



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

"Asociación de Variaciones en el número de copias (CNVs) del gen *UNC93B1* con la susceptibilidad a desarrollar Lupus Eritematoso Sistémico Pediátrico (LESp)"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

GÓMEZ BRISEÑO MAURICIO ALFONSO

Asesor de tesis

Dr. HUMBERTO GARCÍA ORTIZ



Los Reyes Iztacala, Edo. de Mexico, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS.

Agradecimientos académicos.

La presente tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Humberto García Ortiz en el Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas a cargo de la Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco, subdirectora de investigación médica del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Agradezco a mi asesor, el Doctor Humberto García Ortiz por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por la confianza que me brindo durante mi estancia en el laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas y por los conocimientos que compartió conmigo, desde cómo se debe de trabajar en laboratorio hasta como realizar análisis estadísticos. También le agradezco el desarrollo profesional y personal que gracias a su motivación pude alcanzar pero sobre todo le agradezco su paciencia y sus atenciones hacia mí.

Agradezco a la Doctora Cecilia Contreras Cubas por su amistad, confianza y apoyo durante mi estancia en el laboratorio y fuera de él, ya que contribuyo en gran medida a mí aprendizaje y desarrollo tanto profesional como personal.

También agradezco a los alumnos y asociados del laboratorio de Inmunogenómica y enfermedades metabólicas que me brindaron su ayuda, consejos y amistad durante mi estancia: Miguel, Angélica, Stef, Pau, Lety, Juan, Lupita, Paco, Flor, Monse, y demás miembros. Por otra parte también quiero agradecer a las personas del Consorcio Estructura de Proteínas del INMEGEN: Doctor Julio, Rafael Nambo, Germán, Julia, Ame, Oscar y Armando, por sus consejos y amistad; pero sobre todo estoy muy agradecido con el Doctor Juan Pablo Reyes Grajeda por compartirme sus vastos conocimientos, por apoyarme en términos académicos incondicionalmente gran cantidad de veces, por la confianza que me brindo y por encima de todo por haberme brindado su amistad.

Agradecimientos personales.

Agradezco infinitamente a mi madre, Maria Luisa Briseño Vega, por todo el apoyo que siempre me brindo, por haberme alentado en momentos difíciles a dar lo mejor de mí y por haberme educado como lo hizo, ya que gracias a ella me fue posible conseguir este logro personal, siempre fue mi motivación en este largo camino. A mi padre Juan Gómez por su apoyo y consejos durante este proceso. A mis hermanos Juan Daniel y Fabiola, ya que siempre me motivaron a ser su ejemplo a seguir y siempre quise que me vieran como una mejor persona en todos los aspectos. A mis abuelitos Agustina y Rafael, por su manera tan cálida de ser, por todo el apoyo que me brindaron en todo momento. A mi tío Miguel Briseño ya que siempre fue y sigue siendo mi ejemplo a seguir en todos los aspectos de su persona. Y en general a toda mi hermosa y cálida familia pues siempre contamos el uno con el otro incondicionalmente, por eso este logro es para ustedes, gracias por ser la mejor familia. Los amo.

Agradezco a Diana Ortiz, por haberme dado su cariño, apoyo y compañía en este largo camino lleno de obstáculos. Por su comprensión y sobre todo por los buenos momentos a donde nos llevo nuestra historia, por haber vivido a mi lado una de las mejores etapas de mi vida, porque siempre estuvo ahí y sobre todo porque me recordó lo importante que es valorar a las personas y nunca olvidar tus sueños.

Agradezco a la profesora Gabriela y al profesor Roberto, por su tiempo, amistad, consejos y calidez en todo momento, por motivarme a ser mejor persona, darme palabras de aliento en los momentos difíciles y por ayudarme a crecer profesionalmente.

Además agradezco a todos mis amigos y compañeros que hicieron que mi carrera fuera una de las mejores aventuras, con sus consejos, bromas, retos y su sencillez para ver la vida. En especial agradezco a mis amigos que hoy en día siguen formando parte de mi vida, Alberto, Uriel, Sergio, Nadia, Lili y Alejandra, pues siempre he tenido su apoyo en todos los sentidos de la palabra.

También quiero agradecer a todos aquellos profesores que con sus conocimientos y su actitud hicieron posible que siguiera adelante y formara carácter ya que sus lecciones no solo las recibí en el aula de clases sino fuera de ella también, uno de esos profesores es el Doctor Arturo Rocha que me enseñó la diferencia entre lo correcto y lo verdadero, además de que me impulsó a dar lo mejor de mí y ver la vida de manera diferente (con los anteojos de la ciencia).

Así mismo quiero agradecer a todas aquellas personas ajenas a mi vida académica que me enseñaron muchas cosas acerca de lo importante de la vida. En este momento en específico quiero agradecer a mis compañeros de grupo Salud y Vida porque con ellos retomé las fuerzas que me hacían falta para cerrar esta etapa de mi vida, además de que las experiencias que me han brindado están dentro de las mejores que he vivido.

Por último quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *alma máter*.

“No es la especie más fuerte la que sobrevive, ni la más inteligente, sino la que con sus características individuales responde mejor a la presión de su medio ambiente, llamada cambio.”

[Charles Darwin]

...una decisión de peso, va unida a la voz del destino; el peso, la necesidad y el valor son tres conceptos internamente unidos: solo aquello que es necesario, tiene peso; solo aquello que tiene peso, vale.

[Milan Kundera]

Los grandes momentos de tu vida no serán necesariamente las cosas que haces, también estarán las cosas que te pasan.

[Ted Mosby]

Se lo que quieras ser, pero se de los mejores!!!....siempre.

[Wabre Liebe]

Lo Nuevo siempre es mejor!.....Y el mundo es para divertirse.

Tabla de contenido.

<i>Índice de tablas.</i>	1
<i>Índice de figuras.</i>	2
<i>Índice de abreviaturas.</i>	3
<i>Resumen.</i>	5
<i>1. Introducción.</i>	7
<i>1.1 Enfermedades autoinmunes.</i>	7
<i>1.2. Prevalencia de LES.</i>	8
<i>1.3. Diagnóstico.</i>	9
<i>1.4. Lupus Eritematoso Sistémico Pediátrico (LESp).</i>	11
<i>1.5. Diferencia entre niños y adultos.</i>	12
<i>1.6. Manifestaciones clínicas.</i>	12
<i>2. Genética de la enfermedad.</i>	15
<i>2.1. Factores Genéticos.</i>	15
<i>2.2. Alelos de Susceptibilidad a LES.</i>	16
<i>3. Vía de los TLRs/IFN.</i>	18
<i>3.1. Gen UNC93B1.</i>	21
<i>4. Variaciones en el Número de Copias (CNVs).</i>	23
<i>4.1. Estudios de CNVs asociadas a LES.</i>	24
<i>5. Justificación.</i>	25
<i>6. Hipótesis.</i>	26
<i>7. Objetivos.</i>	27
<i>7.1. Objetivo general.</i>	27
<i>7.2. Objetivos particulares.</i>	27
<i>8. Material y métodos.</i>	28
<i>8.1. Estrategia experimental.</i>	28
<i>8.2. Pacientes.</i>	29
<i>8.3. Curva estándar y eficiencia de oligonucleótidos.</i>	29
<i>8.4. Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.</i>	31
<i>8.5. Análisis estadístico.</i>	32

9. Resultados.	34
9.1. Validación de los productos de PCR.	34
9.2. Construcción de curvas estándar.	34
9.3. Comparación del número de copias entre casos y controles.	39
10. Discusión.	43
11. Conclusiones.	47
12. Bibliografía.	48
13. Apéndice 1.	59

Índice de tablas.

<i>Tabla 1. Criterios del ACR para el diagnóstico de LES.</i>	10
<i>Tabla 2. Tabla de primers del gen blanco y los dos genes housekeeping.</i>	30
<i>Tabla 3. Riesgo estimado para el número de copias mayor o menor a dos, de UNC93B1 para el desarrollo de Lupus Eritematoso Sistémico Pediátrico y Nefritis lúpica.</i>	42
<i>Tabla 4. Clasificación de la variación genética en el genoma humano.</i>	59

Índice de figuras.

<i>Figura 1. Procesos biológicos en los que se agrupan los genes de asociación a Lupus Eritematoso Sistémico.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 2. Vía de señalización de TLR7 y 9 en células dendríticas plasmacitoides.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 3. Ubicación y estructura genética de UNC93B1.</i>	<i>22</i>
<i>Figura 4. Curvas de disociación de los cuatro pares de primers.</i>	<i>35</i>
<i>Figura 5. Curvas estándar de los cuatro pares de oligonucleótidos.</i>	<i>36</i>
<i>Figura 6. Correlaciones de Spearman, construidas a partir del NC relativo del gen UNC93B1, utilizando los cuatro pares de cebadores..</i>	<i>38</i>
<i>Figura 7. Comparación entre el número de copias relativo de UNC93B1</i>	<i>40</i>

Índice de abreviaturas.

- ACR. Colegio Americano de Reumatología.
- ANA. Anticuerpos antinucleares.
- APL. Anticuerpos antifosfolípidos.
- BCR. Receptor de células B.
- CNVs. Variaciones en el Número de Copias.
- CpG. Abreviatura de –C-fosfato-G-, es decir citosina y guanina y guanina separadas por un fosfato. Son regiones de DNA en donde un nucleótido de citosina se encuentra junto a un nucleótido de guanina dentro de una secuencia lineal de bases nitrogenadas.
- Ct. Ciclo umbral, del inglés Threshold cycle.
- DNA. Ácido desoxirribonucleico.
- dsDNA. Ácido desoxirribonucleico de doble cadena.
- EAs. Enfermedades autoinmunes.
- Fc. Fracción cristalizable de las inmunoglobulinas. La región Fc se une a varios receptores celulares como el receptor Fc y otras moléculas del sistema inmunitario como las proteínas del complemento. Al efectuar esto, media en diferentes efectos fisiológicos incluyendo la opsonización, lisis celular y desgranulación de las células cebadas, basófilos y eosinófilos.
- GLADEL. Grupo Latinoamericano de Estudios de Lupus.
- IC. Intervalo de confianza.
- IFNI. Interferón tipo 1.
- INMEGEN. Instituto Nacional de Medicina Genómica.
- ISN. International Society of Nephrology.
- LES. Lupus Eritematoso Sistémico.
- LEsp. Lupus Eritematoso Sistémico pediátrico.
- MHC-II. Complejo principal de histocompatibilidad de clase II.
- NC. Número de copias.
- NK. Células asesinas naturales.
- NL. Nefritis Lúpica.

- OR. Razón de momios, del inglés odds ratio.
- PAMPs. Patrones Moleculares Asociados a Patógenos.
- pb. Pares de bases.
- PCR. Reacción en Cadena de Polimerasa, del inglés polymerase chain reaction.
- pDC. Células dendríticas plasmacitoides.
- PRR. Receptores reconocedores de patrones.
- PRT relación de secuencias parálogas, del inglés paralogue ratio test.
- Q-PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real, del inglés quantitative polymerase chain reaction.
- RE. Retículo endoplásmico.
- RNA. Ácido ribonucleico.
- Ro. Hexámeros proteicos de la familia de las helicasas. Constituyen un método de terminación de la transcripción alternativo al habitual.
- SLEDAI. Índice de Actividad de la Enfermedad de Lupus Eritematoso Sistémico, del inglés Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index.
- Sm. Familia de proteínas que se unen a una secuencia conservada de RNA interviniendo de esta manera en el procesamiento y regulación del mRNA durante el proceso de splicing.
- SNP. Polimorfismos de un solo nucleótido, del inglés Single Nucleotide Polimorphism
- SS-A/Ro. Antígeno nuclear extraíble (ENA), integrado por antígenos proteicos de 52 y 60 kD combinado con especies de RNA citoplasmático.
- ssRNA. Ácido ribonucleico de cadena sencilla.
- TLRs. Receptores Tipo Toll, del inglés Toll-like receptors.
- TNFa. Factor de Necrosis Tumoral alfa.
- λs. Riesgo elativo entre hermanos.

Resumen.

Introducción: El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por la producción de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos nucleares. El lupus eritematoso sistémico pediátrico (LESp) es más grave y tiene un curso clínico más agresivo en comparación con su contraparte en adultos, además de que la frecuencia de afección renal (nefritis) es superior al 75 %. Datos epidemiológicos han sugerido la participación de factores ambientales y genéticos en su desarrollo, siendo este último quizá el más importante en su desarrollo. Derivado de estudios de gen candidato y de asociación amplios del genoma (GWAS por sus siglas en inglés), se han identificado más de una veintena de genes involucrados en su desarrollo, estos se agrupan en tres vías principalmente: depuración de complejos inmunes, señalización en células del sistema inmune y en la señalización por receptores Toll-like (TLRs) y la producción de interferón (IFN γ). Estudios previos de nuestro grupo han mostrado la importancia de esta última vía en el desarrollo de LES en población mexicana, por lo que es posible que otros genes dentro de esta vía puedan estar involucrados en la etiopatogénesis de esta entidad. Un candidato dentro de esta vía es el gen *UNC93B1*, cuya proteína juega un papel vital en el transporte de los TLRs. Más aún reportes recientes han mostrado la sobre-expresión de esta proteína en pacientes con LES. El gen *UNC93B1* se encuentra en una región en donde se han descrito variaciones en el número de copias (CNVs), uno de los mecanismos por los cuales estos polimorfismos ejercen su influencia sobre el fenotipo es a través de la alteración de los niveles de expresión génica, por lo que la sobreexpresión de este gen en pacientes con LES puede ser debida a la presencia de CNVs. En el presente trabajo se evaluó la asociación de las CNVs del gen *UNC93B1* con la susceptibilidad a desarrollar LESp y nefritis lupica (NL). **Material y métodos:** la determinación de CNVs en el gen *UNC93B1*, se llevo a cabo en una muestra de 198 mujeres diagnosticadas con LESp y 200 mujeres sanas, por PCR en tiempo real con el método de doble delta Ct, utilizando dos pares de primers diferentes para *UNC93B1* y dos genes housekeeping como controles endógenos. El estudio de asociación se realizó con la prueba de Mann-Whitney y con un modelo de regresión logística. **Resultados:** Nuestros resultados muestran que el aumento en la dosis génica

de *UNC93B1* es un factor de riesgo involucrado en la susceptibilidad a desarrollar LESp (OR = 2.16, IC de 1.246 a 3.743 y $p = 0.006$) pero no para el desarrollo de la NL. Nuestros resultados ponen de manifiesto la importancia que tiene la dosis génica de *UNC93B1* en el desarrollo de LESp y a su vez resaltan la importancia de la vía de TLRs/IFN en la etiopatogénesis de LES.

1. Introducción.

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es el prototipo de una enfermedad autoinmune sistémica, se caracteriza por la producción de una gran variedad de autoanticuerpos dirigidos principalmente contra antígenos nucleares (DNA, RNA, histonas, nucleosomas, ribonucleoproteínas, proteínas centroméricas, topoisomerasas, proteínas Sm, Ro, SS-A/Ro, etc.), los cuales forman complejos inmunes que se depositan en los vasos sanguíneos de diversos órganos y tejidos, activando la cascada del complemento y mediadores pro-inflamatorios, lo que conduce a la inflamación crónica de estos tejidos y la presencia de daño en los mismos. Lo anterior causa que el LES pueda afectar a casi cualquier órgano o sistema del organismo, y a su vez a la heterogeneidad clínica de la enfermedad entre pacientes y en el mismo paciente en diferentes momentos de la enfermedad, pudiendo afectar entre otros a los riñones, epidermis, articulaciones, pulmones, mucosas, cerebro y al sistema hematológico (Andrés, 2004; Jiménez, 2011; Tsokos, 2011; Bertsias, Cervera y Boumpas, 2012; Martínez-Godoy *et al.*, 2012; Velázquez *et al.*, 2012; Enríquez-Mejía, 2013; Wallace y Hahn, 2013). En cuanto a las causas que pudieran desencadenar la patogénesis de la enfermedad, se encuentran factores ambientales, hormonales, genéticos, inmunorreguladores y epigenéticos, los cuales pueden actuar de forma secuencial o simultánea para el desarrollo de LES (Tokos, 2011; Velázquez *et al.*, 2012).

1.1 Enfermedades autoinmunes.

El fenómeno de autoinmunidad se define como la incapacidad del sistema inmune de distinguir lo propio de lo ajeno. Esto es derivado de defectos en los mecanismos de tolerancia inmunológica central y periférica, la homeostasis celular y la regulación de la respuesta inmune. Aunque la etiopatogénesis de estos eventos no ha sido elucidada por completo, se sabe que en su desarrollo influyen tanto factores genéticos como ambientales, que interactúan entre sí causando la aparición de diversos fenotipos, que en conjunto se conocen como enfermedades autoinmunes (EAs) (Murphy, Travers y Walport, 2009(b); Kindt, Goldsby y Osborne, 2007; Martínez-Godoy, Oliva-Gutiérrez, Zapata-Zúñiga y Sánchez-Rodríguez, 2012).

Las EAs se caracterizan por una respuesta autoinmune celular o humoral que conlleva a la producción de autoanticuerpos, se presentan en cerca del 5-10 % de la población mundial en general y tienen una prevalencia de 90 casos por cada 10, 000 individuos, de los cuales el 85 % son mujeres en edad reproductiva. El proceso histopatológico asociado a las EAs se asocia a la presencia de autoanticuerpos que se unen a antígenos solubles formando complejos inmunes, que causan inflamación persistente, lo que a su vez deriva en daño sobre los órganos y tejidos blanco (Davidson y Diamond, 2001; Murphy *et al.*, 2009(b); Martínez-Godoy *et al.*, 2012).

De acuerdo al tipo y extensión del daño que causan las EAs se clasifican como:

- Órgano-específicas. Enfermedades cuyo daño se limita a un solo órgano o tejido, generalmente alterando su función. Este daño puede ser mediado por autoanticuerpos, linfocitos T autorreactivos o ambos. Además de la autoinmunidad contra el tejido afectado, pueden estar presentes otros autoanticuerpos que no ocasionan daño pero si son marcadores serológicos de la enfermedad. Algunos ejemplos son: la enfermedad de Adisson, el Síndrome de Goodpasture, la Anemia Perniciosa, etc. (Panayi, 1995; Murphy *et al.*, 2009(b)).
- Sistémicas o generalizadas. El daño ocurre en varios órganos o sistemas y puede ser directo o indirecto. Este último esta mediado por complejos inmunes que promueven la inflamación en los órganos y tejidos en los cuales se depositan. Los autoantígenos pueden pertenecer o no al tejido dañado. Ejemplos de estas enfermedades son el Lupus Eritematoso Sistémico, el Síndrome de Sjögren, la Artritis Reumatoide, entre otras (Panayi, 1995; Kindt *et al.*, 2007; Murphy *et al.*, 2009(b)).

1.2. Prevalencia de LES.

El LES afecta principalmente a mujeres en edad reproductiva. Se ha descrito una relación femenino:masculino de 3:1 antes de la pubertad y de 9:1 después de esta (Kimberly, 2001; Wakeland, Liu, Graham y Behrens, 2001; Marshall, 2002; Stichweh y Pascual, 2005; Blank, Shoenfeld y Perl, 2009; Alonso *et al.*, 2011; Jiménez, 2011; Martínez-Godoy *et al.*, 2012; Enríquez-Mejía, 2013). Además de que la incidencia de LES en mujeres de raza negra es

aproximadamente 4 veces mayor que en mujeres blancas (Uramoto *et al.*, 1999). En general, las mujeres de raza negra tienen una incidencia mayor, seguidas de mujeres asiáticas y por último mujeres blancas (McCarty *et al.*, 1995; Calvo *et al.*, 2003; Danchenko, Satia y Anthony, 2006; Martínez-Godoy *et al.*, 2012).

A nivel mundial se estima una prevalencia de un caso por cada 2, 500 individuos, la cual varía dependiendo el origen étnico, dentro de un intervalo de 40 casos por 100, 000 individuos en el norte de Europa hasta más de 200 por cada 100, 000 en individuos de origen negro. En Estados Unidos varía de 52 casos por cada 100, 000 habitantes (Danchenko *et al.*, 2006), mientras que en México, un estudio reportó una prevalencia del 0.06 %, además que la incidencia se ha estimado de 1.8 a 7.6 casos por cada 100, 000 habitantes al año (Peláez-Ballestas *et al.*, 2011; Bertsias *et al.*, 2012; Secretaría de Salud, 2013).

1.3. Diagnóstico.

La heterogeneidad en la presentación y las manifestaciones clínicas del lupus hace que su diagnóstico sea un reto médico, debido a que no existe un síndrome o manifestación patognomónica para el diagnóstico de la enfermedad, el Colegio Americano de Reumatología (ACR, del inglés American College of Rheumatology) ha establecido criterios clínicos para la evaluación inicial de los pacientes con sospecha de lupus. Los criterios creados en 1982 y actualizados en 1997 (Tabla 1), combinan 11 criterios clínicos y de laboratorio que permiten realizar el diagnóstico de lupus cuando se cumplen al menos 4 de los 11 criterios establecidos.

Tabla 1. Criterios del ACR para el diagnóstico de LES (Hochberg, 1997).

1. Eritema malar	
2. Erupción discoide	
3. Fotosensibilidad	
4. Úlceras orales	
5. Artritis	
6. Serositis:	a) Pleuritis, dolor o derrame pleural
	b) Pericarditis
7. Alteraciones renales:	a) Proteinuria más de 0.5 g/24 h
	b) Cilindros celulares: hemoglobina
8. Afectación neurológica:	a) Convulsiones
	b) Psicosis
9. Alteraciones hematológicas:	a) Anemia hemolítica
	b) Leucopenia
	c) Linfopenia
	d) Trombocitopenia
10. Alteraciones inmunológicas:	a) Anticuerpos anti-DNA elevados
	b) Anticuerpos anti-Smith
	c) Anticuerpos APL
11. Anticuerpos	ANA en valores elevados

1.4. Lupus Eritematoso Sistémico Pediátrico (LESp).

Se estima que entre el 15 y el 17 % de todos los casos de LES inician en la edad pediátrica, siendo entre los 10 y 14 años la edad donde se observa un aumento en la aparición de la enfermedad, volviéndose poco común el diagnóstico antes de los 10 años (Font *et al.*, 1998; Lo *et al.*, 1999; Benseler y Silverman, 2005; Camacho y Lirola, 2007; Bertias *et al.*, 2012). Existen pocos estudios que comparan directamente el LESp con el LES de inicio en la etapa adulta (LESa) y aunque los síntomas son similares, el LESp tiene una forma de presentación y un curso clínico más grave que el LESa, con una mayor frecuencia de ciertas manifestaciones clínicas como nefritis, afectación a los sistemas nervioso y hematológico (Font *et al.*, 1998; Brunner, Feldman, Bombardier y Silverman, 1999(a); Carreno *et al.*, 1999; Boon y McCurdy, 2002; Klein, Reiff y Silverman, 2002; Bertias *et al.*, 2012).

Los estudios disponibles sobre la incidencia media anual de LESp la sitúan en un intervalo de 0.36-0.9 niños por cada 100, 000 habitantes, mientras que la prevalencia se estima entre 5-10 por cada 100, 000 niños (Mejía y Mendoza, 2004; Camacho y Lirola, 2007; Bertias *et al.*, 2012). La sobrevida de los pacientes con LESp ha ido mejorando en forma progresiva. De 1995 a 2004, la tasa de sobrevida a 5 años después del diagnóstico de la enfermedad ha aumentado del 50 % hasta un 95 % (Miettunen *et al.*, 2004). Entre los factores que han contribuido a esta mejora destacan el reconocimiento temprano de la enfermedad, el uso cuidadoso de esteroides, tratamientos más agresivos, uso de nuevos fármacos inmunosupresores, disposición de mejores cuidados de apoyo en terapia intensiva, tratamientos más efectivos para la enfermedad cardiovascular e hipertensión arterial, disponibilidad de diálisis y trasplante renal, etc., sin embargo, el control clínico y de laboratorio en forma periódica siguen siendo fundamentales para una evolución satisfactoria de la enfermedad (Caggiani y Gazzara, 2003; Blancas, Guevara y Espinosa, 2009). Actualmente, la expectativa de vida en niños con LES es mayor en países desarrollados, y en países en vías de desarrollo presentan una tendencia al incremento (Drenkard y Alarcón, 2000; González *et al.*, 2005(a); Blancas *et al.*, 2009). Por otra parte un estudio realizado por el Grupo Latinoamericano de Estudios de Lupus (GLADEL) evidenció que los latinos mestizos en comparación con los

caucásicos tienen una mayor mortalidad, asociada a un menor nivel de educación, falta de seguro médico y un seguimiento médico corto, sin descartar los factores genéticos (Drenkard y Alarcón, 2000; Pons *et al.*, 2004; Brunner, Gladman, Ibañez, Urowitz y Silverman, 2008(b)).

1.5. Diferencia entre niños y adultos.

En los niños, la forma de presentación, la evolución clínica y los hallazgos inmunológicos se diferencian muy poco de los de los adultos con LES (Font *et al.*, 1998), sin embargo, las formas del LESp son más graves y tienen un curso clínico más agresivo en comparación con las de la población adulta, debido a que el involucro renal, alteraciones neurológicas, respiratorias, cardiovasculares y hematológicas son más graves (Caggiani y Gazzara, 2003; Stichweh y Pascual, 2005). Esta enfermedad, también interfiere en aspectos psicosociales como la apariencia física y el retraso del crecimiento (Klein *et al.*, 2002).

Si bien los síntomas son similares en el LES y LESp, en niños es más común la presencia de fiebre, la inflamación de los ganglios linfáticos, la inflamación del bazo y manifestaciones neurológicas, mientras que en pacientes adolescentes pueden surgir manifestaciones cardiovasculares. Otra característica del LESp es la alta frecuencia de afección renal, ya que hasta el 80 % de los niños y adolescentes con LES padecen de algún tipo de nefritis en algún momento de su evolución, siendo bastante frecuentes las formas más severas (González, Vásquez, Uribe y Ramírez, 2006(b)).

En general, al inicio de la enfermedad, el 49-90 % de los niños manifiestan síntomas constitucionales (fiebre, cansancio o pérdida de peso), el 20-82 % afección renal, el 20-74 % síntomas musculoesqueléticos, el 22-74 % eritema malar, el 15-45 % linfadenopatías y el 15-74 % viseromegalia (Stichweh y Pascual, 2005; Camacho y Lirola, 2007).

1.6. Manifestaciones clínicas.

Las manifestaciones clínicas de LES son muy diversas, entre las más frecuentes se encuentran diferentes síntomas como: fatiga, fiebre, pérdida de peso, eritemas fotosensibles en piel, artritis, serositis (pleuritis, pericarditis y

peritonitis aséptica), vasculitis, citopenia (anemia hemolítica, trombocitopenia y leucopenia) NL (glomerulonefritis, nefritis intersticial y pielonefritis) y Manifestaciones Neuropsiquiátricas (Kimberly, 2001; Gámez, 2003; González *et al.*, 2006(b); Camacho y Lirola, 2007; Murphy, Travers y Walport, 2009(a); Martínez-Godoy *et al.*, 2012).

Lesiones muco-cutáneas.

- Son lesiones cutáneas en la piel, las cuales aparecen en un 80 % de los pacientes. Las lesiones cutáneas más frecuentes son: la erupción malar, lesiones cutáneas en forma de papulas o placas difusas que no dejan cicatriz y placas eritematosas y descamativas bien delimitadas, con tendencia a la cronicidad y crecimiento periférico (Pérez, García, Rodríguez y Rodríguez, 2005; Stichweh y Pascual, 2005; Harris *et al.*, 2006; Camacho y Lirola, 2007; Jiménez, 2011).

Artritis.

- El 90 % de los pacientes presentan dolor e inflamación en las articulaciones, siendo las más afectadas las interfalángicas proximales y metacarpofalángicas de manos, muñecas y rodillas, aunque cualquier otra articulación puede ser afectada (Pérez *et al.*, 2005; Stichweh y Pascual, 2005; Harris *et al.*, 2006; Camacho y Lirola, 2007; Jiménez, 2011).

Serositis.

- Inflamación de los tejidos serosos del cuerpo, como los tejidos que rodean los pulmones (pleura), corazón (pericardio) y la capa interior del abdomen (peritoneo). Esta patología se presenta en un pequeño número de pacientes a lo largo de la enfermedad y aún menos frecuente como primer dato clínico de la misma. La prevalencia de serositis en LES es del 12 % (Man y Mok, 2005; Pérez *et al.*, 2005; Camacho y Lirola, 2007).

Vasculitis.

- Esta patología se refiere a la inflamación de los vasos sanguíneos, cuyo origen es inmune, esta mediada principalmente por el sistema del

complemento, autoanticuerpos y la inmunidad celular. La vasculitis en LES es sumamente frecuente, al punto que ocurre en más del 50 %, llegando a ser considerada la causa más importante de vasculitis secundaria (Nudenberg y Monti, 2005; Pérez *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2006).

Citopenia.

- Son alteraciones en las células sanguíneas, que pueden ocasionar anemia (principalmente la hemolítica que se presenta en un 10 % de los pacientes), trombocitopenia y leucopenia (se encuentra en más del 50 % de los pacientes) (Pérez *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2006; Jiménez, 2011).

Nefritis Lúpica (NL).

- Trastorno renal causado por la inflamación de los riñones cuya consecuencia puede ser la glomerulonefritis, nefritis intersticial y pielonefritis. Esta complicación se clasifica de acuerdo con ISN (International Society of Nephrology) en seis clases en orden ascendente, siendo la última la más dañina o evolucionada. En cuanto a la prevalencia de la NL, difiere según los grupos de edad y el curso de la enfermedad, siendo más frecuente en adultos jóvenes (39-60 %), sin embargo un 80 % de los niños desarrollan compromiso renal clínico a medida que evoluciona la enfermedad (Stichweh y Pascual, 2005; González *et al.*, 2006(b); Harris *et al.*, 2006; Camacho y Lirola, 2007).

Manifestaciones Neuropsiquiátricas.

- Estas incluyen a las complicaciones neurológicas que se presentan en LES e incluyen la difusión cognitiva, síndrome cerebral orgánico, delirio, psicosis, crisis convulsivas, cefalea, corea y neuropatías periféricas. La afectación del sistema nervioso central se da entre 75 y el 80 % de los pacientes durante el primer año tras el diagnóstico (Stichweh y Pascual, 2005; Camacho y Lirola, 2007; Jiménez, 2011).

2. Genética de la enfermedad.

El factor genético no solo influencia la susceptibilidad si no la forma clínica, como se ha demostrado en estudios epidemiológicos en Estados Unidos. En éstos se ha observado que el riesgo de padecer manifestaciones severas de LES, así como la edad de inicio de la enfermedad, varían según el grupo étnico (hispanos, Afro-americanos o caucásicos). Por ejemplo, en poblaciones no caucásicas los pacientes tienden a ser más jóvenes y a sufrir una enfermedad más grave y activa, con afectación de sistemas como el renal o el cardiovascular y una alta producción de autoanticuerpos. Lo que sugiere que la genética pudiera estar influenciando la prevalencia de los distintos fenotipos (Suárez, 2010).

2.1. Factores Genéticos.

El factor genético sea quizá el más importante para el desarrollo de la enfermedad. Este se fundamenta principalmente en la agregación familiar (10-20 %) y la alta concordancia en gemelos monocigotos (24-58 %), que es aproximadamente 10 veces mayor que en gemelos dicigotos (2-5 %) (Block, Winfield, Lockshin, D'Angelo y Christian, 1975; Kelly y Harley, 2002; Velázquez *et al.*, 2012) y que el riesgo de los hermanos de padecer LES (λ_s) es relativamente más alto ($\lambda_s = 8-29$) en comparación con otras entidades autoinmunes. Estos datos han permitido estimar que la fracción de la enfermedad que puede ser atribuible a los genes (heredabilidad) es aproximadamente del 66 % (Harley, Kaufman, Langefeld, Harley, y Kelly, 2009; Alarcón *et al.*, 2005; Velázquez *et al.*, 2012). De hecho, se estima que la prevalencia del LES en los familiares de primer grado es 66 veces mayor que en la población general (2.64 vs 0.04 por 100 afectados con LES e individuos sanos, respectivamente) (Wong y Tsao, 2006) y se ha documentado que esta incrementa cuando existe un familiar de primer grado con otra enfermedad autoinmune (4.1 %), especialmente si hay más de un afectado en la familia (11.3 %) (Velázquez *et al.*, 2012).

Por otra parte, recientemente se encontró una correlación significativa entre la proporción del componente amerindio y el incremento en el número de alelos de riesgo para LES (Sánchez *et al.*, 2012(b)). En contraste, se ha demostrado que los pacientes con LESp que tienen al menos un abuelo con ancestría

Europea, tienen un riesgo menor de desarrollar NL grave que los pacientes pediátricos hispanos, asiáticos y afro-americanos sin ascendencia europea, independientemente del nivel socioeconómico (Frankovich, Hsu, y Sandborg, 2012; Sánchez *et al.*, 2012(b)). Por lo tanto, es probable que en la población infantil el componente genético de susceptibilidad sea mayor que en el adulto y posiblemente exista una relación entre el número de alelos implicados con la edad de inicio, la prevalencia de ciertas manifestaciones clínicas y la gravedad del padecimiento (Webb *et al.*, 2011). En apoyo a esto, se ha estimado que los antecedentes familiares del LES son 5 veces más frecuentes en niños (25 %) que en adultos (5 %) (Michel *et al.*, 2001).

2.2. Alelos de Susceptibilidad a LES.

Hasta el momento se han identificado más de 30 loci asociados a LES principalmente mediante la estrategia de gen candidato o a través de estudios de asociación amplios del genoma (GWAS) (Guerra, Vyse, y Graham, 2012; Velázquez *et al.*, 2012). Actualmente se han reportado más de 50 genes candidato asociados a LES, que muestran resultados reproducibles. Dentro de estos genes se incluyen aquellos que codifican para proteínas del MHC-II (*HLA-II*), la cascada del complemento (*ITGAM*), la activación de células B (*FCGR2A*), componentes de la vía de señalización del interferón tipo I (*IRF5*, *IRAK*, *TREX1* y *TNFAIP3*), proteínas reguladoras de la transducción de señales en células B y T (*BLK*, *BANK1*, *PTPN22*, *PDCD1* y *CTLA4*) y otras proteínas implicadas en la regulación inmune, la inflamación, la quimiotaxis, la maduración de las células dendríticas y la pérdida de tolerancia inmunológica (Wakeland *et al.*, 2001; Bertias *et al.*, 2012; Graf *et al.*, 2012; Velázquez *et al.*, 2012).

La mayoría de estos genes se agrupan en tres procesos biológicos principalmente: 1) la depuración y procesamiento de complejos inmunes, 2) señalización en células B y T, y 3) la vía de señalización de TLRs y la producción de IFN (Sánchez, Barajas, Ramírez, Moreno y Barbosa, 2004(a); Rahman y Eisenberg, 2006; Harley *et al.*, 2009; Delgado, Alarcón y Kozyrev, 2010; Tsokos, 2011; Bertias *et al.*, 2012) (Figura 1).

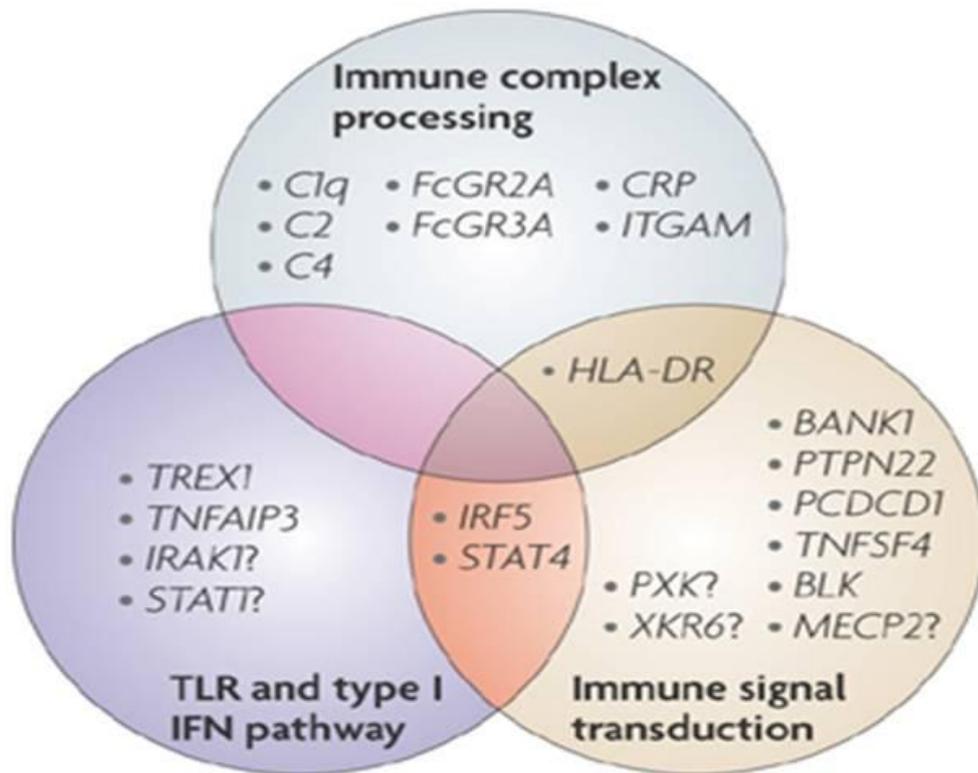


Figura 1. Procesos biológicos en los que se agrupan los genes de asociación a LES. Estos procesos son: procesamiento y depuración de complejos inmunes, la señalización de células B y T y la vía de los TLRs e IFN (Harley *et al.*, 2009).

3. Vía de los TLRs/IFN.

Datos clínicos y experimentales han documentado que niveles elevados de interferón alfa (IFN α) en el suero de pacientes con LES, correlacionan directamente con la gravedad de la enfermedad (Ardoin y Pisetsky, 2008; Gilliet, Cao y Liu, 2008; Harley *et al.*, 2009; Delgado *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013). En el mismo sentido, en años recientes también se demostró la sobreexpresión de genes inducibles por el IFN α (firma del IFN) que a su vez correlacionan con varias manifestaciones clínicas de LES, como glomerulonefritis, afección del sistema nervioso central y la presencia de desórdenes hematológicos, lo que sugiere que la firma del IFN podría ser un biomarcador para las formas más graves de la enfermedad (Baechler *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2006; Linga *et al.*, 2007; García-Ortiz *et al.*, 2010; Nakano *et al.*, 2010; Bertias *et al.*, 2012).

Entre los principales inductores de la vía del IFN se encuentran los receptores tipo Toll (TLRs por sus siglas en inglés Toll-like receptors), dentro de los cuales TLR7, TLR8 y TLR9 podrían tener relevancia en el desarrollo de LES, ya que estos pueden ser activados por ARN y ADN, dos de las principales moléculas que pueden contribuir a la ruptura de la tolerancia periférica contra antígenos propios, producción de autoanticuerpos y el consecuente desarrollo de autoinmunidad (Gilliet *et al.*, 2008; Herrero, 2010; Kim *et al.*, 2013).

Más aun, se han identificado polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés Single Nucleotide Polimorphism) en el gen *IRF5* que se relacionan directamente con el riesgo de presentar LES en población mexicana y el haplotipo de riesgo identificado (TCA) exhibe uno de los ORs más altos reportados para LES (10.5) (Linga *et al.*, 2007). Otro gen de esta vía que mostró asociación con LES en nuestra población fue el gen *TLR7* donde se encontró que el incremento en el número de copias de este gen es un factor de riesgo para desarrollar LES al inicio de la infancia, además de que proporciona nuevas evidencias del papel que juegan los genes ligados al cromosoma X en la susceptibilidad de esta enfermedad (García-Ortiz *et al.*, 2010).

Lo anterior sugiere que otros genes involucrados en esta vía pueden tener un papel potencial en la etiopatogénesis de LES (Figura 2) (Gilliet *et al.*, 2008; Bertias *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013).

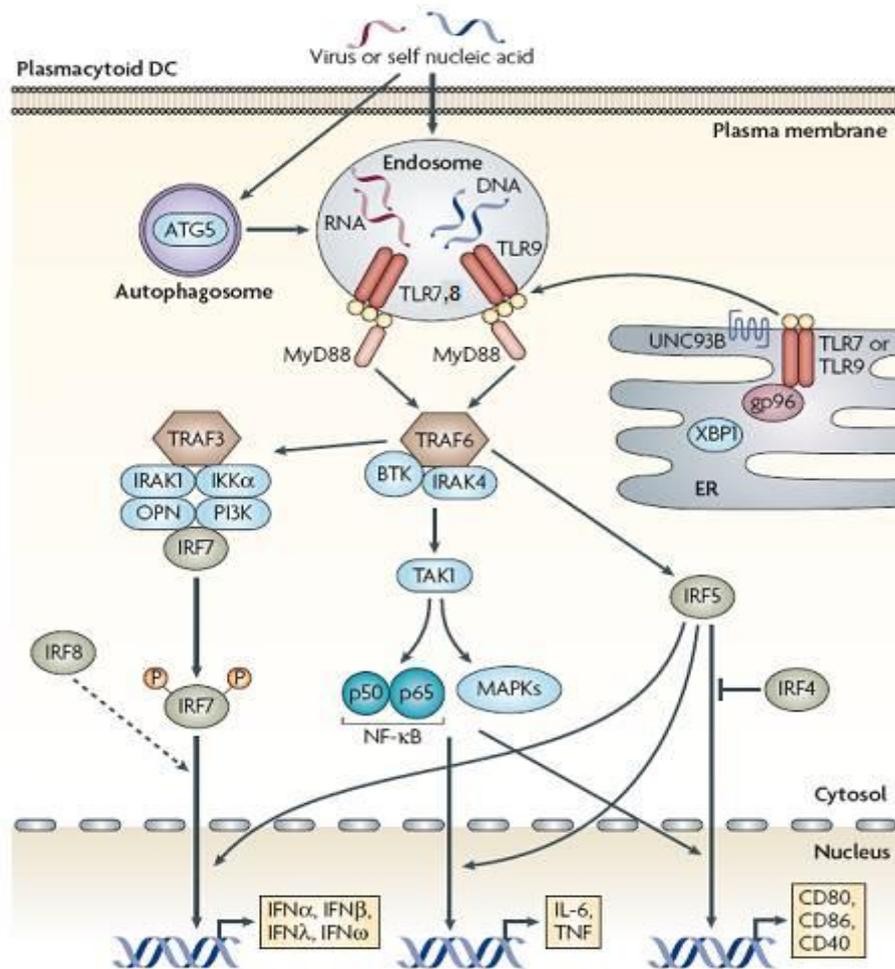


Figura 2. Vía de señalización de TLR7 y 9 en células dendríticas plasmacitoides. Después de la introducción de ligandos de ácidos nucleicos al citoplasma, los TLRs que residen en el retículo endoplásmico (ER), en asociación con las proteínas UNC93B1 y gp96, migran desde éste hacia los endosomas para unirse con sus agonistas y activarlos. Así los cambios conformacionales en los TLRs conducen a la señalización de MyD88 y su posterior asociación con TRAF6 e IRAK4. El complejo MyD88 TRAF6- IRAK4 activa IRF7, TAK1, NF-κB e IRF5 para desencadenar señales descendentes que se verán reflejadas en la transcripción de interferones tipo 1 y citocinas proinflamatorias (Gilliet *et al.*, 2008).

3.1. Gen *UNC93B1*.

Una molécula importante para la vía de señalización de los TLRs/IFN, es el homólogo 1B de la proteína UNC93 de *C. Elegans* (*UNC93B1*), cuyo producto codifica para una proteína chaperona necesaria para que los TLRs endosomales (3, 7, 8 y 9) migren del retículo endoplásmico a los endosomas, evitando su paso por el aparato de Golgi y su posterior degradación en la membrana celular (Tabeta *et al.*, 2006; Brinkmann *et al.*, 2007; Gilliet *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2013), jugando así un papel crucial en la regulación de la señalización por TLRs. El marco de lectura abierto de este gen codifica para una proteína de 598 aminoácidos, la cual se encuentra anclada al retículo endoplásmico y se expresa en células T, B y dendríticas (Figura 2) (Tabeta *et al.*, 2006; Brinkmann *et al.*, 2007; Gilliet *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2013).

Aún no se ha explorado si variantes genéticas en el gen *UNC93B1* se encuentran asociadas al riesgo a desarrollar LES. En 2010, Nakano y colaboradores demostraron que los pacientes con LES exhiben niveles elevados del mRNA de este gen en comparación con controles sanos. Más aún también muestran que estos niveles de expresión correlacionan directamente con los niveles de anticuerpos anti-dsDNA, así como con el índice de actividad de la enfermedad de LES (SLEDAI, por sus siglas en inglés Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index). Lo anterior sugiere a *UNC93B1* como un gen candidato para LES, este gen se encuentra en el locus 13.2 del brazo largo del cromosoma 11 (11q13.2), contiene 11 exones y su secuencia es de 13 879 nucleótidos (Figura 3, A y B) (Kashuba *et al.*, 2002). En esta región se han reportado variaciones en el número de copias (CNVs), un tipo de polimorfismos genéticos que se piensa son de los que más contribuyen a la variabilidad en el fenotipo (Figura 3, C) (Lee *et al.*, 2013).

,

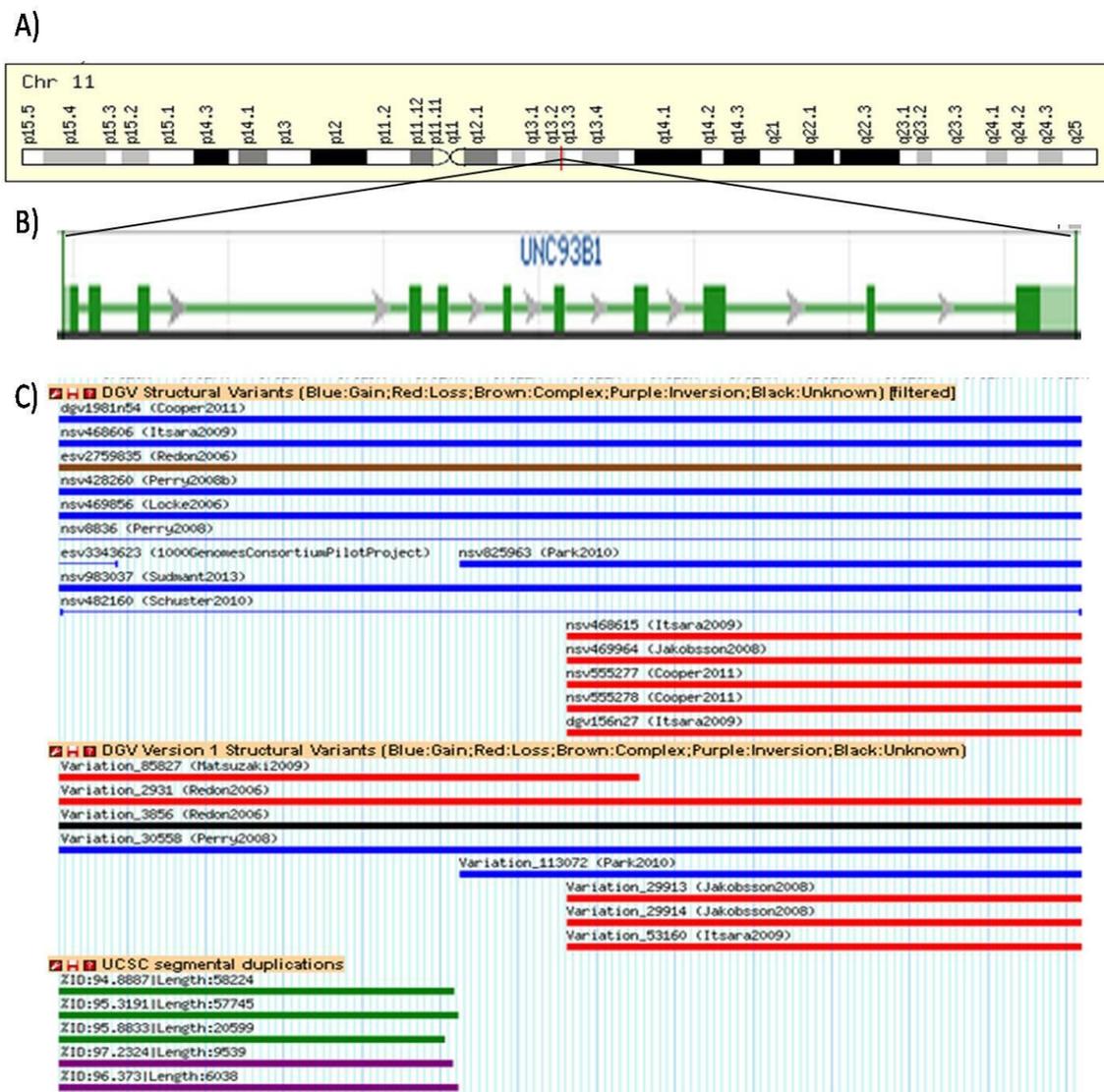


Figura 3. Ubicación y estructura genética de *UNC93B1*. A) Esquema del cromosoma 11 donde se ubica (en rojo) el gen *UNC93B1*, 11q13.2 y B) Esquema del gen *UNC93B1*, donde se indica el número de exones (rectángulos verticales verdes) dentro de este gen (fuente: National Center for Biotechnology Information/PubMed). C) CNVs registradas en *UNC93B1*, rojo = pérdidas, azul = ganancias, café = variantes complejas, negro = desconocida, morado y verde = duplicaciones segmentadas (fuente: Database of Genomic Variants).

4. Variaciones en el Número de Copias (CNVs).

Las CNVs son cambios submicroscópicos de fragmentos de DNA que varían desde 1 Kb a varias Mb, en comparación con un genoma de referencia cuyo número varía entre individuos y tienen una frecuencia igual o mayor al 1 % en la población general (Madrigal, 2008; Hastings, Ira y Lupski, 2009; Suhani y Harish, 2011; Graf *et al.*, 2012). Estos polimorfismos representan una de las principales fuentes de variación genómica con cerca de 1 500 regiones variables, las cuales abarcan más del 12 % del genoma (Redon *et al.*, 2006; Madrigal, 2008). A la fecha, en la base de datos de variaciones genómicas (Database of Genomic Variants) hay descritas 491.894 a lo largo de todo el genoma (Tabla 4, apéndice 1).

Uno de los mecanismos por los cuales las CNVs influyen en la variabilidad del fenotipo, es a través de la alteración de los niveles de expresión de los genes que se encuentran en ellas, ya que un gran número de CNVs contienen la información necesaria para realizar transcripciones enteras de los genes en los que están inmersas y cuando es así, existe una correlación directa entre el aumento en el número de copias y los niveles de mRNA (Feuk, Marshall, Wintle y Scherer, 2006(b); Graf *et al.*, 2012). Los eventos de recombinación no homólogos que subyacen a los cambios en el número de copias permiten la recombinación de exones entre diferentes genes por translocación, inserción o eliminación, por lo que las proteínas pudieran adquirir nuevos dominios y por ende funciones diferentes (Hastings *et al.*, 2009).

Muchas de las CNVs son desfavorables y en la mayoría de los casos conducen a un grupo de condiciones patológicas conocidas como trastornos genómicos (Lupski, 1998; Hastings *et al.*, 2009). La manera en la que estos polimorfismos contribuyen a estos trastornos, es mediante la interrupción directa de uno o varios genes debido a los reordenamientos cromosómicos que causan, efectos directos en la alteración de la dosis o la expresión génica, o bien desenmascarando alelos recesivos o polimorfismos funcionales (Feuk, Andrew y Scherer, 2006(a); Hastings *et al.*, 2009).

4.1. Estudios de CNVs asociadas a LES.

Recientemente, las CNVs han sido asociadas a la susceptibilidad de enfermedades neurológicas, desordenes cardiovasculares, enfermedades infecciosas y autoinmunes, enfermedades metabólicas, cáncer, entre otros trastornos (Suhani y Harish, 2011).

Diversos estudios han documentado la asociación de CNVs en diferentes genes de la respuesta inmune a LES. Uno de los primeros reportes involucró variaciones genéticas del gen *FCGR3B*, en donde individuos con menos de dos copias de este gen, presentan un incremento en el riesgo de desarrollar LES (Fanciulli *et al.*, 2007; Willcocks *et al.*, 2008). Otra asociación es la del componente 4 del complemento (C4, incluyendo C4A y C4B) en donde la disminución en el número de copias (NC) del gen *C4* aumenta el riesgo de padecer LES y viceversa (Yang *et al.*, 2007). Y por último destaca lo reportado por García-Ortiz y colaboradores en 2010, en población mexicana, en el gen *TLR7*, cuyo aumento en el NC está relacionado con un mayor riesgo de padecer LESp, además de que este aumento en la dosis génica también correlaciona con los niveles de mRNA (García-Ortiz *et al.*, 2010).

Lo anterior sugiere que las CNVs en otros genes del sistema inmune como *UNC93B1* pueden estar involucradas en el desarrollo de LES en nuestra población.

5. Justificación.

La identificación de los factores genéticos que predisponen a LES en nuestra población ayudará a mejorar el entendimiento de las bases fisiopatológicas de esta entidad, además de que en un futuro, pueden ayudar al desarrollo de nuevas estrategias para la prevención/pronóstico, diagnóstico y a la identificación de nuevos blancos terapéuticos.

Por otro lado, existen diversas evidencias de la participación de la vía TLRs/IFNI en el desarrollo de LES. Lo que sugiere que además de las reportadas, otras moléculas dentro de esta vía pueden estar involucradas en el desarrollo y evolución de la enfermedad. Dentro de los genes candidato más atractivos de esta vía se encuentra *UNC93B1* cuya función es esencial para función correcta de los TLRs endosomales y su posterior cascada de señalización hacia la producción de IFNI y citocinas proinflamatorias. Más aun la sobre-expresión de este gen correlaciona directamente con los títulos de autoanticuerpos anti-dsDNA y con el SLEDAI. Lo anterior sugiere que polimorfismos en *UNC93B1*, especialmente CNVs pudieran estar involucrados en la susceptibilidad a desarrollar LESp o alguna de sus complicaciones, como la NL.

6. Hipótesis.

El aumento en el número de copias del gen *UNC93B1* puede conferir susceptibilidad a LESp.

7. Objetivos.

7.1. Objetivo general.

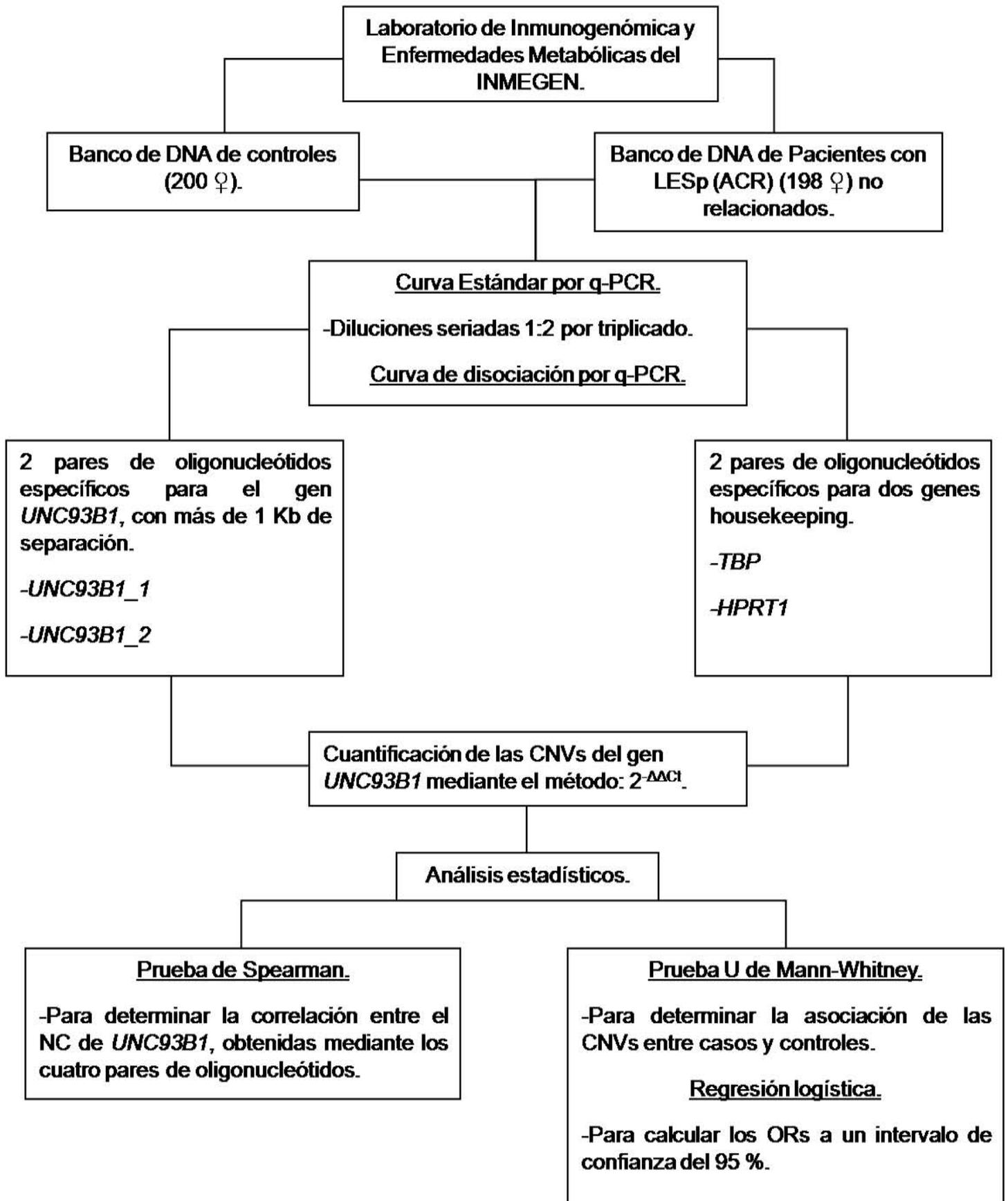
Evaluar si CNVs del gen *UNC93B1* se encuentran relacionadas con la susceptibilidad a desarrollar LESp.

7.2. Objetivos particulares.

- ❖ Evaluar la correlación que existe entre las CNVs del gen *UNC93B1* y los dos genes endógenos de referencia.
- ❖ Establecer si existe correlación entre el genotipo y el desarrollo de NL.

8. Material y métodos.

8.1. Estrategia experimental.



8.2. Pacientes.

Se utilizaron 198 muestras de DNA genómico de pacientes femeninos no relacionados con LESp, diagnosticados de acuerdo a los criterios del ACR, y 200 muestras correspondientes a mujeres sanas sin antecedentes de enfermedades autoinmunes. Todas las muestras mencionadas con anterioridad forman parte del banco de DNA del laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

8.3. Curva estándar y eficiencia de oligonucleótidos.

La construcción de las curvas estándar se realizó utilizando un control femenino, el cual se demostró previamente que posee dos copias de *UNC93B1* como calibrador. Para la elaboración de la curva estándar se realizaron siete diluciones seriadas 1:2, cada una por triplicado, partiendo de una concentración inicial de 80 ng/μL. En total se probaron cuatro pares de oligonucleótidos, dos de ellos específicos para *UNC93B1* separados por más de 1 Kb y los otros dos para genes endógenos o housekeeping (*TBP* y *HPRT1*) (Tabla 2).

Tabla 2. Tabla de oligonucleótidos del gen blanco y los dos genes housekeeping.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia	Amplicón (pb)	Distancia (pb)
UNC93B1	UNC93B1_1	F-5'CCATCGCCGCCCTGCTCTACAC3'	147	6501
		R-5'GGTGTTTGTGGGGCGAGGGAA3'		
UNC93B1_2	F-5'GGGATCCTCAGCGGCTTCAACAA3'	278		
	R-5'CTGAGTTGGGGAGCTAGGGCCGAG3'			
TBP	TBP	F-5'GTGAGAAGATGGATGTTGAGTTGC3'	151	151
		R-5'CCAGATAGCAGCACGGTATGAG3'		
HPRT1	HPRT1	F-5'ACCATGGTACACTCAGCACG3'	150	150
		R-5'GACCCCACGAAGTGTTGGAT3'		

El ensayo se llevo a cabo por PCR en tiempo real (q-PCR) utilizando: 1 μL de SYBR green PCR master mix (1 mM) (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), 0.8 μL de MgCl_2 (25 mM), 0.4 μL de dNTP's (2.5 mM), 0.15 μL del oligonucleótido forward (0.01 mM), 0.15 μL del oligonucleótido reverse (0.01 mM), 6.4 μL de H_2O grado biología molecular, 0.1 μL de AmpliTaq Gold® DNA polimerasa (5 U/ μL) (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) y 1 μL de gDNA, para obtener un volumen final de 10 μL por reacción. La reacción de q-PCR se llevó a cabo en un termociclador ABI PRISM 7900 HT Instrument (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones de termociclaje: 95 °C por 3 minutos seguido de una etapa de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos y 72 °C por 30 segundos; y por ultimo una etapa de disociación compuesta por 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos y 95 °C 15 segundos tanto en pacientes como en controles sólo se utilizaron muestras con una concentración de DNA de 20 a 25 μL .

La especificidad de los oligonucleótidos se obtuvo por el análisis de curva de disociación, en la cual se mide la pérdida de emisión de fluorescencia debido al aumento gradual de la temperatura después de la reacción de PCR. La presencia de un solo pico indica que existe un solo producto en la reacción, confirmando así la especificidad de los oligonucleótidos.

La eficiencia de la PCR, de los cuatro pares de oligonucleótidos se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$E = 10^{(-1/S)} - 1$$

En donde S es la pendiente de la curva estándar, la cual es independiente para cada par de primers.

El cálculo de las CNVs se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, utilizando los dos genes housekeeping y un calibrador, el cual previamente se demostró que posee 2 copias del gen blanco (*UNC93B1*). En este caso el calibrador es el control femenino utilizado para la construcción de la curva estándar.

8.4. Método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

Es un método de cuantificación relativa que se basa en la comparación directa de los valores de Ct. En este método primero se obtiene la diferencia que

existe entre el Ct del gen objetivo y el gen endógeno, y después se obtienen los valores relativos del número de copias del gen de interés en comparación con el calibrador. Tal método se describe a continuación y para mayor entendimiento vale la pena mencionar que: gen objetivo = UNC93B1_1 o UNC93B1_2, gen referencia = TBP o HPRT1, muestra = cualquiera de los 398 individuos analizados, y calibrador = control femenino utilizado para la construcción de la curva estándar.

En primer lugar se determinó el valor de ΔCt para cada muestra mediante el cálculo de la diferencia entre el valor de Ct del gen objetivo y el valor de Ct del gen endógeno. El ΔCt se determinó para cada muestra desconocida y para el calibrador.

$$\Delta Ct (\text{muestra}) = Ct \text{ del gen objetivo} - Ct \text{ del gen de referencia}$$

$$\Delta Ct (\text{calibrador}) = Ct \text{ del gen objetivo} - Ct \text{ del gen de referencia}$$

A continuación, se determinó el valor del $\Delta\Delta Ct$ de cada muestra restando el valor del ΔCt de la muestra menos el ΔCt del calibrador.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ de la muestra} - \Delta Ct \text{ del calibrador}$$

Por último, como las eficiencias de PCR, del gen objetivo y el de referencia fueron comparables, se normalizaron los valores de $\Delta\Delta Ct$ de cada muestra mediante la siguiente fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Así pudimos obtener una cuantificación relativa del número de copias de *UNC93B1*, que posee cada muestra, en comparación con el número de copias que posee el calibrador.

8.5. Análisis estadístico.

La prueba de Spearman se usó para determinar la correlación entre el número de copias relativo de *UNC93B1* estimado por q-PCR utilizando dos pares de oligonucleótidos para *UNC93B1* y dos genes “housekeeping”.

El estudio de asociación se realizó comparando las CNVs de *UNC93B1* entre casos y controles, mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

Implementando el software GraphPad Prism V 6.0. Los ORs a un intervalo de confianza al 95 % se calcularon con un modelo de regresión logística implementando en software SPSS V 16.0, utilizando como variable dependiente el estatus de caso o control y como variable de predicción el número de copias de *UNC93B1*.

9. Resultados.

9.1. Validación de los productos de PCR.

La especificidad de los productos de PCR fue verificada mediante curvas de disociación. Donde la presencia de un solo pico para cada uno de los pares de oligonucleótidos fue indicativo de la presencia de un solo producto de PCR. Lo anterior se observó para cada uno de los cuatro pares de oligonucleótidos. En la figura 4 se muestran las gráficas para cada uno de los productos de PCR, UNC93B1_1, UNC93B1_2 (Figura 4A y 4B), TBP y HPRT1 (Figura 4C y 4D). Las gráficas se generaron en el software SDS 2.3 (Applied Biosystems, Ca.).

9.2. Construcción de curvas estándar.

La construcción de la curva estándar se realizó con la muestra calibrador, los resultados de este análisis muestran una alta reproducibilidad, ya que los coeficientes de correlación R^2 fueron mayores a 0.99 (Figura 5). Más aun la pendiente calculada para estas curvas osciló entre -3.64 y -3.44, lo cual es un indicativo de la eficiencia de PCR (E) la cual estuvo en un intervalo de oscilación entre 88.03 y 95.1 % para los cuatro pares de oligonucleótidos, siendo el par correspondiente a UNC93B1_2 el que presentó la mayor eficiencia con 95.1 %, seguido de TBP y UNC93B1_1, con 94.39 y 92.1 % respectivamente, mientras que la eficiencia más baja fue la de HPRT1 con 88.03 % (Figura 5).

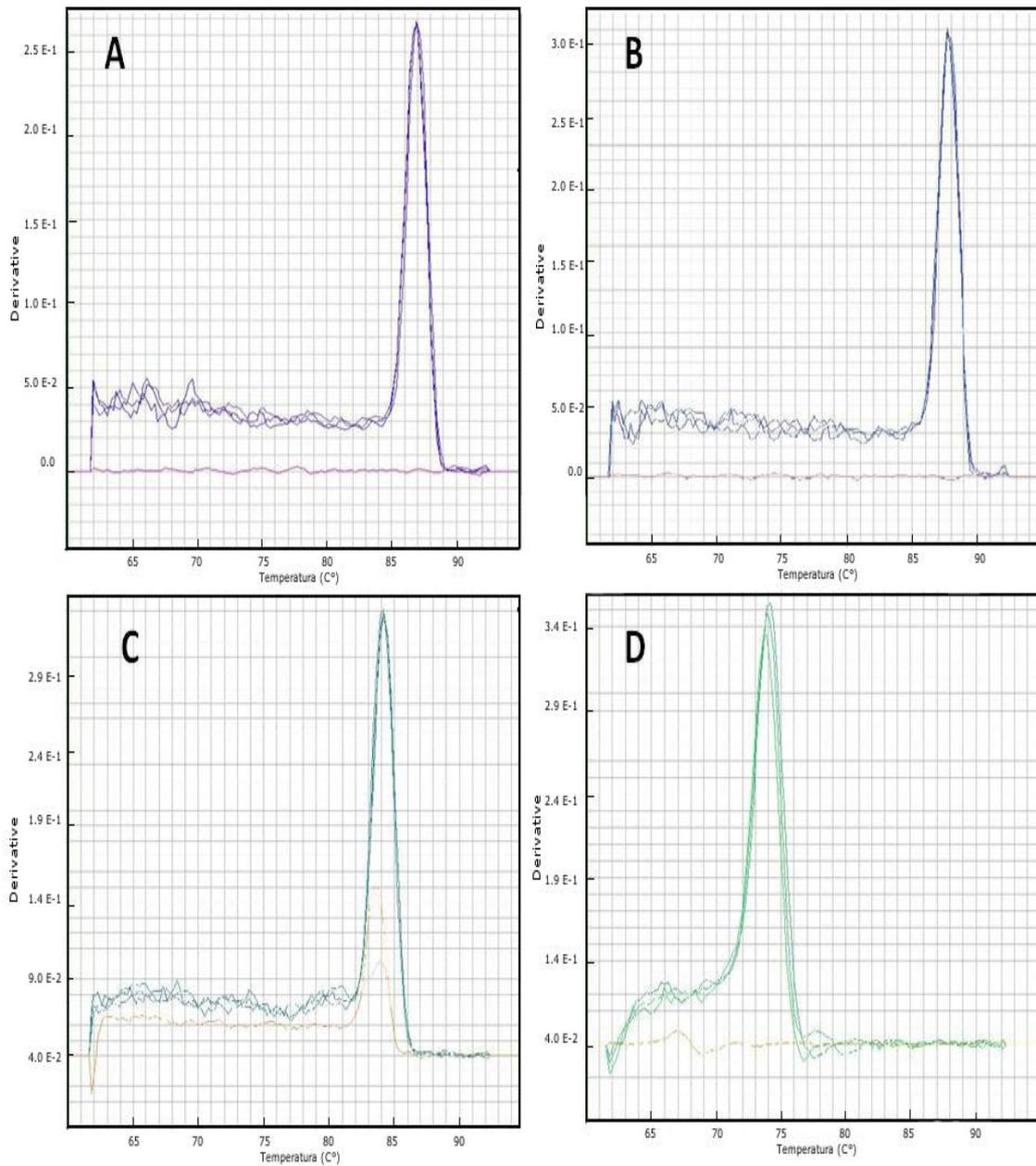


Figura 4. Curvas de disociación de los cuatro pares de primers. UNC93B1_1 (A), UNC93B1_2 (B), TBP (C) y HPRT1 (D), en cada una de ellas se observa la amplificación por triplicado para cada producto de PCR, en comparación con el control negativo el cual no amplificó. En cada gráfica se puede visualizar la temperatura en la que ocurre la disociación del segmento específico de cada par de oligonucleótidos.

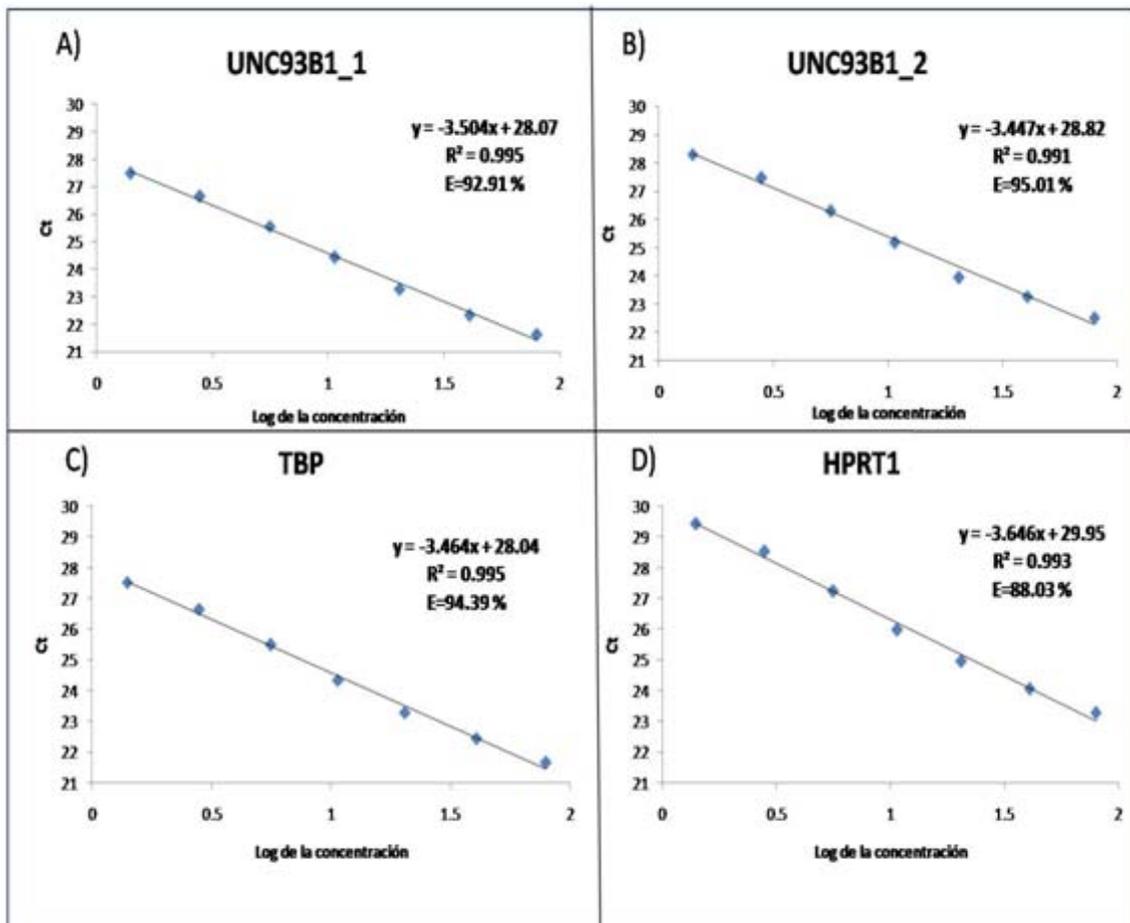


Figura 5. Curvas estándar de los cuatro pares de oligonucleótidos. Cada curva estándar se generó utilizando: siete diluciones seriadas 1:2, partiendo de 80 ng/ μ L, y los valores de Ct. En cada caso se puede observar la pendiente “m” (como parte del modelo $y = mx+b$), el coeficiente de correlación (R^2) y la eficiencia expresada en porcentaje (E).

La estimación del NC de *UNC93B1* con los dos pares de oligonucleótidos y con los dos genes endógenos fue reproducible, mostrando una correlación significativa entre las diferentes estrategias utilizadas para hacer la estimación de las CNVs. Esta correlación se obtuvo mediante la prueba de Spearman, comparando en primer lugar las CNVs calculadas de los controles endógenos (*TBP* Y *HPRT*), para esta estimación se encontró que el coeficiente de correlación de la comparación entre *UNC93B1_1/TBP* vs *UNC93B1_1/HPRT1* ($r = 0.6627$, IC al 95 % = 0.6020-0.7157, $p < 0.0001$) es menor que en el caso de *UNC93B1_2/TBP* vs *UNC93B1_2/HPRT1* ($r = 0.8401$, IC al 95 % = 0.8076-0.8675, $p < 0.0001$) aunque en ambos casos es estadísticamente significativa (Figura 6A y 6B respectivamente). Cuando se compararon las CNVs calculadas entre los dos pares de oligonucleótidos separados por más de una Kb los resultados fueron reproducibles, mostrando que tanto para el caso de *UNC93B1_1/TBP* vs *UNC93B1_2/TBP* ($r = 0.5902$, IC al 95 % = 0.5202-0.6522, $p < 0.0001$) como para *UNC93B1_1/HPRT1* vs *UNC93B1_2/HPRT1* ($r = 0.6431$, IC al 95 % = 0.5798-0.6987, $p < 0.0001$) el coeficiente de correlación es estadísticamente significativo (Figura 6C y 6D respectivamente).

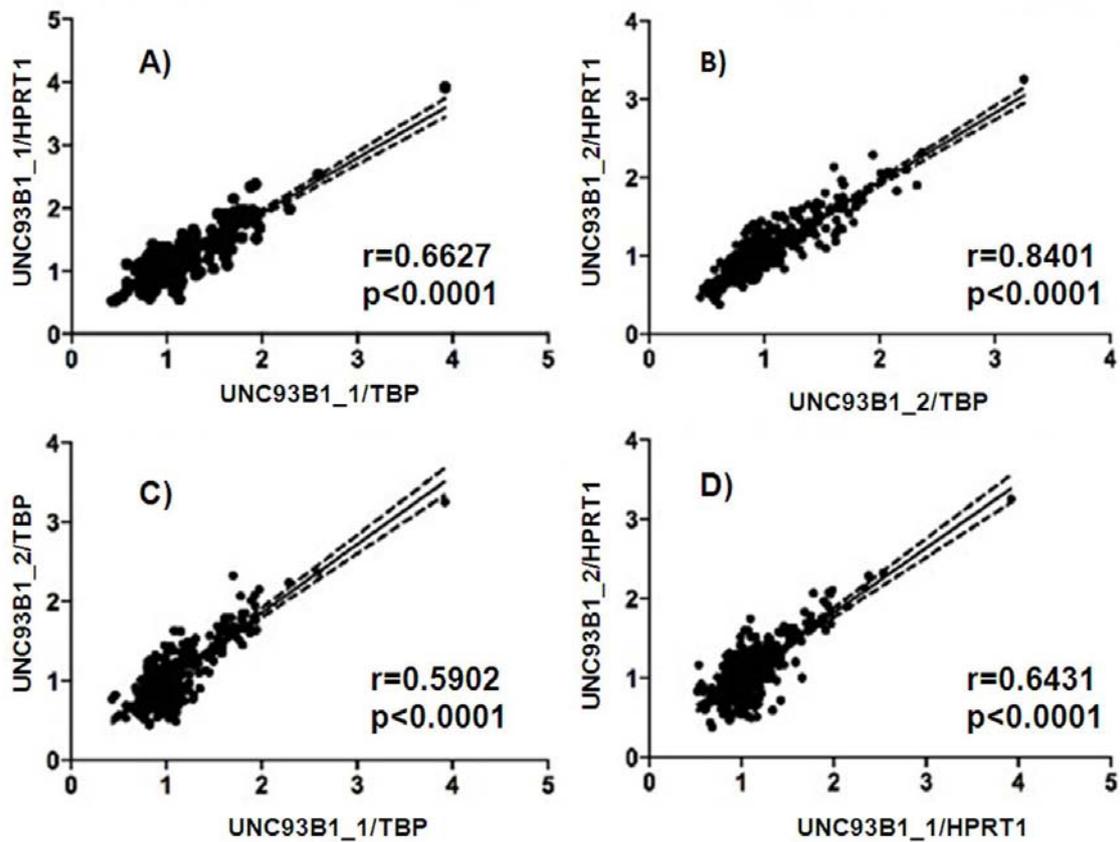


Figura 6. Correlaciones de Spearman, construidas a partir del NC relativo del gen *UNC93B1*, utilizando los cuatro pares de cebadores. Coeficiente de correlación y valor de p del NC de *UNC93B1*, calculado a partir de los dos pares de cebadores correspondientes a los genes endógenos: *UNC93B1_1/TBP* vs *UNC93B1_1/HPRT1* (A) y *UNC93B1_2/TBP* vs *UNC93B1_2/HPRT1* (B). Así mismo también se muestra el coeficiente de correlación y su valor de p de los dos pares de cebadores correspondientes al gen blanco separados por más de 1 Kb de separación: *UNC93B1_1/TBP* vs *UNC93B1_2/TBP* (C) y *UNC93B1_1/HPRT1* vs *UNC93B1_2/HPRT1* (D).

9.3. Comparación del número de copias entre casos y controles.

Una vez confirmada la presencia de las CNVs en el gen *UNC93B1*, se comparó el NC relativo entre casos y controles mediante la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney. Los resultados indican que existe un incremento significativo del NC de *UNC93B1* ($p < 0.0001$), en los pacientes diagnosticados con LESp (mediana = 1.17, intervalo = 0.1-3.3) en comparación con los controles (mediana = 0.9, intervalo = 0.02-2.3) (Figura 7A), lo que sugiere que estos polimorfismos pueden estar asociados a la susceptibilidad a desarrollar LESp en nuestra población. Al estratificar la población en casos con NL (mediana = 1.1, intervalo = 0.1-3.3) y sin ella (mediana = 1.1, intervalo = 0.4-2.3) se observó que las CNVs de *UNC93B1* no presentaron diferencias significativas al momento de la comparación ($p = 0.5854$), lo que nos indica que aunque estos polimorfismos pudiesen estar asociados con LESp no están relacionados con el desarrollo de NL (Figura 7B).

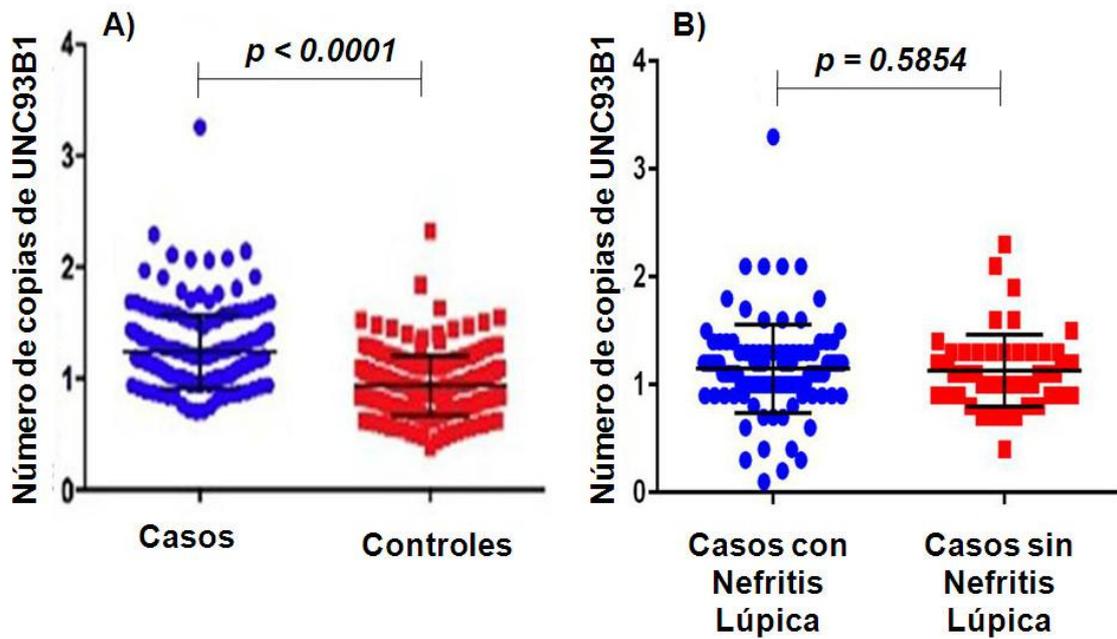


Figura 7. Comparación entre el NC relativo de *UNC93B1* entre pacientes con LESp y controles sanos (A) y pacientes diagnosticados con NL en comparación con los que no la presentan (B). Dentro de los gráficos cada punto corresponde a un individuo y el valor de p indica o no la existencia de diferencias significativas entre cada comparación.

El número absoluto de copias de *UNC93B1* fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con LES en comparación con el grupo de controles. La frecuencia de ganancias de *UNC93B1* fue del 27.3 % (n/N) en los pacientes con LESp (mediana = 1.17, Intervalo = 0.1-3.3), en comparación con los controles donde el porcentaje registrado fue del 11.5 % (n/N), prácticamente menos de la mitad (mediana = 0.9, intervalo = 0.02-2.3). Por otra parte, la presencia de menos de dos copias de *UNC93B1* se observó con mayor frecuencia en el grupo de controles con 31 % (n/N), mientras que en el caso de los pacientes, este de 9.6 % (n/N). La presencia de ganancias en los pacientes diagnosticados con NL (n = 63) fue del 28.8 % (n/N), en comparación con los pacientes diagnosticados sin NL, mientras que los individuos que registraron menos de dos copias fueron solo el 9.8 % (n/N) (Tabla 3).

El estudio de regresión logística mostró que hay un riesgo incrementado para desarrollar LESp en los pacientes femeninos con más de dos copias de *UNC93B1* (OR = 2.16, p = 0.006, IC al 95 % = 1.246-3.743), mientras que la presencia de menos de dos copias de *UNC93B1* parece ser un factor de protección para LESp (OR = 0.282, p < 0.0001 y un IC al 95 % = 0.159-0.5). Por otro lado al comparar la frecuencia de las CNVs de *UNC93B1* entre pacientes con NL y sin NL, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 3). Lo anterior sugiere que el incremento en el número de copias de *UNC93B1* más que estar asociado a NL, es un factor de riesgo para desarrollar LESp.

Tabla 3. Riesgo estimado para el número de copias mayor o menor a dos, de *UNC93B1* para el desarrollo de LESp y NL.

Grupo	Número de Copias	Casos n/N† (%)	Controles n/N† (%)	OR	IC al 95 %	p*
Pacientes	< 2	54/198 (27.3)	23/200 (11.5)	2.16	1.246 a 3.743	0.006
	< 2	19/198 (9.6)	62/200 (31)	0.28 2	0.159 a 0.5	< 0.0001
Pacientes con Nefritis Lupica	< 2	47/163 (28.8)	23/200 (11.5)	1.00 9	0.524 a 2.303	0.803
	< 2	16/163 (9.8)	62/200 (31)	1.13 3	0.364 a 3.527	0.829

†Individuos con pérdidas o ganancias de *UNC93B1* / número total de individuos en el grupo de referencia.

*Valor obtenido mediante regresión logística.

10. Discusión.

En años recientes se ha incrementado la evidencia de la participación del sistema inmune innato en la generación y mantenimiento de la respuesta autoinmune. Una de las vías mejor conocidas que regula una respuesta inmune innata es la transducción de señales a través de los receptores tipo Toll. En este sentido varias moléculas que participan en esta vía que se han involucrado en el desarrollo de LES (Gilliet *et al.*, 2008; Murphy *et al.* 2009(a); Murphy *et al.*, 2009(b); Delgado *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013).

Un ejemplo de lo anterior es lo reportado por García-Ortiz y colaboradores en 2010, que muestran que el aumento en el NC del gen *TLR7* es un factor de riesgo para desarrollar LES al inicio de la infancia, lo que recientemente fue corroborado por Valencia-Pacheco y colaboradores en población mestiza del estado de Yucatán (Valencia-Pacheco *et al.*, 2013). Lo anterior aunado a reportes de nuestro grupo de trabajo y otros, donde otros genes de esta vía como *IRF5*, *STAT1*, *STAT4* e *IRAK1* (Linga *et al.*, 2007; Jacob *et al.*, 2009; Abelson *et al.*, 2009), pone de manifiesto la importancia de esta vía de señalización en la etiopatogénesis de LES y sugiere que otras moléculas dentro de esta vía pueden estar involucradas. En este sentido una molécula que resulta crucial para regular la señalización de la vía de los TLRs es *UNC93B1*. Aunado a lo anterior, reportes previos han sugerido que este gen puede ser candidato para LES.

En el presente trabajo se evaluó la presencia de CNVs del gen *UNC93B1* por PCR en tiempo real entre casos con LESp y controles sanos. Las diferentes estrategias utilizadas para la evaluación de las CNVs (dos pares de oligonucleótidos separados por más de 1 Kb y dos de genes endógenos) mostraron reproducibilidad a un nivel significativo de ($p < 0.0001$ en todos los casos), lo cual es un indicativo de la reproducibilidad de nuestras estimaciones. Sin embargo los coeficientes de correlación por debajo del 80 % en algunos casos, sugieren que existe cierta heterogeneidad en nuestros datos. Lo anterior puede deberse a varios factores, incluyendo la calidad del DNA, la propia metodología utilizada, así como errores de genotipificación, lo anterior sugiere que se requieren controles de calidad adicionales, previos y posteriores a la genotipificación de CNVs para eliminar esta variabilidad de las estimaciones.

Además de estos controles de calidad se sugiere que se utilicen metodologías alternativas como la relación de secuencias parálogas (PRT por sus siglas en inglés: paralogue ratio test). Sin embargo dado el alto nivel de astringencia nuestros resultados muestran que la estimación de las CNVs de *UNC93B1* por la metodología utilizada en el presente proyecto, es adecuada para la estimación del número relativo de copias de este gen.

Nuestros resultados muestran que existen diferencias significativas entre el número de copias relativo del gen *UNC93B1* en pacientes con LESp, en comparación con individuos sanos ($p < 0.0001$). Más aún la presencia de más de dos copias de este gen se observó en el 27.3 % de los pacientes, mientras que en el grupo control fue del 11.5 %, el riesgo calculado, OR = 2.16 ($p = 0.006$, IC al 95 % = 1.246-3.743) para los pacientes con más de dos copias del gen blanco es indicativo de que estos individuos tienen aproximadamente el doble de riesgo de desarrollar LESp en comparación con los individuos que poseen dos copias. Esto es importante debido a que es la primera vez que se asocia el aumento en el NC en este gen con la susceptibilidad a desarrollar LESp. Por otro lado la presencia de menos de dos copias parece ser un factor de protección para LESp, OR = 0.282 ($p < 0.0001$, IC al 95 % = 0.159-0.5). Lo anterior resalta la importancia de la dosis génica, como un factor de riesgo para el desarrollo de procesos autoinmunes. Estos resultados apoyan lo reportado por García-Ortiz y colaboradores en 2010, en donde registran que el aumento del NC del gen *TLR7* (gen de la vía TLRs/IFNI) también está asociado a la susceptibilidad de presentar LESp.

Uno de los principales mecanismos por los cuales las CNVs pueden alterar el fenotipo es a través de la modificación de la dosis génica, causando que los genes que se encuentran en regiones de CNVs sean más propensos a sufrir cambios en sus niveles de expresión, existiendo en muchos casos, una correlación directa entre las CNVs y los niveles de expresión de los genes donde se encuentran contenidas.

Este aumento en la dosis génica pudiera explicar parte de la patogénesis de la enfermedad, debido a la función que tiene la proteína codificada, pues es fundamental para el correcto funcionamiento de los TLRs endosomales.

Tomando en cuenta que nuestros resultados sugieren que los pacientes con LESp poseen más copias del gen *UNC93B1* y que este aumento es factor de riesgo para desarrollar la enfermedad. Es de especularse que también los niveles de expresión de este gen sean mayores en pacientes con LESp, lo cual favorecería el aumento en el transporte de los TLRs y por ende la desregulación en el reconocimiento de los ligandos endógenos (Tabeta *et al.*, 2006; Brinkmann *et al.*, 2007; Gilliet *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2013). Lo anterior se sustenta en la biología misma de los TLRs endosomales donde un inadecuado transporte de estos a los compartimentos endosomales culmina en aberraciones en la señalización mediada por estos receptores (Herrero, 2010; Gilliet *et al.*, 2008; Vadillo y Pelayo, 2012; Kim *et al.*, 2013). En un reporte previo Nakano y colaboradores en 2010, encontraron que pacientes con LES sobreexpresan al gen *UNC93B1*, tanto a nivel de mRNA como de la proteína, en comparación con controles sanos. Más aún, también encontraron una correlación entre los niveles de mRNA de *UNC93B1* con la producción de anticuerpos anti-dsDNA y el SLEDAI. Sin embargo al no investigar la presencia de CNVs de *UNC93B1* en los pacientes con LES no es posible aseverar lo anterior, además de que hay que considerar los diferentes mecanismos de regulación de la expresión que pudieran estar involucrados en la sobreexpresión del transcrito. Debido a lo anterior, se requieren de futuros experimentos para elucidar si estos polimorfismos se correlacionan con los niveles de expresión de este gen y si tienen alguna relación con las características clínicas de LESp.

En LESp, el aumento en el reconocimiento de los ligandos endógenos aumenta la producción de IFNI (Graham *et al.*, 2006; Gilliet *et al.*, 2008; García-Ortiz *et al.*, 2010), por lo que pudiese ser que el aumento en el NC del gen *UNC93B1* no sólo esté influyendo en el transporte de los TLRs, sino también en el aumento de la concentración de estas citocinas, es decir, con el aumento de esta proteína de transporte, la cantidad de TLRs endosomales funcionales puede aumentar, generando un mayor reconocimiento de ligandos y por ende un aumento en la producción de IFNI. Sin embargo dada la naturaleza de nuestro estudio no podemos corroborar si existe correlación entre el número de copias de *UNC93B1* con los niveles de interferón entre pacientes y controles.

Cabe destacar que también es importante considerar para futuros estudios las diferentes correlaciones que pudiesen existir entre las CNVs de *UNC93B1* y otros genes de susceptibilidad para la enfermedad ya identificados en esta población, así como la relación que pudieran presentar estos polimorfismos con otro tipo de variables, como la edad de inicio de la enfermedad, el sexo, las diferentes complicaciones que pudiesen presentar los pacientes, entre otras. También es fundamental tomar en cuenta los diferentes haplotipos dentro o en las cercanías del gen *UNC93B1*, ya que pudiesen estar interviniendo en los mecanismos de regulación de la expresión genética.

A pesar de que la vía TLRs/IFN γ es parte fundamental de la patogénesis de LESp (Harley *et al.*, 2009; Delgado *et al.*, 2010; Tsokos, 2011; Kim *et al.*, 2013), hoy en día existen pocos estudios enfocados a conocer el papel que juega la dosis de sus diferentes genes, en relación con la susceptibilidad, la gravedad y la evolución de la enfermedad, sin mencionar que en población mexicana los estudios son aun más escasos. Esto hace que estudios como este y como el de García-Ortiz *et al.* en 2010 sean importantes, pues generan nuevos conocimientos que bien podrían ser usados para la búsqueda de biomarcadores genéticos, para regular la expresión génica o bien generar terapias menos agresivas para los pacientes. Los resultados de esta investigación podrían proporcionar un nuevo enfoque para el desarrollo de fármacos o terapias menos nocivas. Además, el simple hecho de saber que los pacientes con LESp presentan un mayor NC en comparación con individuos sanos pudiera ser utilizado como biomarcador genético para conocer el riesgo que tienen las personas de presentar la enfermedad.

11. Conclusiones.

- La dosis génica del gen *UNC93B1* se encuentra relacionada con la susceptibilidad a desarrollar LESp en población mexicana, siendo el aumento en el número de copias un factor de riesgo para presentar la enfermedad.
- No se encontró correlación entre el aumento o la disminución en el número de copias del gen *UNC93B1* y el riesgo para desarrollar NL.

12. Bibliografía.

- Abelson K, Delgado-Vega M, Kozyrev V, Sanchez E, Velazquez-Cruz R, Eriksson N, Wojcik J, Linga M, Lima G, DÁlfonso S, Migliaresi S, Baca V, Orozco L, Witte T, Ortego-Centeno N, AADEA group, Abderrahim H, Pons-Estel B, Gutiérrez C, Suárez A, González-Escribano M, Martin J & Alarcon-Riquelme, M. E. 2009. STAT4 associates with systemic lupus erythematosus through two independent effects that correlate with gene expression and act additively with IRF5 to increase risk. *Annals of the rheumatic diseases*. 68(11): 1746-1753.
- Alarcón D, Alarcón E, Cardiel H, Caeiro F, Massardo L, Villa, Pons A & Grupo Latinoamericano de Estudio del Lupus Eritematoso (GLADEL). 2005. Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arthritis y Rheumatology*. 52(4): 1138-1147.
- Alonso D, Llorca J, Martínez F, Miranda A, Díaz T, Dierssen T, Vázquez R, Gómez I, Blanco R & González A. 2011. Systemic lupus erythematosus in northwestern Spain: a 20-year epidemiologic study. *Medicine*. 90(5): 350-358.
- Andrés A. 2004. Análisis de la expresión de genes inmunorreguladores en células linfoides de pacientes con lupus eritematoso sistémico. Tesis (maestro en ciencias en biomedicina molecular). D.F. México. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía.
- Ardoin P & Pisetsky S. 2008. Developments of the scientific understanding of lupus. *Arthritis Research y Therapy*. 10(5): 218.
- Baechler E, Batliwalla F, Karypis G, Gaffney P, Ortmann W, Espe K, Shark B, Grande J, Hughes M, Kapur V, Gregersen K & Behrens W. 2003. Interferón-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(5): 2610.
- Benseler M & Silverman D. 2005. Systemic lupus erythematosus. *Pediatric Clinics of North America*. 52(2): 443-467.
- Bertias G, Cervera R & Boumpas D. 2012. *Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis and Clinical Features*. En *Textbook on Rheumatic Diseases*. pp. 476-505. Suiza, Zürich. EULAR.

- Blancas L, Guevara M & Espinosa F. 2009. Lupus eritematoso sistémico en niños, una revisión de la supervivencia. *Alergias, Asma e Inmunología Pediátricas*. 18(1): 6-9.
- Blank M, Shoenfeld Y & Perl A. 2009. Cross-talk of the environment with the host genome and the immune system through endogenous retroviruses in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 18(13): 1136-1143.
- Block R, Winfield B, Lockshin D, D'Angelo A & Christian L. 1975. Studies of twins with systemic lupus erythematosus. A review of the literature and presentation of 12 additional sets. *The American Journal of Medicine*. 59(4): 533-552.
- Boon S & McCurdy D. 2002. Childhood systemic lupus erythematosus. *Pediatric Annals*. 31: 407-17.
- Brinkmann M, Spooner E, Hoebe K, Beutler B, Ploegh H & Kim Y. 2007. The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. *The Journal of Cell Biology*. 177(2): 265-275.
- Brunner I, Feldman M, Bombardier C & Silverman D. 1999(a). Sensitivity of the systemic lupus erythematosus disease activity index, British Isles Lupus Assessment Group Index, and Systemic Lupus Activity Measure in the evaluation of clinical change in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis y Rheumatology*. 42(7): 1354-1360.
- Brunner I, Gladman D, Ibañez D, Urowitz D & Silverman D. 2008(b). Difference in disease features between childhood-onset and adult-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis y Rheumatology*. 58(2): 556-562.
- Caggiani M & Gazzara G. 2003. Lupus eritematoso sistémico en niños y adolescentes. Características clínicas, inmunológicas y evolutivas. Análisis y consideraciones terapéuticas. *Archivos de Pediatría del Uruguay*. 74(4): 237-244.
- Calvo J, Reveille D, Rodriguez V, McGwin G, Baethge A, Friedman W & Alarcon S. 2003. Clinical, immunogenetic and outcome features of Hispanic systemic lupus erythematosus patients of different ethnic ancestry. *Lupus*. 12(5): 377-385.
- Camacho M & Lirola M. 2007. Lupus eritematoso sistémico. *Anales de Pediatría Continuada*. 5(3): 123-130.

- Carreno L, López J, Monteagudo I, Rodríguez M, Bascones M, González M, Saint C & Lapointe N. 1999. Immunological and clinical differences between juvenile and adult onset of systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 8(4): 287-92.
- Danchenko N, Satia A & Anthony S. 2006. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus*. 15(5): 308-318.
- Database of Genomic Variants. Consultada por última vez el 22 de Septiembre del 2015 en: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>.
- Davidson A. & Diamond B. 2001. Autoimmune diseases. *The New England Journal of Medicine*. 345(5): 340-50.
- Delgado A, Alarcón M & Kozyrev S. 2010. Genetic associations in type I interferón related pathways with autoimmunity. *Arthritis Research and Therapy*. 12(Suppl 1):S5: 1-16.
- Drenkard C & Alarcón D. 2000. The new prognosis of systemic lupus erythematosus: treatment free remission and decreased mortality and morbidity. *Israel Medical Association Journal*. 2(5): 382-387.
- Enríquez-Mejía M. 2013. Fisiopatología del lupus eritematoso sistémico. *Revista de Medicina e Investigación*. 1(1): 8-16.
- Fanciulli M, Norsworthy J, Petretto E, Dong R, Harper L, Kamesh L, Heward M, Gough C, De Smith A, Blakemore I, Froguel P, Owen J, Pearce H, Teixeira L, Guillevin L, Graham S, Pusey D, Cook T, Vyse J & Aitman J. 2007. FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. *Nature Genetics*. 39(6): 721-723.
- Feuk L., Andrew C. & Scherer. 2006(a). Structural variation in the human genome. *Nature Reviews Genetics*. 7(2): 85-97.
- Feuk L., Marshall C., Wintle R. & Scherer S. 2006(b). Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Human Molecular Genetics*. 1(15): R57-R66.
- Font J, Cervera R, Espinosa G, Pallarés L, Ramos M, Jiménez S, Garcia M, Seisdedos L & Ingelmo M. 1998. Systemic lupus erythematosus (SLE) in childhood: Analysis of clinical and immunological findings in 34

- patients and comparison with SLE characteristics in adults. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 57(8): 456-459.
- Frankovich J, Hsu J, & Sandborg C. 2012. European ancestry decreases the risk of early onset, severe lupus nephritis in a single center, multiethnic pediatric lupus inception cohort. *Lupus*. 21(4): 421-429.
 - Gámez J. 2003. Presencia de anti-ADNn como factor predictor de recaídas en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico. Tesis (Doctor en Ciencias Médicas). Colima. Colima. Universidad de Colima. Facultad de Medicina. Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas.
 - García-Ortiz H, Velázquez-Cruz R, Espinosa-Rosales F, Jiménez-Morales S, Baca V & Orozco L. 2010. Association of TLR7 copy number variation with susceptibility to childhood-onset systemic lupus erythematosus in Mexican population. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 69(10): 1861-1865.
 - Gilliet M, Cao W & Liu Y. 2008. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nature Reviews Immunology*. 8(8): 594-606.
 - González B, Hernández P, Olgún H, Miranda M, Lira L, Toso M, Quezada A, Norambuena X, Talesnik E, Méndez C & Navarrete C. 2005(a). Changes in the survival of patients with systemic lupus erythematosus in childhood: 30 years experience in Chile. *Lupus*. 14(11): 918-923.
 - González L, Vásquez G, Uribe O & Ramírez L. 2006(b). Nefropatía Lúpica. Presentación clínica, clasificación y tratamiento. *Revista Colombiana de Reumatología*. 4(13): 307-333.
 - Graham R, Kozyrev S, Baechler E, Linga P, Plenge R, Bauer J, Ortmann W, Koeth T, González Ma, The Argentine and Spanish Collaborative Groups: Pons B, Petri M, Daly M, Gregersen P, Martín J, Altshuler D, Behrens T & Alarcón M. 2006. A common haplotype of interferón regulatory factor 5(IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nature Genetics*. 5(38): 550-555.

- Graf S, Lester S, Nossent J, Hill C, Proudman S & Rischmueller M. 2012. Low copy number of the FCGR3B gene and rheumatoid arthritis: a case-control study and meta-analysis. *Arthritis Research y Therapy*. 14(1): R28.
- Guerra S, Vyse T & Graham D. 2012. The genetics of lupus: a functional perspective. *Arthritis Research and Therapy*. 14(211): 1-12.
- Harley T, Kaufman M, Langefeld D, Harley B, & Kelly A. 2009. Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics*. 10(5): 285-290.
- Harris E, Budo R, Firestein G, Genovese M, Sergent J, Ruddy Sh & Sledge C. 2006. *Manifestaciones clínicas del lupus eritematoso sistémico*. En Kelley Tratado de Reumatología. pp. 1213-1230. Séptima edición. Harris ED Elsevier España.
- Hastings J, Ira G & Lupski R. 2009. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *Plos genetics*. 5(1): e1000327
- Herrero J. 2010. ABC de los <Toll-likereceptores>: relación con el desarrollo y progresión de enfermedades autoinmunes. *Seminarios de la Fundación Española de Reumatología*. 11(4): 135-143.
- Hochberg C. 1997. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 40(9): 1725.
- Jacob O, Zhu J, Armstrong L, Yan M, Han J, Zhou J, Thomas A, Reiff A, Myones L, Ojwang O, Kaufman M, Klein-Gitelman M, McCurdy D, Wagner-Weiner L, Silverman E, Ziegler J, Kelly A, Merrill T, Harley B, Ramsey-Goldman R, Vila M, Bae C, Vyse J, Gikelson S, Gaffney M, Moser L, Langefeld D, Zidovetzki R & Mohan C. 2009. Identification of IRAK1 as a risk gene with critical role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(15), 6256-6261.
- Jiménez J. 2011. *Lupus Eritematoso Sistémico, guías clínicas de enfermedades autoinmunes sistémicas*. Sociedad española de medicina interna (SEMI). España.

- Kashuba I, Protopopov I, Kvasha M, Gizatullin Z, Wahlestedt C, Kisselev L, Klein G & Zabarovsky R. 2002. hUNC93B1: a novel human gene representing a new gene family and encoding an unc-93-like protein. *Gene*. 283(1-2): 209-217.
- Kelly A & Harley B. 2002. The genetics of systemic lupus erythematosus: putting the pieces together. *Genes and Immunity*. 3(1): 71-85.
- Kimberly P. 2001. Research advances in systemic lupus erythematosus. *The Journal of the American Medical Association*. 285(5): 650-652.
- Kim J, Huh J, Hwang M, Kwon H, Jung J, Brinkmann M, Jang H, Ploegh L & Kim M. 2013. Acidic Amino Acid Residues in the Juxtamembrane Region of the Nucleotide-Sensing TLRs Are Important for UNC93B1 Binding Signaling. *The Journal of Immunology*. 190(10): 5287-5295.
- Kindt T, Goldsby R & Osborne B. 2007. *Tolerancia y Autoinmunidad*. En *Inmunología de Kuby*. Pp. 401-411. México, D.F Sexta edición. McGraw.Hill.
- Klein M, Reiff A & Silverman E. 2002. Systemic lupus erythematosus in childhood. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 28(3): 561-77.
- Lee L, Moon E, Shu H, Yuan L, Newman R, Schekman R & Barton M. 2013. UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *eLIFE*. 2: e20091.
- Linga P, Velázquez R, Baca V, Lima G, Granados J, Orozco L & Alarcon M. 2007. Genetic association of *IRF5* with SLE in Mexicans: higher frequency of the risk haplotype and its homozygosity than Europeans. *Human Genetics*. 121(6): 721-727.
- Lo T, Tsai J, Wang H, Huang T, Yang H, Lin T, Liu J & Chiang L. 1999. Sex differences in pediatric systemic lupus erythematosus: A retrospective analysis of 135 cases. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 32(3): 173-178.
- Lupski R. 1998. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangement and human disease traits. *Trends in Genetics*. 14(10): 417-422.
- Marshall E. 2002. Lupus: Mysterious disease holds its secrets tight. *Science*. 1(296): 689-691.
- Madrigal I. 2008. Caracterización de variantes genómicas. Aplicación de nuevas tecnologías al estudio del retraso mental. Tesis (doctora en

- biología). Barcelona. España. Universidad de Barcelona. Facultad de medicina. Biopatología en Medicina.
- Man B., & Mok C. 2005. Serositis related to systemic lupus erythematosus: prevalence and outcome. *Lupus*. 14(10): 822-826.
 - Martínez-Godoy M, Oliva-Gutiérrez E, Zapata-Zúñiga M & Sánchez-Rodríguez S. 2012. Lupus Eritematoso Generalizado: Características Generales, Inmunopatogenia y Antígenos de Relevancia. *Archivos de Medicina*. 1:2(8): 1-7.
 - McCarty J, Manzi S, Medsger A, Ramsey G, Laporte Ph & Kent K. 1995. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis y Rheumatism*. 38(9): 1260-1270.
 - Mejía H & Mendoza A. 2004. Lupus eritematoso sistémico. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*. 1(43).
 - Michel M, Johanet C, Meyer O, Francès C, Wittke F, Michel C, Arfi S, Tournier-Lasserre E, Pietre J-Ch & Group for Research on Auto-Immune Disorders (GRAID). 2001. Familial lupus erythematosus: clinical and immunologic features of 125 multiplex families. *Medicine*. 80(3): 153-158.
 - Miettunen M, Ortiz O, Petty E, Cimaz R, Malleson N, Cabral A, Ensworth S & Trucker B. 2004. Gender and ethnic origin have no effect on longterm outcome of childhood-onset systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology*. 31(8): 1650-1654.
 - Murphy K, Travers P & Walport M. 2009(a). *Inmunidad Innata*. En Inmunobiología de Janeway. pp. 39-100. México, D.F. McGRAW-HILL.
 - Murphy K., Travers P. & Walport M. 2009(b). *Autoinmunidad y transplante*. En Inmunobiología de Janeway. pp. 610-637. México, D.F. McGRAW-HILL.
 - Nakano S, Morimoto S, Suzuki S, Watanabe T, Amano H & Takasaki Y. 2010. Up-regulation of the endoplasmic reticulum transmembrane protein UNC93B in the B cells of patients with active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 49(5): 876-881.
 - National Center for Biotechnology Information/PubMed. Consultado por última vez el 10 de Diciembre del 2014 en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

- Nudenberg B. & Monti J. 2005. La vasculitis en el lupus eritematoso sistémico: estudio clínico patológico. *Archivos Argentinos de dermatología*. 55(1): 5-18.
- Panayi S. 1995. Autoimmunity in humans. *Human and Experimental Toxicology*. 14(1): 101-103.
- Peláez-Ballestas I, Sanin L, Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Burgos-Vargas R, Garza-Elizondo M, Rodríguez-Amado J, Goycochea-Robles M, Madariaga M, Zamudio J, Santana N & Cardiel M. 2011. Epidemiology of the Rheumatic Diseases in Mexico. A Study of 5 Regions Based on the COPCORD Methodology. *The Journal of Rheumatology*. 38(86): 3-8.
- Pérez J, García K, Rodríguez I & Rodríguez D. 2005. Manifestaciones clínicas de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico. *Revista Medica Dominicana*. 1(66): 80-83.
- Pons A, Catoggio J, Cardiel H, Soriano R, Gentiletti S, Villa R, Abadi I, Caeiro F, Alvarellos A & Alarcón D. 2004. Grupo Latinoamericano de Estudio del Lupus. The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus: ethnic and disease heterogeneity among «Hispanics». *Medicine*. 83(1): 1-17.
- QIAGEN. 2004. Critical Factors for Successful Real-Time PCR. *QIAGEN*. 11-16.
- Rahman H & Eisenberg A. 2006. The role of Toll-likereceptors in systemic lupus erythematosus. *Springer Seminars in Immunopathology*. 28(2): 131-143.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch K, Feuk L, Perry G, Andrews T, Fiegler H, Shapero M, Carson A, Chen W, Cho E, Dallaire S, Freeman J, González J, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald J, Marshall C, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville M, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad D, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter N, Aburatani H, Lee C, Jones K, Scherer S & Hurles M. 2006. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 444(7118): 444-454.

- Sánchez S, Barajas G, Ramírez E, Moreno A & Barbosa O. 2004(a). Lupus eritematoso: enfermedad autoinmune sistémica y órgano específica. *Revista Biomédica*. 15(3): 173-180.
- Sánchez E, Rasmussen A, Riba L, Acevedo-Vasquez E, Kelly JA, Langefeld CD, William A, Ziegler J, Comeau M, Marion M, García-De La Torre I, Maradiaga-Ceceña M, Cardiel M, Esquivel-Valerio J, Rodriguez-Amado J, Moctezuma J, Miranda P, Perandones C, Castel C, Laborde H, Alba P, Musuruana J, Goecke I, Anaya JM, Kaufman K, Adler A, Glenn S, Brown E, Alarcón G, Kimberly R, Edberg J, Vilá L, Criswell G, Gilkeson G, Niewold T, Martín J, Vyse T, Boackle S, Ramsey-Goldman R, Scofield R, Petri M, Merrill J, Reveille J, Tsao B, Orozco L, Baca V, Moser K, Gaffney P, James J, Harley J, Tusié-Luna T, Pons-Estel B, Jacob Ch & Alarcón-Riquelme M. 2012(b). Impact of genetic ancestry and sociodemographic status on the clinical expression of systemic lupus erythematosus in American Indian–European populations. *Arthritis & Rheumatism*. 64(11): 3687-3694.
- Secretaría de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. Boletín Epidemiológico. 2013. ¿Qué es el Lupus Eritematoso?. 30(30): 2-4.
- Stichweh D & Pascual V. 2005. Lupus eritematoso sistémico pediátrico. *Anales de Pediatría*. 63(4): 321-329.
- Suárez M. 2010. Factores genéticos asociados con predisposición a Lupus Eritematoso Sistémico: Confirmación, efecto funcional, repercusión fenotípica y relación con la susceptibilidad a la Artritis Reumatoide. Tesis. (Doctora). Santiago de Compostela. España. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Medicina y Odontología. Departamento de Medicina.
- Suhani A & Harish P. 2011. Implications of gene copy-number variation in health and diseases. *Journal of Human Genetics*. 57(1): 6-13.
- Tabeta K, Hoebe K, Janssen E, Du X, George P, Crozat K, Mud S, Mann N, Sovath S, Goode J, Shamel L, Herskovits A, Portnoy D, Cooke M, Tarantino L, Wiltshire T, Steinberg B, Grinstein S & Bleuter B. 2006. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and

- signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nature Immunology*. 7(2): 156-164.
- Tsokos G. 2011. Systemic Lupus Erythematosus. *The New England Journal of Medicine*. 365(22): 2110-2121.
 - Uramoto M, Michet J, Thumboo J, Sunku J, O'Fallon M & Gabriel E. 1999. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis y Rheumatology*. 42(1): 46-50.
 - Vadillo E & Pelayo R. 2012. Los receptores tipo Toll en el desarrollo y función del sistema hematopoyético. *Revista de Investigación Clínica*. 5(64): 461-476.
 - Valencia-Pacheco G, Pinzón-Herrera J, Cruz-López J, Gamboa V, del Carmen L, Pavía-Ruiz N, Santos A, Sánchez S & Puerto F. 2013. Expression and activation of intracellular receptors TLR7, TLR8 and TLR9 in peripheral blood monocytes from HIV-infected patients. *Colombia Médica*. 44(2): 92-99.
 - Velázquez R, Jiménez S, Ramírez J, Aguilar I, Salas G, Baca V & Orozco L. 2012. Lupus eritematoso Sistémico (LES): genómica de la enfermedad. *Gaceta Médica de México*. 148: 371-380.
 - Wallace D. & Hahn B. 2013. *What is Lupus?*. En Dubois' Lupus Erythematosus and Related Syndromes. p.1. China: ELSEVIER.
 - Wakeland K, Liu K, Graham R & Behrens W. 2001. Delineating the genetics basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity*. 15(3): 397-408.
 - Webb R, Kelly J, Somers E, Hughes T, Kaufman K, Sanchez E, Nath S, Bruner G, Alarcón-Riquelme M, Gilkeson G, Kamen D, Richardson B, Harley J & Sawalha A. 2011. Early disease onset is predicted by a higher genetic risk for lupus and is associated with a more severe phenotype in lupus patients. *Annals of the rheumatic diseases*. 70(1): 151-156.
 - Willcocks C, Lyons A, Clatworthy R, Robinson I, Yang W, Newland A, Plagnol V, McGovern N, Condliffe M, Chilvers R, Adu D, Jolly C, Watts R, Lau L, Morgan W, Nash G & Smith G. 2008. Copy number of FCGR3B, which is associated with systemic lupus erythematosus, correlates with protein expression and immune complex uptake. *The Journal of Experimental Medicine*. 205(7): 1573-1582.

- Wong M & Tsao P. 2006. Current topics in human SLE genetics. *Springer Seminars in Immunopathology*. 28(2): 97-107.
- Yang Y, Chung K, Wu L, Savelli L, Nagaraja N, Zhou B, Hebert M, Jones N, Shu Y, Kitzmiller K, Blanchong A, McBride L, Higgins C, Rennebohm M, Rice R, Hackshaw V, Roubey A, Grossman M, Tsao P, Birmingham J, Rovin H, Hebert A & Yu Y. 2007. Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): Low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans. *The American Journal of Human Genetics*. 80(6): 1037-1054.

13. Apéndice 1.

Tabla 4. Clasificación de la variación genética en el genoma humano (Madrigal, 2008).

Tipo	Definición	Frecuencia en el Genoma Humano
Single Nucleotide Polimorphism (SNP)	Sustituciones de una base presentes en > 1 % en una población determinada	Más de 10 millones de SNPs
Variante de delección/inserción (InDel)	Delección o inserción de un segmento de DNA	Aprox. más de 1 millón de polimorfismos de inserción/delección > 1 pb
Microsatélite	Repeticiones múltiples de 1-6 pb	> 1 millón de microsatelites
Minisatélite y número de repeticiones en tandem (VNTRs)	Secuencias polimórficas de 20-50 copias de repeticiones de 6 a 100 pb	Aprox. 150 000 minisatélites
Variaciones en el Numero de Copias (CNVs)	Cambios numéricos > 1 Kb, presentes en > 1 % en una población determinada	Se estima que abarcan aproximadamente 12 % del genoma
Inversión	Reordenamientos que causan que un segmento de DNA esté presente en orientación inversa	Frecuencia estimada de inversiones microscópicamente visibles es de 0.12 a 0.7 % (pericéntricas); se desconoce la frecuencia de inversiones submicroscópicas