2002. A loss of function polymorphic mutation in the cytolytic P2X7 receptor gene and chronic lymphocytic leukemia: a molecular study. *Lancet*. 359, 1114-9.
69. Yildirim-Toruner, C., Diamond, B., 2011. Current and novel therapeutics in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 127 (2), 303–312.
70. Yoshioka, K., Nakata, H., 2004. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: purinergic receptor complex: generating adenosine-sensitive adenosine receptors. *J. Pharmacol. Sci.* 94, 88-94.
71. Yuzo, O., Yoshinori, U., Shinji, O., Akira, E., Rika, N., Koji, A., Hiroko, F., 2012. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in a Rheumatoid Arthritis Patient Treated with Infliximab. *Intern. Med.* 51, 655-657.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

1. <http://www.galenusrevista.com/spip.php?article144>
2. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/raynaudsdisease.html>)
3. www.brjpharmacol.org
4. <http://tallcute.files.wordpress.com/2008/09/apoptosismacrophage.jpg>
5. http://es.wikipedia.org/wiki/Moritz_Kaposi)
6. <http://www.institutferran.org/lupus.htm>

ANEXO 1.

CONSENTIMIENTO

Yo,.....

Acepto participar voluntariamente en el estudio: **“RELACION ENTRE EL POLIMORFISMO DEL GEN DEL RECEPTOR P2X7 CON ENFERMEDADES AUTOINMUNES INFLAMATORIAS (LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO Y ARTRITIS REUMATOIDE)”**

Se me ha informado que mi vida no corre ningún peligro, ni existe ningún perjuicio para mi salud, además que es un aporte para la ciencia.

También se me ha informado que puedo retirarme del mismo el momento que yo crea conveniente.

Conozco detalladamente las fases del estudio, los exámenes que se me realizarán, así como los beneficios que de este estudio se obtendrán.

Para constancia firmo con mi testigo

.....
PACIENTE

FECHA:.....

.....
TESTIGO

FECHA:.....

.....
TESISTA

FECHA:.....

NOTA: LOS CONSENTIMIENTOS FIRMADOS SON DE EXCLUSIVA PROPIEDAD DE LA AUTORA, PARA JUSTIFICACIÓN Y SUSTENTACION DE LA INVESTIGACIÓN.

ANEXO 2. EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción de DNA se realizó por la técnica de expulsión salina

1. Se utilizó sangre total periférica con anticoagulante EDTA.
2. Lisar los eritrocitos con una solución de lisis (SLR 1X).
3. Añadir SDS (dodecilsulfato sódico) al 20%, buffer de proteínasa, proteínasa.
4. Adicionar NaCl 5M.
5. Agregar etanol al 95% para precipitar el DNA.
6. Agregar etanol al 70% para conservar el DNA y eliminar sales.
7. Secar y luego añadir TE (Tris-EDTA), para luego medir la concentración de DNA en el Nanodrop 1000.
8. Ajustar todas las muestras a una concentración de 200 ng/ul (tubo madre).
9. Del tubo madre obtener alícuotas a una concentración de 10 ng/ul para realizar la PCR en tiempo real.