



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE SERVICIOS ESCOLARES DE
POSGRADO**

LONGITUD TELOMÉRICA Y PATRÓN DE INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X EN MUJERES CON ARTRITIS REUMATOIDE

TESIS

Que para obtener el grado de especialista en

GENÉTICA MÉDICA

presenta

ANGÉLICA BALDERRAMA RODRÍGUEZ

**TUTOR: DR. OSVALDO M. MUTCHINICK B.
ASESOR: M. en C. YEVGENIYA SVYRYD**



**INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO DE 2016



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

A mi Dios, Guía y Sustentador de mi alma.

A mi familia, presente en todos los momentos y circunstancias de mi vida, con profundo amor.

A mis amigos y colegas del Departamento de Genética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, sin los cuales la residencia médica no hubiese tenido el mismo significado para mí.

Al personal del Laboratorio de Citogenética y Biología Molecular, por su ayuda, interés por la enseñanza, sus palabras de ánimo y las interesantes pláticas de la vida ahí compartidas.

Con especial agradecimiento a mi asesora de tesis, Q.F.B. Yevgeniya Svryyd, por la invitación a participar en una etapa de este interesante proyecto, la amplia introducción a las técnicas de la Biología Molecular, sus invaluable consejos y todo su apoyo brindado para la culminación de mi tesis de especialidad.

A mis maestros, Dr. Osvaldo Mutchinick y Dra. Jazmín Arteaga, de quienes llevo excelentes muestras de profesionalismo y dedicación.

Finalmente, agradezco también el apoyo económico brindado por la Secretaría de Salud para el desarrollo de este trabajo de investigación, así como a la Fundación Carlos Slim para la Salud por su estímulo otorgado como becaria.

*Mas todo en torno
-horizontes de tierras y de mares-
todo, hasta el infinito,
se colmó de una esencia inmensa y viva.
César*

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
DEDICATORIA.....	3
ÍNDICE.....	4
ABREVIATURAS.....	7
1. ENFERMEDAD AUTOINMUNE: ETIOLOGÍA Y GENÉTICA.....	8
1.1 Definición y características generales.....	8
1.2 Factores de riesgo para autoinmunidad.....	10
1.3 Factores genéticos en la enfermedad autoinmune.....	10
1.3.1. Agregación familiar.....	11
1.3.2. Complejo mayor de histocompatibilidad.....	12
1.3.3. El cromosoma X y la enfermedad autoinmune.....	13
2. ARTRITIS REUMATOIDE.....	16
2.1 Genética de la artritis reumatoide.....	17
2.1.1 <i>HLA</i> y artritis reumatoide.....	17
2.1.2. Genes no- <i>HLA</i> y artritis reumatoide.....	18
2.2 Factores ambientales asociados con artritis reumatoide.....	20
3. INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X.....	22
3.1 El cromosoma X.....	22
3.2 Inactivación del cromosoma X.....	22
3.2.1. Centro de inactivación del cromosoma X.....	24
3.2.2. Control epigenético de la inactivación del cromosoma X.....	25
3.2.3 Genes que escapan a la inactivación.....	27
3.2.4. El cuerpo de Barr.....	27

3.3 Sesgo de inactivación del cromosoma X.....	29
3.4 Patrón de inactivación del cromosoma X en la enfermedad autoinmune.....	31
3.4.1 Artritis reumatoide juvenil.....	32
3.4.2 Enfermedad tiroidea autoinmune.....	32
3.4.3 Esclerosis sistémica.....	33
3.4.4. Escleroderma.....	33
3.4.5 Artritis reumatoide.....	32
3.5 Inactivación del cromosoma X en otras enfermedades.....	33
3.6 Heredabilidad del patrón de inactivación del cromosoma X.....	34
3.7 El patrón de inactivación del cromosoma X y la edad.....	35
4. TELÓMEROS E INMUNOSENESCENCIA.....	36
4.1 Estructura telomérica.....	36
4.2 Sistema telómero-telomerasa.....	37
4.3 Dinámica de la longitud telomérica.....	39
4.3.1 Cambios en la longitud telomérica asociados con la edad.....	40
4.3.2. Heredabilidad de la longitud telomérica.....	41
4.4 Longitud del telómero y la enfermedad autoinmune.....	42
4.4.1 Esclerosis múltiple.....	43
4.4.2 Artritis reumatoide.....	43
5. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	45
6. JUSTIFICACIÓN.....	47
7. HIPÓTESIS.....	48
8. OBJETIVOS.....	49
9. MATERIAL Y MÉTODOS.....	50

9.1 Selección de muestra y definición de los grupos de comparación.....	50
9.2 Obtención de muestras biológicas y extracción del DNA.....	51
9.3 Determinación del perfil de inactivación del cromosoma X.....	51
9.3.1 Descripción general y fundamento de la técnica.....	51
9.3.2 Restricción enzimática sensible a metilación.....	52
9.3.3 Amplificación por PCR de los fragmentos digeridos.....	53
9.3.4 Separación y cuantificación de fragmentos por electroforesis capilar.....	55
9.3.5 Cuantificación relativa de la proporción del cromosoma X inactivo.....	55
9.3.6 Corrección del área bajo la curva por el tartamudeo de la polimerasa.....	57
9.4 Determinación de la longitud relativa de los telómeros.....	59
9.4.1 Descripción general y fundamento de la técnica.....	59
9.4.2 Amplificación por MMqPCR.....	59
9.4.3 Cuantificación relativa del DNA telomérico.....	60
9.5 Análisis estadístico.....	61
10. RESULTADOS.....	63
11. DISCUSIÓN.....	80
12. CONCLUSIONES.....	89
13. BIBLIOGRAFÍA.....	91

ABREVIATURAS

AAPCC: Anticuerpos anti-péptidos citrulinados cíclicos
ACR: American College of Rheumatology
AR: Artritis reumatoide
AR1: Muestra inicial de mujeres con artritis reumatoide
AR2: Muestra de seguimiento de mujeres con artritis reumatoide
ARJ: Artritis reumatoide juvenil
AR-TE: Clínica de artritis temprana
CBP: Cirrosis biliar primaria
CTL1: Primer grupo de mujeres sin evidencia de enfermedad autoinmune
CTL2: Segundo grupo de mujeres sin evidencia de enfermedad autoinmune
DE: Desviación estándar
DMT1: Diabetes mellitus tipo I
DNA: Ácido desoxirribonucleico
EAI: Enfermedad autoinmune
EC: Epítipe compartido
EM: Esclerosis múltiple
ES: Esclerosis sistémica
ETAI: Enfermedad tiroidea autoinmune
EULAR: European League Against Rheumatism
FARME: Fármacos modificadores de la enfermedad
FR: Factor reumatoide
GS: Grado de sesgo
GW: Granulomatosis de Wegener
GWAS: Estudio de asociación de genoma completo
HLA: Antígeno leucocitario humano
ICX: Inactivación del cromosoma X
LEG: Lupus eritematoso generalizado
LINE: Elementos interespaciadores nucleares largos
LT: Longitud del telómero
LTR: Longitud telomérica relativa
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
PCR: Proteína C reactiva
PCR: Reacción en cadena de polimerasa
RNA: Ácido ribonucleico
sICX: Sesgo de inactivación del cromosoma X
SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido
TERT: Transcriptasa reversa telomerasa
TNF: Factor de necrosis tumoral
VSG: Velocidad de sedimentación globular
Xa: Cromosoma X activo
Xi: Cromosoma X inactivo
XIC: Centro de inactivación del cromosoma X

ENFERMEDAD AUTOINMUNE: ETIOLOGÍA Y GENÉTICA

1.1 Definición y características generales

El término autoinmunidad hace referencia a una reacción del sistema inmune contra antígenos propios, que procede de una falla en su correcto reconocimiento y tiene el potencial de llevar a un amplio espectro de enfermedades complejas: las enfermedades autoinmunes (EAI). Se conocen alrededor de ochenta EAI con una incidencia estimada de 80 por 100 000 personas al año y su prevalencia en conjunto se encuentra entre el 3-5% de la población mundial (*Cárdenas-Roldán et al, 2013*). La afectación multisistémica es común a las EAI pero el daño primario a órgano blanco caracteriza la enfermedad específica y sus manifestaciones clínicas. Las EAI son de etiología multifactorial donde tanto factores genéticos como ambientales están implicados en el inicio, progresión y mantenimiento de la autoinmunidad (*Bianchi et al, 2012*).

1.2 Factores de riesgo para autoinmunidad

Durante más de un siglo se conoce la mayor prevalencia de las EAI entre las mujeres respecto a los hombres; tal diferencia es evidente en la enfermedad tiroidea autoinmune (ETAI), el síndrome de Sjögren, la enfermedad de Addison, esclerosis sistémica (ES), lupus eritematoso generalizado (LEG) y cirrosis biliar primaria (CBP), trastornos donde más del 80% de los afectados son mujeres. En el caso de la artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM) y miastenia gravis, el género femenino corresponde a un 60-75% de los casos (*Libert et al, 2010*) (figura 1). Hay pocos ejemplos de EAI donde la proporción de hombres a mujeres es más alta, como el síndrome de Goodpasture (2-9:1) y la espondilitis anquilosante (2:1). De manera general, las EAI más prevalentes en la mujer se manifiestan clínicamente después de los 50 años en promedio y están asociadas con inflamación crónica mediada por anticuerpos (respuesta humoral Th2); en las

de mayor prevalencia en varones, la presencia de autoanticuerpos causa inflamación aguda y respuesta celular del tipo Th1 (Amur et al, 2012).

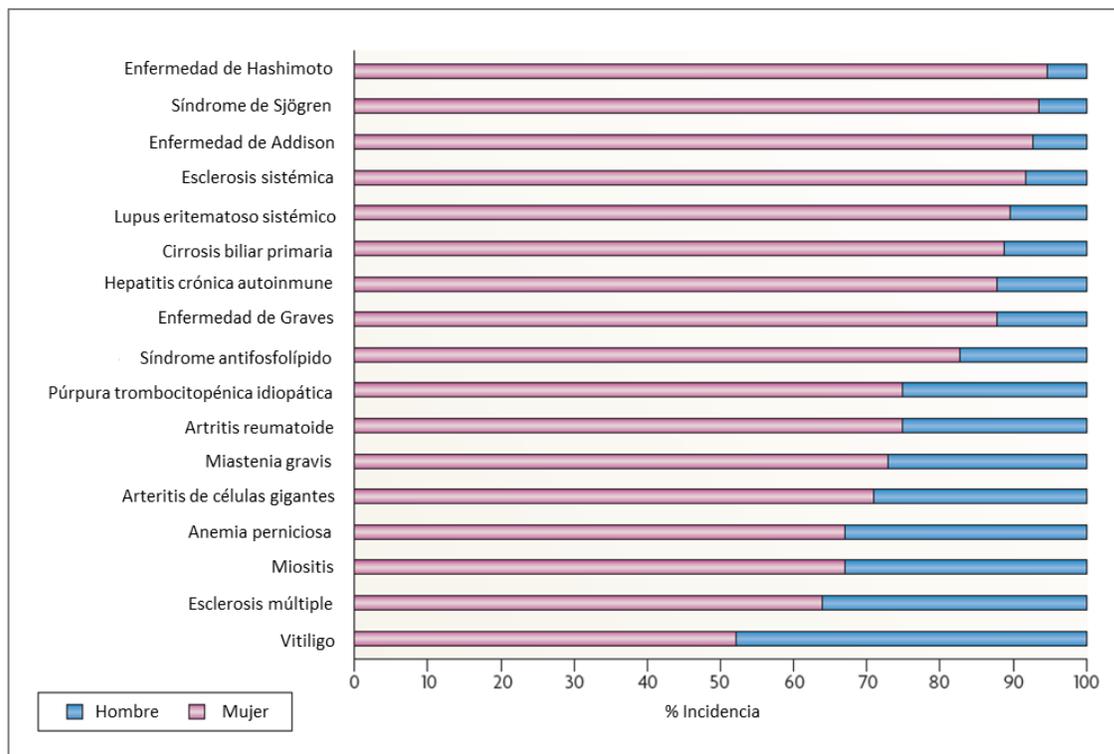


Figura 1. Distribución en ambos sexos de algunas EAI. Las enfermedades mostradas son aquellas con predominio en el sexo femenino. Modificado de *Libert et al, 2010*.

Las hormonas sexuales han sido consideradas factores en la susceptibilidad a la EAI por su papel en la inmunomodulación de la respuesta Th1/Th2. La influencia de los cambios hormonales en el curso de la enfermedad está documentada en el embarazo: la gravedad de la EM y la AR disminuyen, mientras que el LEG se exagera durante la gestación (Amur et al, 2012). Los estrógenos son las hormonas más estudiadas en el contexto de la inmunidad y su relación con la EAI es compleja, en el LEG inducen la maduración de células B, la producción de anticuerpos y la respuesta Th2; mientras que en la EM y la AR, ejercen un papel protector contra la actividad de la enfermedad, promoviendo una transición de la respuesta Th1 (patogénica en estas EAI) a la Th2. Por su parte, los andrógenos estimulan la producción de interleucina 2 (IL-2) y aumentan la activación de células T CD8+, potenciando así la respuesta Th1; la testosterona

puede suprimir la producción de anticuerpos anti-DNAs y una disminución en sus niveles séricos se ha confirmado en pacientes con LEG (*Pennell et al, 2012*).

Los estrógenos pueden influir la maduración de los linfocitos, su activación y síntesis de anticuerpos y citocinas, así como la presentación de antígenos, su efecto puede ser tanto proinflamatorio como antiinflamatorio. Estudios que comparan perfiles hormonales, paridad o el uso de terapias hormonales entre mujeres con EAI y controles han sido negativos o no concluyentes para una asociación de riesgo. El inicio de la EAI a diferentes edades y la inconsistencia de los estudios que han evaluado el efecto de la terapia hormonal de reemplazo en el curso de la enfermedad debilitan la teoría de las hormonas sexuales como causa de la discrepancia en la frecuencia de la EAI entre ambos sexos (*Selmi, 2008*).

La respuesta inmune inadecuada a infecciones virales o toxinas bacterianas ha sido propuesta como evento iniciador de la autoinmunidad, por ejemplo, una mayor incidencia de periodontitis por *Porphyromonas gingivalis* ha sido asociada significativamente con AR (*Mikuls et al, 2014*). Otros estudios que han estudiado asociación entre historia o evidencia serológica de infecciones con la EAI no han encontrado relación significativa (*Lockshin, 2006*).

Durante el embarazo, células maternas y fetales son intercambiadas llevando a persistencia de células fetales (microquimerismo) en la madre. Estas células quiméricas serían reconocidas por el sistema inmune en una reacción semejante a la enfermedad injerto contra huésped pero incluyendo antígenos propios. El microquimerismo fetal se identificó en células mononucleares periféricas de pacientes con ES con mayor frecuencia que en controles, aunque otro estudio mostró que este hallazgo puede ser frecuente en mujeres sanas (*Selmi, 2008*).

1.3 Factores genéticos en la enfermedad autoinmune

Está establecido que los factores genéticos contribuyen a la susceptibilidad al desarrollo de las EAI. Lo anterior se basa en las observaciones de las tasas de

concordancia en gemelos monocigóticos mayores que en dicigóticos (tabla 1), la agregación familiar que muestran las EAI y estudios de asociación con alelos de riesgo en diferentes poblaciones (*Amur et al, 2012*).

ENFERMEDAD AUTOIMUNE	SEXO (F:M)	PREVALENCIA (TASA POR 100 000)	TASA CONCORDANCIA GEMELOS MONOCIGÓTICOS	TASA CONCORDANCIA GEMELOS DICIGÓTICOS
Tiroiditis/Hipotiroidismo	18:1	792	64-65% (55% Ac TPO)	13-35% (0% Ac TPO)
Esclerosis sistémica	12:1	4	4-5%	4-5%
Lupus eritematoso generalizado	9:1	2-7.6	24-57%	2-5%
Enfermedad de Graves	7:1	1151	17-36%	0-4%
Esclerosis múltiple	3:1	58	30-35%	0-5%
Artritis reumatoide	3:1	860	12-15%	3-4%
Enfermedad celiaca	2:1	39	75-83%	11%
Psoriasis	1:1	79	70%	20%
Diabetes mellitus tipo 1	1:1	192	32-50%	5-6%
Vitiligo	1:1	400	23%	0%

Tabla 1. Prevalencia y heredabilidad de las EAI. Ac TPO: anticuerpos anti-tiroperoxidasa. Modificado de *Amur et al, 2012*.

1.3.1 Agregación familiar

Una característica primaria de las enfermedades multifactoriales, es que tienen agregación familiar, expresada en un riesgo de recurrencia o lambda (λ). La agregación de un fenotipo se observa cuando una enfermedad ocurre con mayor frecuencia en los familiares de un individuo afectado comparada con la frecuencia observada en la población general. Cárdenas-Roldán y cols (2013), realizaron una revisión sistemática de la literatura con respecto a la agregación familiar de las EAI e hicieron un meta-análisis de los datos, sus resultados apoyan la teoría de un trasfondo genético común para las EAI, la llamada tautología autoinmune (*Cárdenas-Roldán et al, 2013*) (tabla 2).

Condiciones como la poliautoinmunidad (presencia de dos o más EAI en un mismo paciente), la autoinmunidad familiar (dos o más EAI en miembros de una familia nuclear), EAI familiar (presencia de una EAI en más de un miembro de la

familia) y el síndrome autoinmune múltiple (presencia de tres o más EAI en un mismo paciente), indican que factores genéticos, epigenéticos y ambientales similares influyen en el desarrollo de las EAI (Cárdenas-Roldán et al, 2013).

AGREGACIÓN FAMILIAR DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES															
EAI en probandos															
EAI FPG	DT1			ETAI		LEG				AR			EM		
	EUA	Colombia	España	Reino Unido	EUA	EU	Latino américa	Holanda	EUA	EUA	Reino Unido	EUA	EUA	EUA	Australia
ETAI	11.11	2.4	4.6			21.7	16	20	14.7	3.9	4.81		13.28		
DT1		13.5		7.53	78.9	39.7		12.53	30.9	14.49			74	93.2	49.65
AR			0.9	7.41	22.5	16.98	64	28.57				2.0	7.8	18.7	20.75
LEG	46.2	13.35		5.71	31.25			595	163.4				390	225	471
VIT		0.8	2.75	1.6											4.72
EM				7.61	86.2	130		164	67.6						
MG				9.13						9.17					
EII			0.89	1.25	30	4.2			21.79			4.44	24		15.09
PSO	14.8		1.6			10			15.69			2.67	25		33.9
SS								7.9							
EsA										2.29					56.6
ES							500	595							471

Tabla 2. Agregación familiar (λ) de las EAI. La fila superior presenta la EAI en los probandos mientras que la primera columna muestra la EAI en familiares de primer grado (FPG). Los números corresponden al cálculo de λ ($\lambda > 1$ indica agregación familiar). *DT1: diabetes tipo 1, ETAI: enfermedad tiroidea autoinmune, LEG: lupus eritematoso generalizado, AR: artritis reumatoide, EM: esclerosis múltiple, VIT: vitiligo, MG: miastenia gravis, EII: enfermedad inflamatoria intestinal, PSO: psoriasis, SS: síndrome de Sjögren, EsA: espondilitis anquilosante, ES: esclerosis sistémica.* Modificado de Cárdenas-Roldán et al, 2013.

1.3.2 Complejo mayor de histocompatibilidad

El complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) es una región de aproximadamente 3.6 Mb localizada en el locus 6p21.31, tiene la mayor densidad de genes en el genoma humano y se considera que más del 20% de sus 421

genes identificados tienen un papel en la regulación inmunitaria, incluidos los genes de los antígenos leucocitarios humanos (*HLA*) (*Amur et al, 2012*).

Los genes *HLA-A*, *C* y *B* codifican para las cadenas pesadas HLA-A, C y B y el gen *B2M*, localizado en el cromosoma 15, codifica para la cadena ligera de la β 2-microglobulina. Los genes *DRA1*, *DRB1* (y adicionalmente *DRB3*, *DRB4* y *DRB5* en algunos haplotipos), *DQA1*, *DQB1*, *DPA1* y *DPB1* codifican para las cadenas α y β de las moléculas HLA-DR, DQ y DP, respectivamente. *HLA* es hiperpolimórfico y más de 12 000 alelos distintos en estos genes han sido identificados. Estudios de las frecuencias de los alelos *HLA* han revelado asociaciones con más de 100 enfermedades, entre las que se incluyen las que confieren susceptibilidad a infecciones y EAI como las resumidas en la tabla 3 (*Furukawa et al, 2015*).

Enfermedades asociadas con HLA		
Enfermedad	HLA	RR
Síndrome de Reiter	B27	37
Espondilitis anquilosante	B27	106
Tiroiditis de Hashimoto	B47	15
Esclerosis múltiple	DR2	5
Artritis reumatoide	DR4	4
Diabetes mellitus tipo 1	DR3/DR4	3-6
Enfermedad celiaca	DR3/DR5/DR7	30

Tabla 3. Asociaciones de alelos HLA con la EAI. *RR: riesgo relativo.*

1.3.3 El cromosoma X y la enfermedad autoinmune

Las diferencias cromosómicas son posibles razones para la discrepancia entre los sexos en la prevalencia de la EAI. Análisis clínicos y experimentales han aportado evidencia sobre la relación de los cromosomas sexuales y la inmunidad (*Lockshin, 2006*). Muchos de los genes del cromosoma X están involucrados en la respuesta inmune; mutaciones en algunos de éstos se han identificado como causa de inmunodeficiencias ligadas al X. Mutaciones en el gen de la tirosina

cinasa *BTK* resultan en agammaglobulinemia ligada al X, las que alteran la cadena gamma del receptor de IL-2 se asocian con inmunodeficiencia combinada grave ligada al X y mutaciones en el gen *FOXP3* se encuentran en el síndrome de disregulación inmune, poliendocrinopatía y enteropatía ligado al X (*Pennell et al, 2012*).

La hipótesis de la haploinsuficiencia sugiere que la pérdida de algunos genes ligados al X resulta en EAI. Una observación de particular interés para esta teoría es que las condiciones con alteraciones mayores del cromosoma X, como el síndrome de Turner o la falla ovárica prematura, se caracterizan por comorbilidades autoinmunes en una significativa proporción de los casos. En el síndrome de Turner, con ausencia total o parcial de uno de los cromosomas X, hay un incremento en el riesgo de desarrollar ETAI y enfermedad inflamatoria intestinal (*Libert et al, 2010*).

Adicionalmente y apoyando la hipótesis de la haploinsuficiencia, se ha reportado una mayor frecuencia de monosomía adquirida del X en células mononucleares de sangre periférica en mujeres con ES y otras EAI órgano-específicas como la CBP y la ETAI en comparación con controles pareadas por edad (*Bianchi et al, 2012; Selmi, 2008*). La monosomía adquirida del X fue observada en mayor porcentaje entre pacientes con síndrome de Reynolds, enfermedad de sobreposición autoinmune de CBP y ES, con respecto a lo que se esperaría por efecto de la edad (*Svyryd et al, 2012*). Se ha propuesto que el estado hemicígote que resulta de la monosomía del cromosoma X enmascara haplotipos particulares involucrados en la susceptibilidad a la autoinmunidad, teoría sustentada en la pérdida preferencial del X materno en linfocitos periféricos de pacientes con escleroderma (*Selmi, 2008*).

Está documentado que en los pacientes con síndrome de Klinefelter aumenta la incidencia de LEG, espondilitis anquilosante y síndrome de Sjögren (*Selmi, 2008*). Se ha propuesto también que el escape a la inactivación del X (o

reactivación de genes ligados al X inactivo) afecte la respuesta inmune; por ejemplo, un estudio encontró que el gen del ligando CD40 está hipometilado en mujeres con LEG en contraste con su expresión normal en linfocitos periféricos, la inhibición farmacológica de la metilación del DNA lleva al desarrollo de una enfermedad semejante al LEG en modelos animales y en otro estudio se encontró que la metilación global del DNA estaba reducida en pacientes con LEG con respecto a controles (*Desai-Mehta et al, 1996; Selmi, 2008; Bianchi et al, 2012*). Estos datos complementan las observaciones con respecto a que la dosis génica del cromosoma X es crítica para el desarrollo de la autoinmunidad.

Enfermedad autoinmune	Asociación de EAI con sICX	Asociación de EAI con MCX	Región del cromosoma X	Genes ligados al X
Cirrosis biliar primaria	NS	P <0.0001	ND	ND
Esclerosis sistémica	P <0.0001	P <0.0001	Xq11.23, Xq28	TIMP1, IRAK1
Enfermedad tiroidea autoinmune	P 0.003 a <0.0001	P <0.0001	Xp11.23	FOXP3
Lupus eritematoso generalizado	NS	NS	Xq26, Xq28	CD40LG, IRAK1
Artritis reumatoide	P <0.0001	ND	Xq11.23, Xq28	TIMP1, IL9R
Enfermedad de Crohn	ND	ND	Xq11.23	TIMP1

Tabla 4. El cromosoma X y la EAI. *sICX*: sesgo de inactivación del cromosoma X, *MCX*: monosomía del cromosoma X, *ND*: datos no disponibles, *NS*: no significativo. Modificado de *Selmi, 2008*.

Los cambios epigenéticos representan modificaciones estables y heredables que no alteran la secuencia del DNA; se llevan a cabo por mecanismos como la metilación del DNA o la modificación de histonas y pueden presentarse tanto en el desarrollo normal como en la enfermedad. Se trata de cambios reversibles e influidos por factores ambientales y la edad. La prevalencia de las EAI en la mujer puede estar influida, al menos en parte, por el fenómeno de inactivación del cromosoma X (ICX), una modificación epigenética que toma lugar únicamente en individuos con dos o más cromosomas X (*Amur et al, 2012*).

ARTRITIS REUMATOIDE

La AR es una poliartritis inflamatoria crónica de carácter autoinmune que destruye progresivamente articulaciones sinoviales, causando complicaciones sistémicas y que reduce la esperanza de vida entre 3 a 18 años (*Costenbader et al, 2011*). Se conoce que una respuesta inadecuada a la presentación antigénica a las células T ocasiona la reacción multisistémica contra proteínas articulares como el colágeno tipo II. Marcadores biológicos como el factor reumatoide (FR) y los anticuerpos anti-péptidos citrulinados cíclicos (AAPCC) son ejemplos de autoanticuerpos séricos dirigidos a proteínas no articulares que pueden ser detectados aún antes de las manifestaciones clínicas (*Klareskog et al, 2014*).

El diagnóstico de la AR es clínico, aplicándose los criterios del American College of Rheumatology (ACR) de 1987 o los nuevos criterios de 2010 del ACR/EULAR (European League Against Rheumatism) modificados para la identificación de sinovitis temprana con mayor especificidad (*Gibofsky, 2012*). El sitio primario de daño tisular son las articulaciones sinoviales, pero las manifestaciones sistémicas que incluyen la fibrosis pulmonar o aterosclerosis son frecuentes causas de mortalidad en la AR. Las mujeres tienen 2 a 3 veces más riesgo de desarrollar AR que los hombres y 3 veces más riesgo de enfermedad rápidamente progresiva e incapacitante (*Pennell et al, 2012*).

La prevalencia de la AR es distinta en los diferentes grupos étnicos, alrededor de 1% en europeos, 0.5% en poblaciones asiáticas y africanas y en más del 2% en algunas poblaciones amerindias. Estas diferencias pueden ser explicadas en parte por las diferentes frecuencias de alelos de riesgo, aunque los efectos de factores ambientales no pueden ser excluidos (*Furukawa et al, 2015*). La prevalencia de la AR en la mujer es mayor entre los 20 y 40 años de edad, la proporción M:H cambia con la edad, disminuyendo a 2:1 en el grupo de 55-64 años y se invierte después de los 75 años (*Amur et al, 2012*).

2.1 Genética de la artritis reumatoide

Hay evidencia extensa del papel de los factores genéticos en la AR. La tasa de concordancia en gemelos monocigóticos es de 12-15%, cuatro veces más alta que en dicigóticos (3-4%), con una heredabilidad estimada de 60-68%. La asociación de la AR con el *HLA* ha sido reportada desde hace aproximadamente 40 años. A la fecha más de 100 loci de riesgo para AR han sido identificados, incluyendo los resultados de estudios de asociación de genoma completo (GWAS). Todos los factores genéticos de riesgo conocidos se estima que contribuyen con un 16% del riesgo para AR, 11% del cual se debe al *HLA* (Furukawa et al, 2015).

2.1.1 *HLA* y artritis reumatoide

Varios estudios han reportado que polimorfismos en el locus *HLA-DRB1* están asociados con diferentes EAI, incluyendo AR. En la mayoría de los grupos étnicos, estos alelos son *DRB1*04:01*, **04:04*, **04:05*, **01:01* Y **10:01*, los cuales comparten secuencias de aminoácidos en las posiciones 70-74 de la tercera región hipervariable de la cadena *HLA-DRβ*; estas secuencias se denominan epítopes compartidos (EC) (Furukawa et al, 2015).

DRB1 es considerado un gen principal en la susceptibilidad para AR. Ciertas combinaciones de alelos *DRB1* confieren un mayor riesgo, como la heterocigosidad para **04:01/*04:04* o **04:05/*09:01*. Otros alelos como *DRB1*13:01* y **13:02* son asociados negativamente con AR en poblaciones europeas y del este de Asia, respectivamente. El efecto protector de estos alelos *DRB1*13* es dominante sobre el efecto de susceptibilidad de los alelos del EC en los heterocigotos *DRB1* (Amur et al, 2012).

Los AAPCC están presentes en 70-80% de los pacientes con AR. Aunque el FR y los AAPCC son encontrados frecuentemente en el mismo paciente, la especificidad de los AAPCC es más alta por lo que se considera puedan tener algún papel en la patogénesis de la AR. La contribución de los alelos EC a la

varianza genotípica ha sido estimada en 40% para la AR AAPCC positiva y de 2% para la AR AAPCC negativa (*Amur et al, 2012*). Se piensa que los péptidos citrulinados son autoantígenos presentados por los alelos EC durante el desarrollo de la enfermedad (*Furukawa et al, 2015*).

2.1.2 Genes no-HLA y artritis reumatoide

Casi treinta años después de la designación de los alelos HLA como factores de riesgo para AR, un gran número de asociaciones con genes de susceptibilidad fuera del MHC se han reportado recientemente. La mayoría de los estudios de GWAS se han realizado en individuos con ancestría europea, algunos estudios en pacientes asiáticos han identificado loci de riesgo que muestran diferencias en su asociación con la AR entre las dos poblaciones (*Amur et al, 2012*).

TNF- α . Genes no-HLA dentro del MHC también han sido estudiados en búsqueda de asociación con AR. Los genes del factor de necrosis tumoral (TNF) se encuentran en la región de clase III del MHC, a unas 250 kb centroméricas del locus de *HLA-B* y a 850 kb teloméricas de *HLA-DR*. Hasta ahora, cinco polimorfismos de *TNF- α* se han descrito, situados en la región más interna del gen que es primordial para la regulación transcripcional (*Vasanth et al, 2014*). Consistente con el beneficio del tratamiento biológico anti-TNF en la AR, se ha encontrado sobreexpresión de éste en el tejido sinovial, pero estudios de microarreglos en tejido o GWAS no han encontrado asociaciones significativas (*Cho y Feldman, 2015*).

PADI4. Este gen localizado en 1p36, codifica la enzima peptidilarginino deiminasa tipo 4, la cual cataliza la modificación transcripcional de la arginina a citrulina, produciendo proteínas citrulinadas. Un meta-análisis de 34 estudios y 28 artículos de diferentes poblaciones encontró que el polimorfismo PADI4e94G/A se asoció significativamente con AR (OR 0.891, IC 95% 0.833-0.954, $P=0.001$), y esta

asociación fue mayor en asiáticos cuando se clasificó por etnicidad (OR 0.824, IC 95% 0.759-0.894, $P<0.001$) (Yang et al, 2015).

PTPN22. El gen *PTPN22* es un atractivo candidato biológico en la etiología de la EAI, se expresa en tejidos inmunológicamente relevantes y codifica para LYP, una tirosina fosfatasa linfoide intracelular, jugando un papel crucial en la transducción de señales del receptor de células T (TCR). Las tirosina fosfatasas linfoides han mostrado *per se* un efecto inhibitor en la activación de las células T (Vasanth et al, 2014). El polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs2476601 (c.1858C>T, p.R620W) del gen *PTPN22* altera la interacción de LYP con la tirosina cinasa c-Src (Csk) suprimiendo la activación de las células T, por lo que se piensa predispone al desarrollo de la EAI. Un meta-análisis que comparó diferentes estudios respecto a la contribución del alelo rs2476601 a la susceptibilidad a la AR encontró el alelo T significativamente asociado con AR en europeos (OR 1.646, IC 95% 1.554-1.743, $P<0.001$), africanos (OR 3.685, IC 95% 1.020-13.312, $P=0.047$) y asiáticos (OR 3.573, IC 95% 1.534-8.323, $P=0.003$). No obstante, el genotipo TT se asoció significativamente con AR en europeos (OR 2.595, IC 95% 2.061-3.266, $P<0.001$), pero no en africanos ni asiáticos (OR 3.918, IC 0.611-25.108, $P=0.150$ y OR 3.350, IC 95% 0.135-82.969, $P=0.460$, respectivamente) (Elshazli y Settin, 2015).

STAT4. El transductor de señales y activador de la transcripción 4 codificado por el gen *STAT4* es otra molécula asociada con la AR. La vía JAK/STAT es blanco de señales de muchas citocinas importantes en la inflamación sinovial. Específicamente STAT4 transmite señales inducido por citocinas clave como IL-12, IL-23 e IFN- γ (Vasanth et al, 2014). Un meta-análisis del polimorfismo STAT4 rs7574865 G/T mostró asociación entre el alelo T y AR (OR 1.313, IC 95% 1.232-1.398, $P<0.001$); después de la estratificación por etnicidad, se encontró significativamente asociado con AR en europeos (OR 1.285, IC 95% 1.159-1.425, $P<0.001$), africanos (OR 1.871, IC 95% 1.489-2.350, $P<0.001$) y asiáticos (OR 1.271, IC 95% 1.199-1.348, $P<0.001$) (Elshazli y Settin, 2015).

TRAF1-C5. Los genes del factor 1 asociado a receptor de TNF (*TRAF1*) y del componente del complemento 5 (*C5*), localizados en el cromosoma 9, son miembros de la familia TRAF, un grupo de proteínas adaptadoras que se unen a miembros de la familia de receptores de TNF río abajo de la señalización. Interesantemente, homocigotos GG para el SNP de *TRAF1-C5* rs3761847 con AR se relacionaron con riesgo de muerte incrementado por malignidad o sepsis (HR 3.96, IC 95% 1.24-12.6, $P=0.02$) (*Vasanth et al, 2014*).

CD244. Recientes estudios en los mecanismos moleculares de miembros de la familia de moléculas activadoras de linfocitos, como CD244, han propuesto un papel crítico de estas en la EAI. El gen del cluster de diferenciación 244 (*CD44*) se localiza en 1q23.1; un estudio en japoneses identificó dos SNPs como alelos de susceptibilidad, encontrándolos asociados con un aumento de 1.5-1.7 veces de la expresión de *CD244* (*Vasanth et al, 2014*).

Cromosoma 6q23. Dos SNPs, rs6920220 (alelo A) y rs10499194 (alelo C) en este locus, se encontraron asociados independientemente con enfermedad AAPCC positiva. Ambos SNP se encuentran en una región que carece de genes o transcritos conocidos. El alelo A fue identificado originalmente en pacientes con AR AAPCC positiva (alelo menor OR=1.38) en Reino Unido. El alelo C fue identificado en población norteamericana (*Vasanth et al, 2014*).

2.2 Factores ambientales asociados con artritis reumatoide

El único factor de riesgo ambiental con asociación consistente con AR es el tabaquismo. Se conoce actualmente que los factores de riesgo difieren entre subtipos serológicos y está demostrada la asociación selectiva del tabaquismo con la AR seropositiva para FR y/o AAPCC (*Yarwood et al, 2014*). Un estudio de casos y controles en Dinamarca encontró asociación significativa con AR tanto del antecedente de tabaquismo como tabaquismo actual (OR 1.57, IC 95% 1.13-2.19

y OR 1.8, IC 95% 1.37-2.36, respectivamente), tal riesgo incrementa proporcionalmente con el número de paquetes-año fumados (OR 1.93, IC 95% 1.4-2.68 para más de 20 paquetes año) (*Pedersen et al, 2006*).

En el estudio citado la edad de menarca tardía se asoció con incremento de riesgo para AR (OR 1.87, IC 95% 1.23-2.85), las mujeres con menarca ≥ 15 años tuvieron el doble riesgo comparado con ≤ 12 años ($P=0.002$). El consumo de alcohol hasta 10 años antes de la entrevista y la ingesta de vino mostraron una asociación inversa dosis-respuesta con el riesgo de AR (consumo de alcohol negado OR 1.34, IC 95% 0.93-1.93; 5-10 bebidas por semana OR 0.95, IC 95% 0.7-1.3; 10-15 bebidas por semana OR 0.8, IC 95% 0.52-1.24; más de 15 bebidas por semana OR 0.79, IC 95% 0.53-1.17). Cuando se hizo la dicotomización por AR seropositiva y seronegativa para AAPCC se encontró que el tabaquismo y el consumo de alcohol estuvieron asociados selectivamente con la AR AAPCC positiva, el primero positivamente ($P=0.03$) y el segundo inversamente ($P=0.01$). Los individuos con obesidad 10 años previos a la entrevista (IMC ≥ 30) mostraron 3 veces más riesgo para AR seropositiva a AAPCC que individuos con IMC normal (OR 3.45; IC 95% 1.73-6.87). La edad de la menarca fue el único factor de riesgo estadísticamente significativo en ambos subtipos serológicos de AR ($P=0.01$) (*Pedersen et al, 2006*).

Los resultados del seguimiento de una cohorte en el Reino Unido para nuevos casos de poliartritis inflamatoria, reporta también la asociación con el tabaquismo (incremento de 20% de riesgo por cada 10 paquetes-año fumados) y el factor protector del consumo de alcohol (HR ajustado 0.86, IC 95% 0.74-0.99) para AR seropositiva. Las mujeres que tuvieron dos o más hijos mostraron asociación de riesgo en relación a las nulíparas (HR ajustado 2.81; IC 95% 1.37-5.76), mientras que la lactancia (HR ajustada 0.66; IC 0.46-0.94 por año de lactancia) mostró una asociación inversa dosis dependiente con AR (*Lahiri et al, 2014*).

INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X

3.1 El cromosoma X

Se considera que los cromosomas sexuales X y Y derivan de un autosoma ancestral común; desde entonces el cromosoma Y ha disminuido en tamaño (a 60 Mb) y en número de genes (aproximadamente 100), mientras que el cromosoma X ha incorporado genes de los autosomas contando con 155 Mb que contienen 1098 genes y 700 pseudogenes. En las regiones distales de X y Y permanecen regiones homólogas que tienen lo suficiente en común para recombinar durante la meiosis (regiones pseudoautosómicas). El cromosoma X contiene un 5% de los genes activos en humanos y es consistente a través de los genomas de mamíferos. La tabla 5 enlista características del X en comparación con otros cromosomas (*Brooks, 2010*).

	DETALLES
Contenido G + C	39% versus 41% promedio en el genoma. En la PAR1 es 48%
Islas CpG	5.25 por Mb versus ≈ 10 por Mb promedio en el genoma.
Alu SINEs	8.23% versus 10.6% promedio en el genoma. La PAR1 es 28.88% Alu
LINES	29% versus 17% promedio en el genoma. Su contenido es el 33.5% en la XCR pero 6.97% en la PAR1.
Heterocigosidad	El cromosoma X es 57% heterocigoto en relación al promedio del genoma.
SNPs	153, 146 SNPs, 901 de los cuales son no sinónimos en regiones codificantes
Pares de bases	155 Mb, siendo entre los cromosomas el octavo más grande del genoma humano
Genes	Tiene 1098 genes, con una densidad más baja que el promedio del genoma.
Pseudogenes	Tiene 700 pseudogenes.
XAR	Región añadida del X, contiene secuencias de DNA incorporadas desde la divergencia de los cromosomas X y Y de un autosoma ancestral común.
XCR	Región conservada del X, contiene secuencias de DNA que se cree permanecen del autosoma ancestral común.

Tabla 5. Características del cromosoma X. *PAR1: región pseudoautosómica 1, SINEs: elementos nucleares interespaciadores cortos, LINES: elementos nucleares interespaciadores largos.* Modificado de *Brooks, 2010*.

3.2 Inactivación del cromosoma X

La ICX es el silenciamiento al azar de uno de los cromosomas X en las células somáticas femeninas de mamíferos, un mecanismo que equilibra la expresión de

los genes ligados al X en ambos sexos (*Bhatnagar et al, 2014*). En 1960, Ohno y Hauschka mostraron que en las células de varios tejidos de hembras de ratón uno de los cromosomas X era heteroploide. Esta evidencia citológica y otras observaciones llevaron a Mary Lyon en 1962 a formular la hipótesis que tal cromosoma X estaba genéticamente inactivo, pudiendo ser de origen materno o paterno, siendo la inactivación un evento temprano en la vida embrionaria (*Lyon, 1962*). Confirmada esta hipótesis conocemos ahora que este silenciamiento inicia en el estadio de las cuatro células y se establece en las células de la masa celular interna del blastocisto, teniendo ambos cromosomas X, paterno o materno, la misma probabilidad de ser inactivados. Una vez establecida la ICX es estable: el mismo cromosoma X permanece inactivo en las generaciones celulares subsecuentes. Como resultado cada mujer es un mosaico de células en las cuales un cromosoma X, heredado del padre o de la madre, se encuentra inactivo (*Panning, 2008*). El establecimiento y mantenimiento de la ICX en la vida embrionaria, fetal y postnatal se esquematiza en la figura 2.

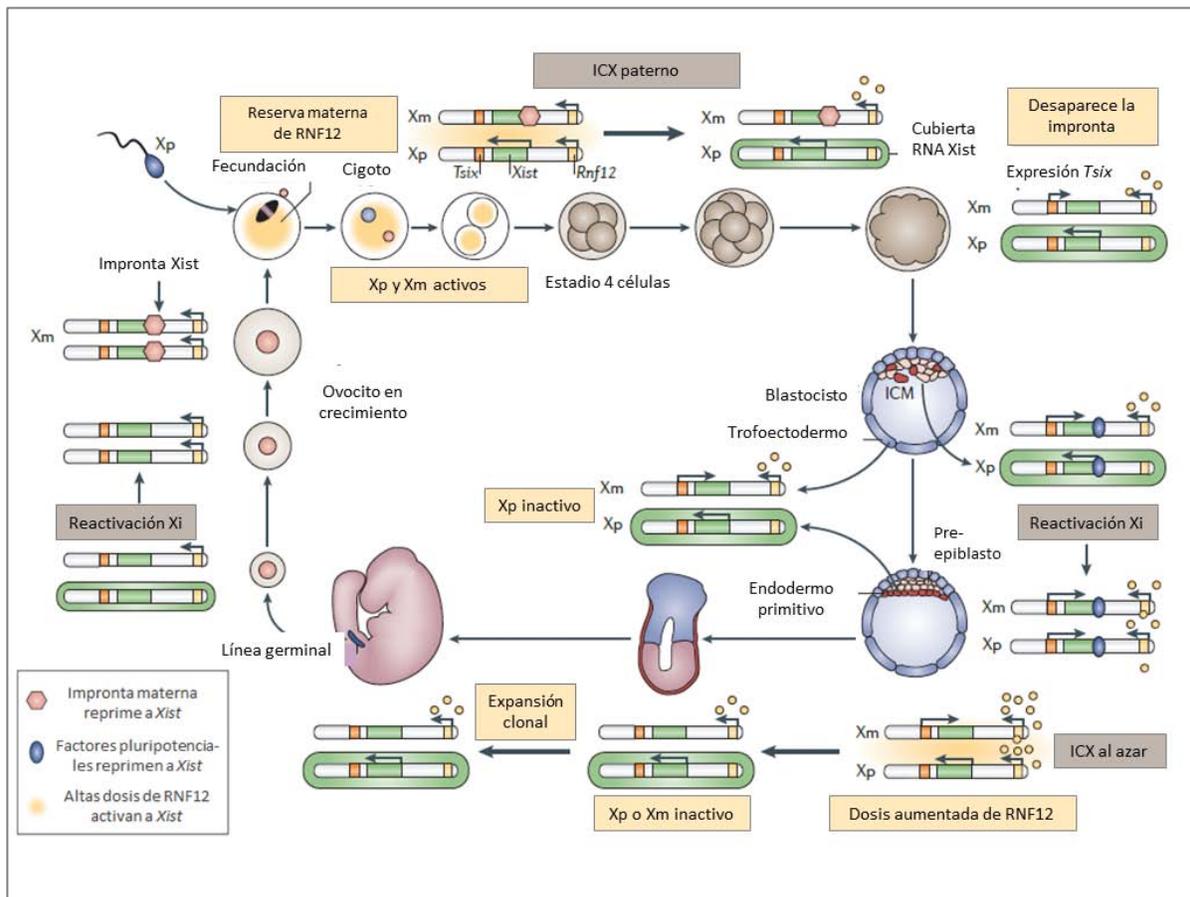


Figura 2. El ciclo de la ICX en embriones murinos. La ICX inicia en el estadio de cuatro células, visto en la parte central de la figura. Inicialmente es improntada, con inactivación preferencial del cromosoma X paterno (Xp), que permanece inactivo en los tejidos extraembrionarios (trofoectodermo y placenta) pero es reactivado en las células de la masa celular interna (ICM) del blastocisto que dará lugar al embrión. Una segunda fase

aleatoria de inactivación ocurre en la ICM, desde donde la ICX es mantenida y transmitida a través de las divisiones celulares somáticas, pero el Xi es reactivado durante la formación de la línea germinal femenina. La impronta y la ICX son dependientes de *Xist* y en ambos se ha visto involucrada la proteína RING finger 12 (*Rnf12*). Una reserva materna de *Rnf12* se requiere para el inicio de la impronta del Xp y dos copias de *Rnf12* son necesarias durante la ICX al azar. *Modificado de Augui et al, 2011.*

3.2.1 Centro de inactivación del cromosoma X

Estudios en ratones han proporcionado mucho de nuestro conocimiento sobre la ICX, por la conservación entre ambas especies de este mecanismo estos hallazgos se aplican a la especie humana. A través del estudio de translocaciones y deleciones se identificó el centro de inactivación del cromosoma X en ratones (*Xic*) y en humanos (*XIC*) en Xq13 (*Panning, 2008*). El *XIC* humano es un locus donde se sobrelapan genes sentido y antisentido codificantes de macroRNAs que interactúan en *cis* al inicio de la ICX (figura 3). El principal gen de interés es el transcrito específico de la inactivación del X (*XIST* en humanos, en el ratón *Xist*). El gen *XIST* tiene aproximadamente 35 kb y muestra splicing alternativo con transcritos de hasta 19.3 kb, permanece en el núcleo y no codifica para proteínas (*Brooks, 2010*). *Xist* es regulado negativamente por el RNA antisentido *Tsix* y positivamente por el RNA *Jpx*. También es controlado positivamente por un transcrito interno de 1.6 kb, *RepA*, que comparte el motivo “repetido A” con el RNA *Xist* (*Sarma et al, 2014*).

En la cadena antisentido a *Xist* se encuentra el gen *Tsix*. Antes del inicio de la ICX las células embrionarias murinas expresan tanto *Xist* como *Tsix* en ambos cromosomas X, siendo mayor la expresión de *Tsix*. En presencia de *Tsix*, la cromatina se enriquece con histona H3 metilada en la lisina 4 (H3K4me), un marcador de genes activos (*Brooks, 2010*).

Una vez que la inactivación ha iniciado, *Xist* y *Tsix* son diferencialmente regulados en el X que estará activo (Xa) y en el inactivo (Xi). En el Xi el transcrito de *Xist* se disemina en *cis* desde su sitio de síntesis hasta cubrir el cromosoma Xi

y establecer el silenciamiento transcripcional. Concomitantemente a la diseminación de *Xist*, *Tsix* es silenciado en el Xi (*Panning, 2008*)

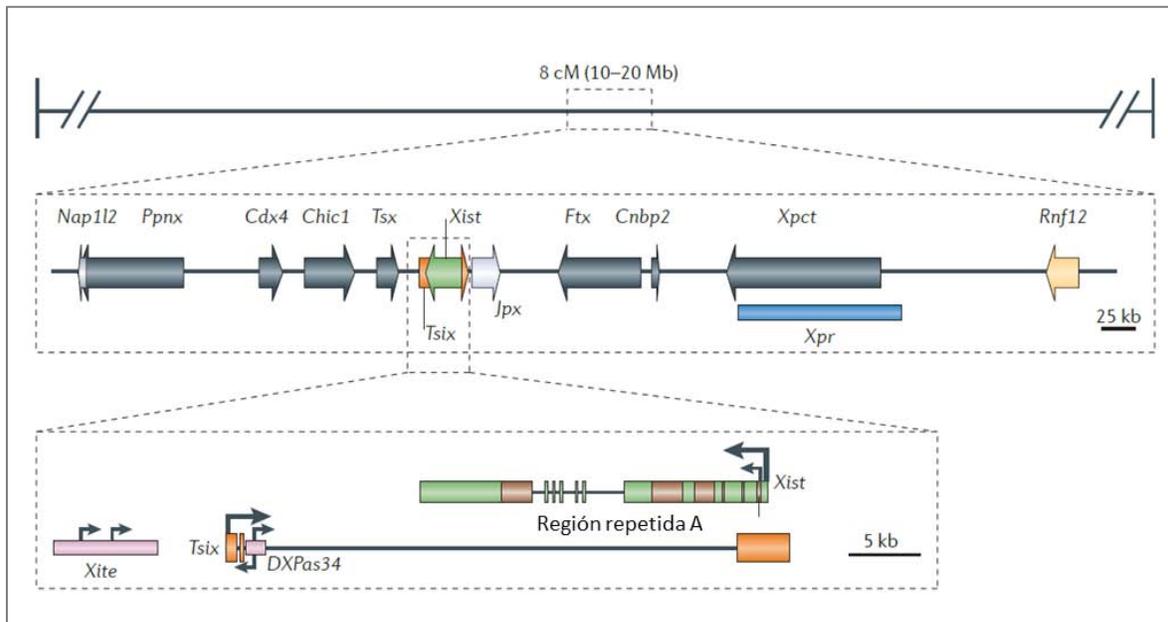


Figura 3. El centro de ICX. En el ratón el *Xic* se encuentra en una región que comprende de 10-20 Mb. Aquí se muestran algunos de los elementos adyacentes a *Xist*. Algunos de estos, como el gen antisentido a *Xist* (*Tsix*) o el de la proteína RING finger 12 (*Rnf12*; también conocido como *Rlim*), son conocidos por estar involucrados en la regulación de *Xist*. *Xist* y su antisentido *Tsix*, así como otros reguladores (*Xite* y *DXPas34*) se muestran a mayor detalle bajo el mapa del *Xic*. Modificado de *Augui et al, 2011*.

3.2.2 Control epigenético de la inactivación del cromosoma X

Para la elección de cuál de los cromosomas X se inactivará, hay una co-localización de ambos X con apareamiento de los loci *Xic*. Hay varios genes en el *Xic* que regulan esta elección (figura 4). *DXPas34* está localizado hacia 3' de *Xist* y parece ser requerido para "contar" el número de cromosomas X y mantener la regla de n-1 (todos los cromosomas X menos 1 en una célula estarán inactivos). *Xite*, un pequeño gen río arriba de *Tsix*, modula la expresión de este mediante metilación diferencial y la unión de proteínas CTCF a *Tsix*. Lo anterior sugiere un medio estequiométrico de elección del Xi: en el futuro Xa persiste la expresión de

Tsix, mientras que en el futuro Xi la metilación iniciada por *Xist* y la unión de CTCF lleva a la pérdida de competencia transcripcional (Brooks, 2010).

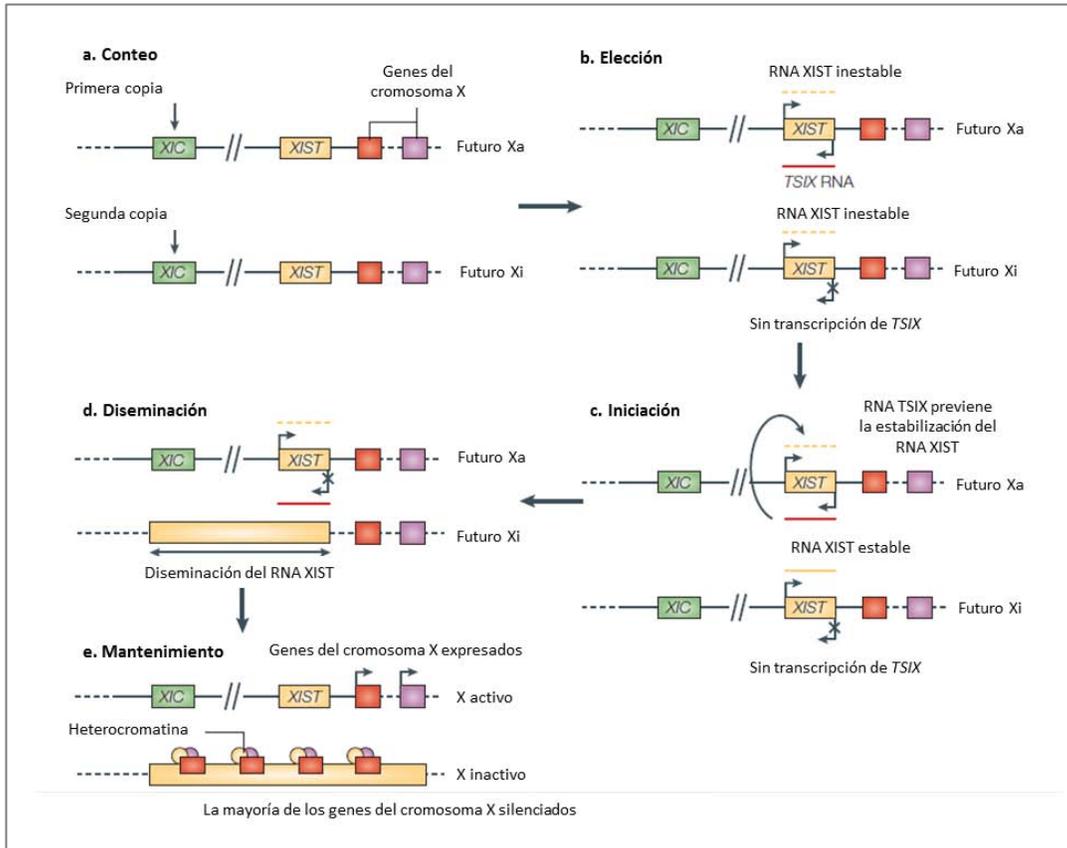


Figura 4. El proceso de ICX. El silenciamiento transcripcional estable del Xi se alcanza a través de un proceso de múltiples pasos. **a.** Primero, un locus en el cromosoma X conocido como *centro de inactivación del cromosoma X* (*XIC*) es “contado” de modo que al menos dos copias de *XIC* deben estar presentes por genoma diploide para que la inactivación ocurra. **b.** Ambos cromosomas X transcriben el RNA *XIST*, requerido para la inactivación. La elección de cuál de los dos cromosomas X será inactivado está determinada por la expresión asimétrica del RNA *TSIX* de la cadena antisentido a *XIST*, exclusiva del futuro Xa. **c.** El inicio de la ICX es mediada por la estabilización del RNA *XIST* en el futuro Xi, mientras que el alelo del Xa transcribe un RNA *XIST* que permanece inestable. **d.** El RNA *XIST* estable se expande en *cis* a lo largo del cromosoma del cual es expresado. **e.** La cubierta del DNA por *XIST* desencadena una secuencia de modificación de histonas que promueve la formación de heterocromatina, lo que lleva al silenciamiento transcripcional y asegura el mantenimiento de la ICX. Modificado de *Spatz et al, 2004*.

La expresión de *Xist* es suficiente para iniciar el silenciamiento del cromosoma Xi, pero esta habilidad parece confinada al desarrollo temprano. Posteriormente el

RNA XIST recluta proteínas que permitirán la diseminación y el mantenimiento de la ICX. Entre estos marcadores, la metilación del DNA en las regiones promotoras 5' es una reacción inmediata a la unión de XIST; la metilación de los elementos interespaciadores nucleares largos (LINEs) por la DNMT3B, ocurre mientras se propaga el silenciamiento. Otros marcadores epigenéticos tempranos son la H3K9me2, H3K27me3, H3K20me y el aumento de la histona H2A modificada, macroH2A (*Brooks, 2010*).

3.2.3 Genes que escapan a la inactivación

La ICX inicia desde el XIC y se disemina a la cromatina contigua de modo que los genes más cercanos tienen mayor probabilidad de ser inactivados, mientras que los más alejados pudieran tener mayor oportunidad de escapar a la inactivación, particularmente los genes de las regiones pseudoautosómicas. El resultado neto es que la mayoría de los genes en el Xi están inactivos (figura 5).

Carrel et al reportaron que 34 de 224 genes estudiados ligados al X (15%) mostraron alguna actividad en el Xi una vez establecida la ICX. Se piensa actualmente que 85% de los genes se inactivan en un Xi típico, pero el número puede variar de célula a célula y la extensión de la inactivación de genes individuales puede ser diferente de mujer a mujer (*Brooks, 2010*).

3.2.4 El cuerpo de Barr

La apariencia física del Xi fue notado primero por Barr y Carr quienes reportaron una correlación $n-1$ entre cuerpos heterocromáticos perinucleares densos en núcleos en interfase y el número de cromosomas X en individuos con cariotipos 45,X, 46,XY, 46,XX y mosaicos 45,X/47,XXX y 48,XXX/46,XY. Desde entonces el Xi también es llamado cuerpo de Barr y puede ser visualizado por tinción. Se encuentra adyacente a la membrana nuclear alejado de los otros

cromosomas que tienden a ser más eucromáticos y dispersos durante la interfase. El análisis del Xi muestra fibras condensadas con espacios entre ellas, dándole una apariencia distinta tanto de la eucromatina como de la heterocromatina típica. Durante la fase S, el Xi toma una localización perinucleolar y se replica tardíamente en relación a los otros cromosomas (Brooks, 2010).

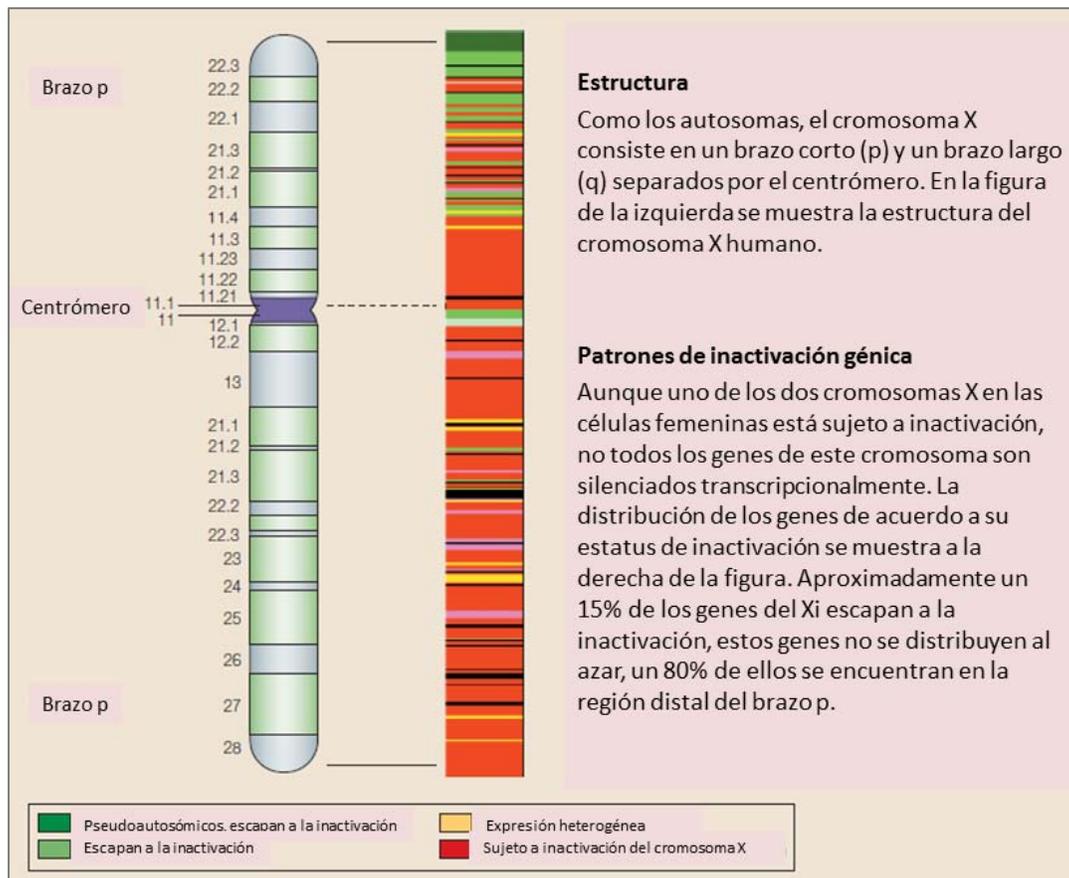


Figura 5. Estructura del cromosoma X humano. Tomado de Spatz *et al*, 2004.

Los sitios frágiles, incluidos los del X, también son de replicación tardía por lo que se sugiere cierta vulnerabilidad del Xi para mantener sus marcadores epigenéticos a través de divisiones celulares subsecuentes. Una vez restablecido su silenciamiento después de la fase S, el Xi se condensa y regresa a la localización en la periferia nuclear donde se reduce su acceso a los mecanismos de reparación. Esta susceptibilidad del Xi puede llevar a defectos en la ICX por la acción de nucleasas o reactivación por pérdida de los marcadores epigenéticos.

Se ha demostrado ganancia de expresión génica por reactivación del Xi en algunos tipos de cáncer (Brooks, 2010).

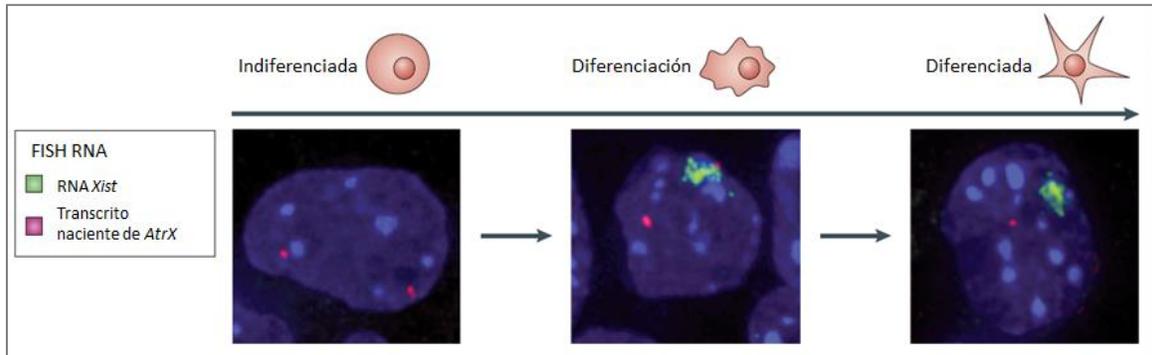


Figura 6. Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) para RNA en células madre embrionarias murinas. En las células indiferenciadas los dos cromosomas X están activos, como se muestra por la expresión bialélica del producto del gen *AtrX*. En estas células, Xist es expresado en bajas cantidades y no es detectable. Durante la diferenciación, uno de los dos alelos de Xist es infrarregulado. El RNA Xist empieza a cubrir el cromosoma X del cual es producido iniciando la ICX, la cual lleva a expresión monoalélica de genes ligados al X como *AtrX* en las células diferenciadas. Modificado de *Augui et al, 2011*.

3.3 Sesgo de inactivación del cromosoma X

Como se señaló, teóricamente ambos cromosomas X tienen la misma probabilidad de ser inactivados. En algunas mujeres una de las dos poblaciones celulares, con Xi paterno o materno, es más abundante que la otra y el valor de la proporción es llamado grado de sesgo (GS). Un GS=50 representa una ICX completamente al azar y un GS=100, una ICX completamente sesgada (*Mengel-From et al, 2012*).

Un sesgo en la ICX (sICX) se define entonces como una desviación de la proporción esperada 50:50 y habitualmente su valor es arbitrario, por ejemplo, como un patrón donde 70% o más de las células inactivan el mismo cromosoma X. Un sICX extremo es definido frecuentemente con un punto de corte de $\geq 90\%$ de las células con el mismo Xi (*Chabchoub et al, 2009*).

Está bien documentado que las alteraciones estructurales del cromosoma X como grandes deleciones, duplicaciones y translocaciones X;autosoma no balanceadas resultan en un patrón de inactivación sesgada, siendo el X anormal inactivado en la mayoría o la totalidad de las células. Al contrario, en los casos de rearrreglos balanceados X;autosoma, es el X normal el que usualmente se inactiva a fin de mantener la euploidía funcional. Procesos de selección similares se cree que operan en individuos con mutaciones en genes del cromosoma X. Muchos síndromes ligados al X han sido descritos en los cuales las mujeres portadoras muestran sICX extremo con el X normal activo en la mayoría de las células, se cree que esto resulta de una selección contra la expresión de la mutación deletérea (*Hatakeyama et al, 2004*).

Alternativamente, el sICX puede ocurrir como un proceso meramente estocástico. En el embrión en desarrollo la elección del cromosoma X que será inactivado es esencialmente al azar en cada célula. Sin embargo, como el número de células progenitoras presentes al momento de la ICX se considera relativamente pequeño, una proporción de mujeres tendría un patrón de inactivación sesgada sólo por azar (*Sharp et al, 2010*).

La prevalencia del sICX en mujeres sanas es controversial. Estudios previos han reportado que el 1.5-2.3% de las mujeres tienen razones de sesgo iguales o mayores a 90:10 (*Chabchoub et al, 2009*). Resultados en sangre periférica sobre la incidencia de sICX ≥ 90 en otro estudio mostró una frecuencia de 7% en menores de 25 años y 16% en mayores de 60 años, con significativo incremento con la edad ($P < 0.05$) (*Sharp et al, 2000*). El reporte de El Kassar y cols en 123 mujeres sanas de 0-93 años encontró un sICX $\geq 75\%$ en 24% de neonatos, 0% de mujeres menores de 50 años y 21% en mayores de 50 años; cuando se comparó el análisis de ICX por metilación con análisis por expresión de RNA la frecuencia de sICX en neonatos fue de 3% sin variación en los otros grupos etarios (*El Kassar et al, 1998*). Los estudios coinciden en la correlación positiva entre el sICX ($\geq 80\%$) en linfocitos periféricos y la edad ($r=0.238$, $P=0.034$), incrementándose

significativamente su frecuencia en mujeres mayores de 55 años (*Knudsen et al, 2007*).

3.4 Patrón de inactivación del X en la enfermedad autoinmune

En 1977 Kast propuso un papel del sICX en la susceptibilidad a la EAI, tal hipótesis retomada por Stewart en los noventa se conoce como la hipótesis de la pérdida de mosaicismo. La pérdida de mosaicismo en los linfocitos por un sICX podría ocasionar que los autoantígenos ligados al Xi escapen a la presentación antigénica en el timo, generándose células T autorreactivas que liberadas a la circulación incrementarían el riesgo de EAI (*Ozcelik, 2008; Gregersen et al, 1999*).

Los antígenos propios y extraños son presentados en el timo por las células presentadoras de antígeno a los linfocitos T vírgenes, que por selección positiva son liberados a la circulación activando a macrófagos, linfocitos T citotóxicos y linfocitos B responsables de la producción de anticuerpos. Los linfocitos T presentados a autoantígenos son eliminados vía apoptosis para conservar la tolerancia inmunológica. Un sICX evitaría el reconocimiento de antígenos del X predominantemente inactivo y la persistencia de células T reactivas llevaría al desarrollo de autoinmunidad (*Ozcelik, 2008; Chabchoub et al, 2009*) (figura 7).

Los resultados de los estudios que han evaluado una posible asociación del sICX con las EAI han reportado mayor frecuencia de sICX en mujeres con ES, artritis reumatoide juvenil (ARJ) y ETAI en comparación con controles sanos (*Ozcelik, 2008*). Sin embargo, el aumento en la frecuencia del sICX no parece ser una característica común a todas las EAI, ya que estudios en mujeres con CBP, síndrome de Sjögren, EM y LEG no encontraron diferencias significativas entre casos y controles (*Ozcelik, 2008; Knudsen et al, 2007, Huang et al, 1997*).

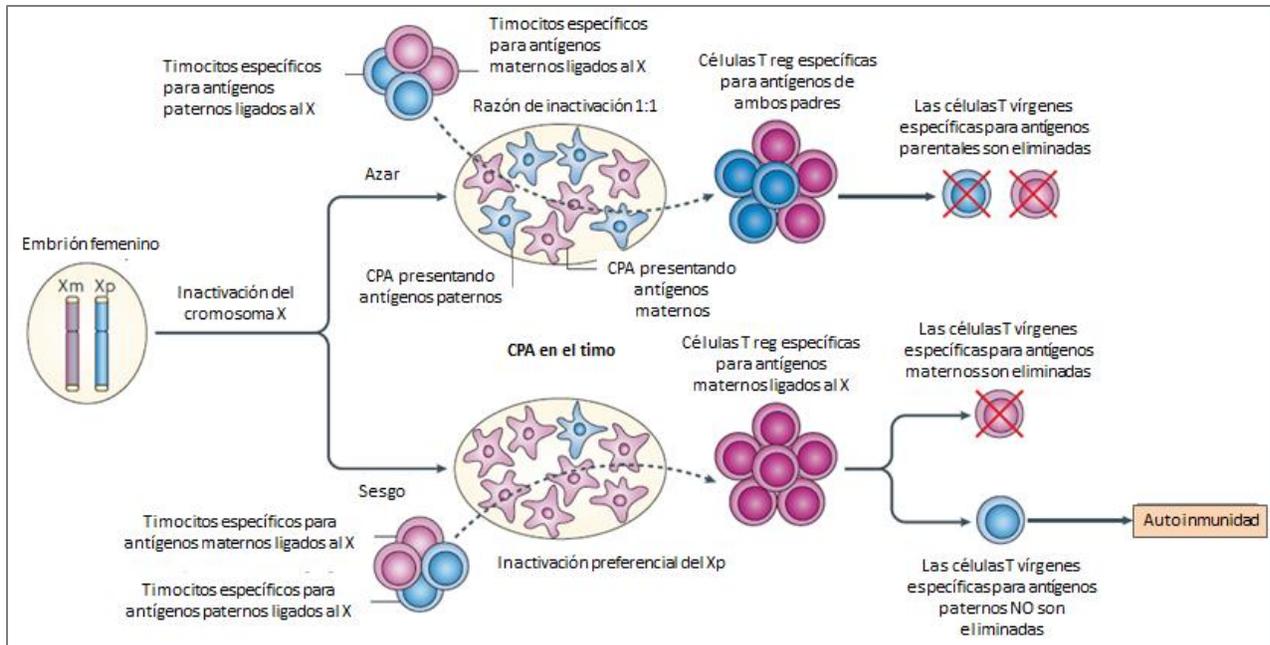


Figura 7. Hipótesis de la pérdida del mosaicismo. CPA: células presentadoras de antígenos, Xm: X materno, Xp: X paterno. Modificado de Libert et al, 2010.

3.4.1 Artritis reumatoide juvenil

Estudiando el sICX como un factor asociado a la autoinmunidad en la ARJ, Uz y cols compararon el patrón de ICX en 81 niñas y adolescentes con esta enfermedad y 211 controles sanas. Un sICX ($\geq 80\%$) se observó en 22.6% de las pacientes y en 7.1% de las controles ($P=0.0036$). Sesgo extremo ($\geq 90\%$) fue observado en 12.9% de los casos y en 1.3% de las controles. ($P=0.0008$). Con lo anterior, los autores sugieren que la pérdida del mosaicismo por sICX puede constituir un factor de riesgo para el desarrollo de la ARJ (Uz et al, 2009).

3.4.2 y 3.4.5 Enfermedad tiroidea autoinmune y artritis reumatoide

Chabchoub y cols publicaron un estudio donde se comparó el perfil de ICX en 106 pacientes con AR y 145 mujeres con ETAI versus 257 controles sanas; siendo este el primer reporte en encontrar una asociación entre el sICX extremo y AR. Un sICX se observó en 34.2% de las pacientes con AR, 26% de pacientes con ETAI y

11.2% de las controles ($P<0.0001$). La frecuencia de sesgo extremo de ICX (>90%) fue de 22.4% en AR y 14.0% en ETAI. Ambas frecuencias fueron significativamente más altas que en la población control donde fue de 4.1% ($P<0.0001$) (*Chabchoub et al, 2009*)

3.4.3 Esclerosis sistémica

En el estudio de Broen et al se comparó el patrón de ICX de 217 mujeres con ES y 107 controles sanas. Se observó un claro incremento del sICX con la edad en la población control pero esta correlación no estuvo presente entre las mujeres con ES. Acorde con reportes previos, se encontró también una mayor frecuencia de sICX en las pacientes con ES ($P<0.001$), en aquellas con esclerosis limitada cutánea ($P=0.008$), difusa cutánea ($P=0.005$) y pacientes con anticuerpos anti-topoisomerasa positivos ($P=0.008$) comparadas con controles (*Broen et al, 2010*).

3.4.4 Escleroderma

El microquimerismo relacionado al embarazo y el aumento en la frecuencia de sICX han sido asociados con escleroderma. Uz y cols realizaron también una comparación entre el sICX (definido como $\geq 80\%$) entre 195 pacientes con escleroderma y 160 controles. El sesgo en rangos de 80-89% fue observado en 15 de 94 pacientes (16.0%) pero sólo en 7 de las 124 controles (5.6%; $P<0.0001$). Un sICX extremo (>90%) fue observado en 17 de las 94 pacientes (18.1%) y en 3 de las 124 controles (2.4%; $P<0.0001$) (*Uz et al, 2008*).

3.5 Inactivación del cromosoma X en otras enfermedades

El patrón de ICX ha sido utilizado para estudiar la clonalidad de los tumores, la expresión fenotípica de enfermedades ligadas al X en portadoras heterocigotas y el desarrollo de gemelos o fetos con heteroploidías en mosaico. Patrones con

sICX se han asociado con pérdida gestacional recurrente, embarazo trisómico y cáncer de mama (*Sharp et al, 2010*).

Cambios en el cromosoma X en células somáticas pueden contribuir al desarrollo del cáncer. Usando células de cáncer de mama humanas como modelo, Richardson y cols encontraron que la mitad de los cánceres esporádicos se caracterizaron por duplicación del Xa y la pérdida del cromosoma Xi. Esto no contribuyó al aumento en la expresión génica, aunque se asoció a sobreexpresión de un subgrupo de genes (*Richardson et al, 2006*).

En otro trabajo, los Xi acumularon más mutaciones que cualquiera de los autosomas en genomas con cáncer, lo que sugiere una incapacidad de reparar el daño satisfactoriamente; si este Xi experimenta reactivación puede contribuir a las mutaciones que llevan a la progresión a cáncer (*Spatz et al, 2004*).

3.6 Heredabilidad del patrón de inactivación del cromosoma X

En ratones (*Mus spretus*) hay al menos cuatro variantes alélicas que describen al locus Xce: Xce^a, Xce^b, Xce^c y Xce^d. En orden ascendente tienen la capacidad de incrementar la tendencia de un cromosoma X a permanecer activo; el alelo Xce^c domina sobre Xce^b y este sobre Xce^a. En este modelo animal entonces, existe una herencia ligada al X y limitada a las hembras en cuanto a la ICX. Hay evidencia también del efecto epigenético de la impronta parental en la ICX tanto en ratones como en humanos. En los tejidos extraembrionarios de ambos organismos, el X paterno se inactiva preferentemente. Este efecto de la impronta puede ser superado en modelos murinos por los alelos de origen parental Xce^c, de modo que, cuando es heredado del padre, el X con el alelo Xce^c puede permanecer activo en los tejidos extraembrionarios (*Naumova et al, 1996*).

Una familia estudiada para sICX mostró transmisión ligada al X del sICX extremo. La abuela paterna tuvo un patrón de sICX, así como las siete hijas del hijo de esta mujer. Se confirmó que el Xi en la abuela materna tenía la misma

copia de *XIST* que el *Xa* de todas las nietas. Los autores proponen que la ICX esté controlada en *cis* por un gen del mismo cromosoma X. El hecho de que el cromosoma X de las nietas heredado de su abuela está activo en ellas pero inactivo en aquella pudiera ser explicado por un evento de recombinación en un locus no conocido. No descartan otras hipótesis como la presencia de un gen que confiera ventaja linfoproliferativa o un “efecto de origen parental reverso” donde un alelo *XIST* mutante (que condicione sICX) sería expresado cuando derive del padre y no cuando deriva de la madre (abuela con Xi sesgado y nietas con mismo X activo sesgado) (*Naumova et al, 1996*).

3.7 El patrón de inactivación del cromosoma X y la edad

El GS incrementa significativamente con la edad en estudios transversales de poblaciones mayores de 55-60 años y esta asociación continúa en incremento en poblaciones de edades más avanzadas. La causa de esto se ha debatido, pero podría ser consecuencia de una combinación de diferencias selectivas leves entre las células que han inactivado uno u otro cromosoma X, y la senescencia de células madre, de modo que con el tiempo las células hematopoyéticas deriven de unas cuantas con el mismo patrón de ICX (*Mengel-From et al, 2012*).

Una explicación adicional a estos cambios a través del tiempo, es que hay pérdida alelo específica relacionada a la edad de la metilación en los sitios reconocidos por *HpaII*, enzima que se usa para digestión en el ensayo de ICX del locus *AR*. Es posible que la pérdida de metilación en algunos alelos de *AR* sea más pronunciada con el tiempo debido a diferencias locales de secuencia, longitud del trinucleótido repetido u otros factores en *cis* (*Hatakeyama et al, 2004*).

La mayoría de los estudios de ICX han sido realizados en células de sangre periférica, pero una alta frecuencia de sICX en mujeres ancianas ha sido observado también en células de mucosa oral (*Knudsen et al, 2007*). En el estudio de Sharp y cols se comparó el perfil de ICX en sangre periférica con el mismo en células de mucosa oral y epitelio urinario. En la mayoría de los individuos, hubo

una buena correlación entre las proporciones de ICX en células de sangre y mucosa oral; pero en un subgrupo estudiado de mujeres de 60 años o más, la incidencia de sICX extremo fue 23% en sangre, 4% en mucosa oral y 11% en epitelio urinario ($P<0.05$) (*Sharp et al, 2010*).

TELÓMEROS E INMUNOSENESCENCIA

El incremento del estrés oxidativo ha sido documentado en pacientes con AR comparados con controles, se debe a la producción de intermediarios reactivos de oxígeno que conducen a un estado de envejecimiento celular. El envejecimiento normal del sistema inmune, o inmunosenescencia, se caracteriza por cambios en subgrupos de células T y atrofia tímica, esto resulta en disminución de la función de las células B y T y la pérdida de la habilidad para distinguir entre los antígenos propios y los extraños. La apoptosis alterada, el incremento en la secreción de citocinas y el repertorio alterado de células T dan origen a un estado inflamatorio crónico, produciendo un fenotipo autoinmune de riesgo (*Costenbader et al, 2011*).

La longitud de los telómeros (LT) ha emergido como un biomarcador de envejecimiento y de riesgo de enfermedades relacionadas con la edad. La conexión entre la disfunción del sistema telómero-telomerasa y la EAI no se ha establecido claramente; sin embargo, se sugiere que la erosión telomérica lleva a inmunosenescencia prematura que afecta diferencialmente a células T vírgenes y efectoras que prevalecen sobre clonas reguladoras dando lugar a lesiones citotóxicas autorreactivas (*Georgin-Lavialle et al, 2010*).

4.1 Estructura telomérica

Los telómeros consisten de largos trectos de repetidos TTAGGG de doble cadena que se extienden de 9 a 15 kb en los extremos de los cromosomas humanos, y que pueden ser hasta de 100 kb en roedores. El extremo del telómero

es identificable por la presencia de una protrusión de 50 a 300 nucleótidos de cadena sencilla en el extremo 3', llamado saliente G. El saliente G mimetiza rupturas de DNA de doble cadena cuya reparación innecesaria condiciona fusiones cromosómicas deletéreas que son evitadas por la asociación del DNA telomérico con ribonucleoproteínas de un complejo denominado shelterina.

El complejo shelterina está constituido por el factor 1 de unión a repetido telomérico de doble cadena (TRF1, también conocido como TERF1), el TRF2 (también conocido como TERF2), la proteína 1 factor represor y activador que interactúa con TRF2 (RAP1, también llamada TERF2IP), moléculas de enlace como la proteína nuclear 2 de interacción con TRF1 (TIN2) y la proteína de interacción con POT1 y TIN2 (TPP1) y el factor de protección de los telómeros 1 (POT1). La interacción del complejo shelterina con otros factores permite la generación del bucle T, una estructura de protección de los extremos cromosómicos, generado por la invasión del saliente 3' monocatenario a los repetidos TTAGGG de doble cadena (*O'Sullivan et al, 2010*) (figura 8).

4.2 Sistema telómero-telomerasa

En células somáticas, que carecen fisiológicamente de mecanismos de mantenimiento de la LT, la replicación por sí misma se acompaña de una pérdida neta de 50 a 200 pares de bases de secuencia telomérica por cada división celular. La base molecular de esta pérdida de DNA está en la incapacidad de las polimerasas convencionales para replicar completamente el DNA parental de la cadena discontinua sin extremo 3' libre, combinada con la necesidad de generar enzimáticamente salientes G en ambas cadenas. Adicionalmente al acortamiento replicativo, existen vías de desgaste llamadas pérdidas esporádicas como las provocadas por estructuras secundarias que interfieren con la telomerasa, el daño oxidativo (susceptibilidad por regiones ricas en G) o alteraciones en la reparación (*Gorony et al, 2006*). En células pluripotenciales, células germinales y células madre hematopoyéticas, este acortamiento es librado por la adición *de novo* de

repetidos TTAGGG sintetizados por el complejo telomerasa, que usa el 3'OH del saliente G como sustrato (O'Sullivan *et al*, 2010).

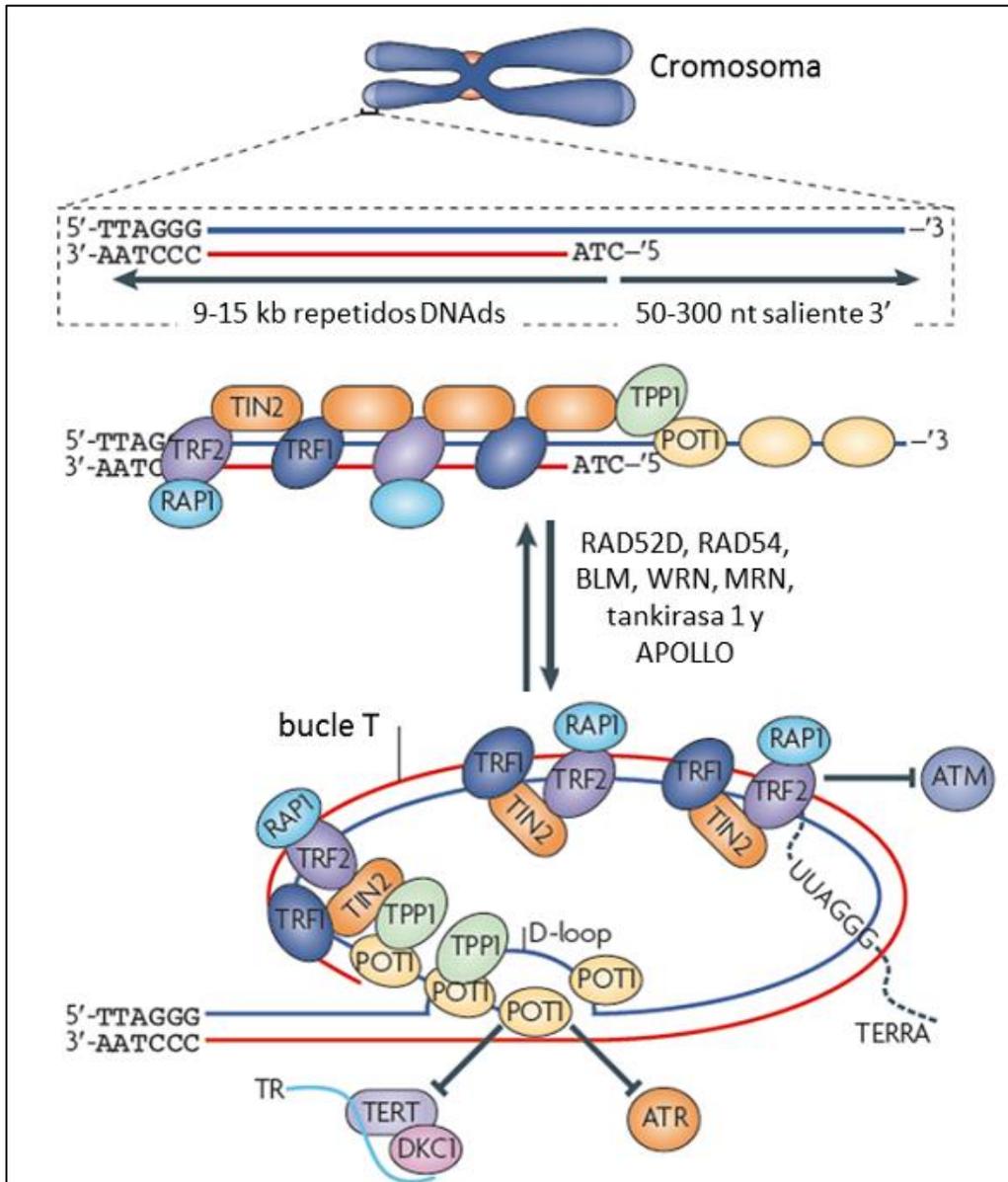


Figura 8. La estructura de los telómeros humanos. Modificado de O'Sullivan *et al*, 2010.

El complejo telomerasa consiste de una subunidad catalítica, la transcriptasa reversa telomerasa (TERT), y una subunidad de templado constituida por el RNA TR que provee el molde para la síntesis de repetidos. La disquerina (DKC1) es una proteína auxiliar clave en el complejo. Este complejo se ensambla en los

cuerpos de Cajal en el núcleo y es transportado a los telómeros vía un factor accesorio, la proteína 1 del cuerpo de Cajal telomerasa (TCAB1); las ATPasas pontina (RUVBL1) y reptina (RUVBL2) modifican el complejo inmaduro a una conformación activa, después de lo cual se asocia con los grupos hidroxilo del extremo 3' libre e inicia la adición de nucleótidos en los extremos cromosómicos (O'Sullivan *et al*, 2010) (figura 9).

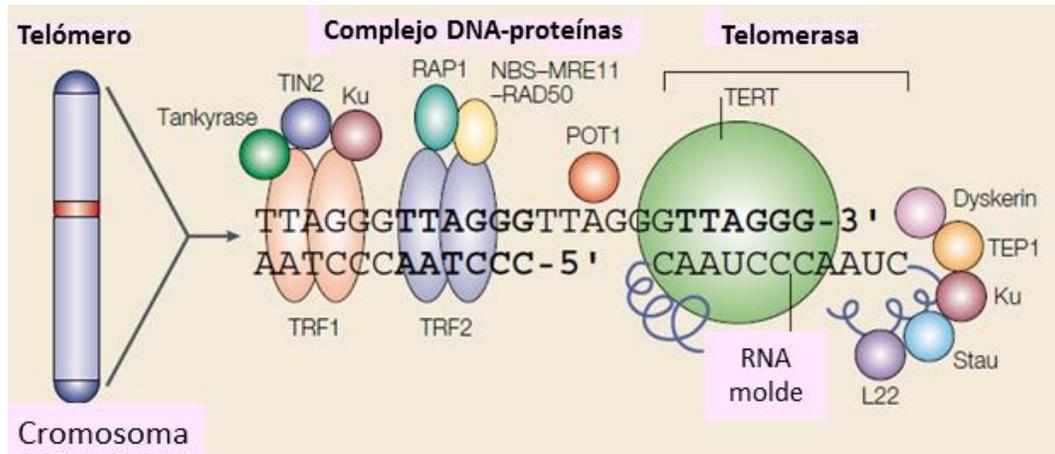


Figura 9. El sistema telómero-telomerasa. Modificado de Hodes *et al*, 2002.

La telomerasa contrarresta el acortamiento generacional de los telómeros manteniendo su longitud y estabilidad, siendo esencial para células altamente proliferativas como las células hematopoyéticas progenitoras. Recientemente se han descrito otras funciones para la TERT en mamíferos, entre las que se incluyen la regulación de la dinámica de la cromatina, proliferación de células madre y la transcripción de genes reguladores del desarrollo (O'Sullivan *et al*, 2010).

4.3 Dinámica de la longitud telomérica

Por los mecanismos citados, una célula somática tiene un número definido de divisiones celulares hasta que los telómeros son críticamente cortos llevando a la célula a un arresto terminal denominado senescencia replicativa o causando la muerte celular (figura 10). Este mecanismo limita la esperanza de vida de las células individuales y probablemente de algunos compartimentos celulares,

sirviendo además como una vía supresora tumoral que previene la inmortalidad celular. La longitud precisa a la que los telómeros pierden su función protectora es incierta y sujeta a debate. En fibroblastos humanos senescentes pueden identificarse los telómeros por técnicas con sensibilidad mayor a 0.5 kb de la secuencia repetitiva, mientras que en modelos animales células con telómeros críticamente cortos continúan dividiéndose, lo que establece que la LT no es el único factor asociado a la longevidad celular (O'Sullivan *et al*, 2010).

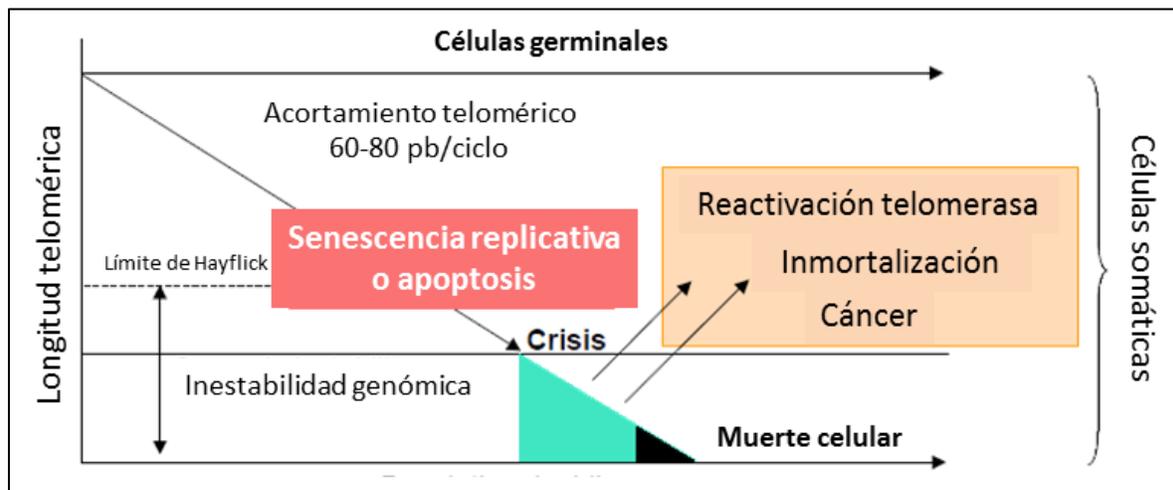


Figura 10. Dinámica de la longitud telomérica y el ciclo celular.

4.3.1 Cambios en la longitud telomérica asociados con la edad

La LT muestra distribución normal en diferentes cohortes estudiadas, con una media de 6.85 kb. Un estudio en población belga mostró que el sexo, la edad y el tabaquismo son determinantes significativos de la LT. La tasa de acortamiento telomérico fue calculada en 0.024 kb/año en hombres y 0.019 kb/año en mujeres y la LT ajustada por la edad fue menor en hombres que en mujeres (6.77 kb vs 6.92 kb, $P=0.028$). La LT ajustada por edad y sexo fue menor en fumadores que en no fumadores (6.72 kb vs 6.91, $P=0.014$) (Nawrot *et al*, 2004).

Otros estudios han confirmado la mayor LT en mujeres con respecto a los varones. La LT en neonatos es muy similar independientemente del sexo, lo que

sugiere que el dimorfismo sexual en la LT adulta surge en la vida extrauterina. Entre las explicaciones a este fenómeno se propone a la ICX (donde se pudieran inactivar alelos relacionados con telómeros cortos, siendo que el telómero del Xi es más corto que el del Xa en mujeres adultas), elementos de respuesta a estrógenos en hTERT o la menor producción de especies reactivas de oxígeno en mujeres (Nawrot et al, 2004; Steer et al, 2007; Nordfjäll et al, 2009).

En una cohorte sueca se determinaron cambios en la LT relativa de leucocitos de 969 individuos sanos con intervalos intermuestrales de 9 a 11 años, observando una tendencia general al acortamiento con el tiempo ($r = -0.164$, $P < 0.001$), aunque un tercio de la muestra mostró telómeros estables en el periodo estudiado (Nordfjäll et al, 2009).

Otra observación interesante con respecto al acortamiento telomérico es la relación que guarda con la LT basal y con la edad. Cuando se compara la tasa de disminución de la LT por año con la LT inicial se encuentra correlación inversa ($r = -0.752$, $P < 0.001$), la tasa de desgaste es más pronunciada en individuos que muestran telómeros más largos en la determinación basal mientras que la LT en jóvenes correlaciona fuertemente con la tasa de desgaste telomérico. Se ha sugerido que la regulación epigenética y/o una actividad telomerasa preferencial en telómeros cortos explicaría este comportamiento (Nordfjäll et al, 2009).

4.3.2 Heredabilidad de la longitud telomérica

Estudios en gemelos han mostrado heredabilidad variable de la LT (34-82%), con alta concordancia tanto en gemelos dicigóticos como monocigóticos que suma importancia al factor ambiental. Por otra parte, estudios de asociación han mostrado relación entre polimorfismos en los genes *TERC* y *TERT* con la LT y otros en *TERC* y *POT1* con la longevidad humana (Broer et al, 2013).

Nawrot y cols propusieron en 2004 un mecanismo ligado al X como factor relacionado con la LT al encontrar correlación significativa entre LT padre-hija

($r=0.38$, $P=0.006$), madre-hijo y madre hija ($r=0.38$ y $r=0.49$; $P=0.003$ y $P<0.0001$, respectivamente), pero no entre padre-hijo ($r= -0.002$, $P=0.9$). Los autores sugieren que los genes codificados en el X, entre ellos *DKC1*, pudieran ser determinantes de la LT en la población general (Nawrot et al, 2004).

Un estudio que agrupó varias cohortes para determinar la heredabilidad de la LT encontró valores de 62-82%, con correlación padre-hijos ($r=0.33$) y madre-hijos ($r=0.42$) significativa, aunque mayor en madre-hijos ($P=0.007$). La edad paterna también estuvo relacionada con la LT de forma positiva; se conoce que la LT es mantenida y puede aumentar en espermatozoides a través de mitosis y meiosis con una ganancia de ≈ 71 pares de base por año (Broer et al, 2013).

4.4 Longitud del telómero y la enfermedad autoinmune

El sistema inmune está constituido principalmente por células autorenovables, dependientes por lo tanto del mantenimiento telomérico. Aunque las células madre hematopoyéticas tienen alta actividad telomerasa, no escapan a la pérdida telomérica teniendo esto un impacto negativo en el potencial de recambio con la edad. En el caso de los linfocitos T la función tímica es insignificante después de los 40 años, su recambio depende de la proliferación homeostática de los linfocitos T vírgenes que recuperan su actividad telomerasa en la estimulación antigénica para su expansión clonal (Goronzy et al, 2006).

La senescencia celular resulta en una restricción a la expansión clonal de células T vírgenes y cambio en la expresión de moléculas reguladoras en las T de memoria (con pérdida de CD28 y aumento en los receptores que reconocen HLA clase I). Las determinaciones de la vida media de los linfocitos *in vivo* enfatizan la necesidad de un recambio periférico, conforme declina la producción tímica la replicación de las células T vírgenes comienza a ser importante para mantener la reserva de linfocitos T (Schönland et al, 2003).

El acortamiento telomérico se ha descrito en varias EAI con mayor frecuencia que en controles (AR, escleroderma, LEG, GW, DMT1, psoriasis y dermatitis atópica), hallazgo interpretado generalmente como evidencia de proliferación acelerada de linfocitos T en los procesos autoinmunes (*Goronzy et al, 2006*).

4.4.1 Esclerosis múltiple

En un estudio de casos y controles de pacientes con EM se determinó la LT absoluta de mononucleares en sangre periférica, comparada con marcadores de daño oxidativo. Se encontraron telómeros significativamente más cortos en un subgrupo de pacientes con EM primaria progresiva respecto al grupo control y a otros subgrupos de EM; un acortamiento significativo se observó solo en estadios avanzados de la enfermedad y con relación a marcadores de daño oxidativo. El estrés oxidativo puede inducir daño y muerte celular a través de la oxidación de macromoléculas, incluido el DNA; aunque permanece la cuestión sobre si el acortamiento telomérico es una causa o consecuencia de la enfermedad (*Guan et al, 2015*).

4.4.2 Artritis reumatoide

Entre los factores asociados a la senescencia prematura de las células T en AR se encuentran la estimulación antigénica crónica, el estrés proliferativo y la insuficiencia en la reparación del DNA. Varios estudios han documentado el acortamiento en la LT en células T vírgenes y de memoria de pacientes con AR, el cual precede a la erosión fisiológica dependiente de la edad alrededor de 25 años (*Schönland et al, 2003; Goronzy et al, 2006; Fujii et al, 2009*).

Ha sido objeto de debate si los cambios en la LT son causa o consecuencia de la expansión clonal linfocitaria. Fujii y cols documentaron insuficiencia en la inducción de la telomerasa antígeno-independiente así como una relación con proteínas apoptóticas, como mecanismo adicional del papel de la telomerasa en la regulación del ciclo celular (*Fujii et al, 2009*). La erosión telomérica en AR también

se observa en células madre hematopoyéticas y se ha relacionado con el haplotipo HLA-DR4 (ya sea por regular el recambio o por estar involucrado directamente en el mantenimiento telomérico) (*Goronzy et al, 2006*).

Steer y cols cuantificaron la LT absoluta de pacientes con AR y controles sanos, encontrando una disminución de la LT con la edad en ambos grupos, pero mostrando los casos telómeros más cortos con una diferencia promedio de 369 pares de bases en todas las edades comparadas con respecto a los controles. El análisis de regresión lineal mostró que la edad, el sexo masculino y una mayor duración de la enfermedad estuvieron asociados significativamente con reducción de la LT. Se contó con el estatus HLA-DRB1 de un subgrupo de la muestra encontrando una menor LT en los casos con el EC (6.35 vs 6.59, $P=0.038$) respecto a los casos sin EC y menor también en relación a controles con EC (6.35 vs 6.96, $P<0.01$) (*Steer et al, 2007*).

En apoyo a que la disminución de la LT está determinada genéticamente y contribuye a la patogénesis de la AR, en un estudio realizado en individuos sanos genotipificados para el HLA se encontró que aquellos HLA-DR4+ tuvieron telómeros más cortos, con ≈ 1500 pares de bases menos que los HLA-DR4 negativos a los 20 años de edad. Cuando se comparó la LT de un grupo de neonatos con ambos genotipos no se encontraron diferencias, concluyendo los autores que los eventos críticos, endógenos o exógenos, que aceleran la erosión telomérica en los individuos HLA-DR4+ parecen ocurrir en la niñez o la adolescencia temprana. No se conoce la contribución de los alelos HLA-DRB1 al acortamiento telomérico de los linajes hematopoyéticos, pero la asociación es evidente tanto en linaje mieloide como linfoide (*Schönland et al, 2003*).

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La AR afecta al 1% de la población mundial, prevalencia que es variable en diferentes grupos étnicos. En México la prevalencia de la enfermedad en mujeres va de 0.7% en los estados del norte del país hasta 2.81% en los del sureste, siendo notorio su aumento en poblaciones con mayor porcentaje de ascendencia indígena (*Moreno-Montoya et al, 2015*). Un 60% de las mujeres con AR son diagnosticadas antes de los 45 años, representando un reto cómo se relacionan específicamente el sexo femenino y la edad con la pérdida de la tolerancia inmunológica.

Aunque se acepta universalmente que la etiología de las EAI es multifactorial, la investigación a nivel mundial se orienta a definir factores de riesgo que contribuyen al inicio o progresión de la enfermedad así como potenciales blancos terapéuticos. En nuestro país diferentes grupos de trabajo han realizado estudios epidemiológicos, clínicos y de análisis de biomarcadores con valor en el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad así como en la práctica médica. En cuanto a los factores genéticos implicados en el desarrollo de la AR, estudios de asociación en población mexicana han mostrado significancia en variantes de genes ya conocidos relacionados con la enfermedad.

Estudiar una posible relación entre la ICX y la LT con la AR en un centro nacional de referencia para EAI es importante considerando que son mecanismos poco explorados particularmente en estadios tempranos de la enfermedad. Siendo la ICX un fenómeno exclusivo en las mujeres y el acortamiento de la LT un proceso relacionado con la edad, emulan evidentemente a los dos principales factores de riesgo para la presentación de la AR.

Preguntas de investigación

¿Está involucrado el sICX en el riesgo para el desarrollo de la AR como se ha reportado en otras enfermedades autoinmunes?

¿Cuál es el cambio del patrón de ICX con la edad en mujeres con AR? ¿Cómo difiere este cambio en el tiempo con el de mujeres sanas? ¿Pudiera relacionarse un cambio en el patrón de ICX con la progresión de la enfermedad?

¿Hay diferencias en la LT entre mujeres con AR de diagnóstico temprano y mujeres sanas?

¿Cómo se relaciona la LT con el inicio y la evolución de la enfermedad? ¿Cuál es la dinámica de la LT en el tiempo en mujeres sanas y en mujeres con AR?

JUSTIFICACIÓN

Las EAI representan como grupo uno de las causas principales de morbilidad y mortalidad en el mundo con reducción en la esperanza de vida, altos costos del tratamiento, discapacidad permanente y pérdida de la productividad. La etiología de la AR continúa siendo poco clara y existe la necesidad de ampliar la búsqueda de marcadores biológicos relacionados con ella.

Factores genéticos que contribuyen o acompañan a la inflamación sistémica podrían aplicarse como biomarcadores asociados con un riesgo subsecuente de desarrollar AR. Conocer si las variantes en estos marcadores preceden a la enfermedad, es importante para distinguir entre eventos iniciadores y eventos secundarios en la patogénesis de la AR.

El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán es un hospital de tercer nivel, centro de referencia para la atención de pacientes con enfermedades reumatológicas. En el Departamento de Inmunología y Reumatología se estableció la cohorte de artritis temprana en 2004, donde las mujeres con diagnóstico de AR e inicio de los síntomas con duración menor a un año son incluidas para estudios clínicos y paraclínicos así como seguimiento del tratamiento y actividad de la enfermedad. Esta cohorte representa un grupo de pacientes que permite obtener muestras de DNA en estadios iniciales de la enfermedad así como muestras de seguimiento para el análisis de sICX y LT durante la evolución clínica.

La utilidad de esta investigación se encuentra principalmente en la asociación de ambos fenómenos, la ICX y la LT, con la presentación de la AR así como su papel en la progresión de la enfermedad. El valor práctico de estos hallazgos vendrá definido por estudios posteriores que extiendan la investigación hacia su relación con otras variables clínicas o la heredabilidad de tales marcadores.

HIPÓTESIS

Las alteraciones en el patrón de inactivación del cromosoma X en los leucocitos de sangre periférica contribuyen al riesgo de presentación de AR en mujeres y se relacionan con la gravedad y duración de la enfermedad. Por lo cual se observará un mayor sICX en las mujeres con AR al inicio de sus manifestaciones clínicas con respecto a las controles de la misma edad, y una tendencia a incrementar durante el tiempo de seguimiento, más allá de lo esperado por la edad.

Los leucocitos de sangre periférica de las mujeres con AR presentan telómeros más cortos al momento de su diagnóstico comparadas con controles pareadas por edad, indicando la contribución al riesgo de presentar la enfermedad. Por otro lado, la erosión telomérica se acentúa con la progresión de la enfermedad y sería un indicador de la gravedad de la misma.

Si el aumento en el sICX en mujeres con AR está condicionado por el envejecimiento celular prematuro, se observará correlación entre este fenómeno y el acortamiento telomérico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si el patrón de ICX y la LTR en leucocitos de sangre periférica participan en la patogénesis de la AR en mujeres de la cohorte de la Clínica de Artritis Reumatoide de Detección Temprana (AR-TE).

Objetivos específicos

1. Determinar el patrón de ICX en leucocitos de sangre periférica de mujeres con AR temprana (menos de 12 meses de evolución) y el de controles pareadas por edad, mediante el ensayo de PCR semi-cuantitativa acoplada a restricción enzimática sensible a metilación.
2. Evaluar si existe un cambio en el grado y frecuencia del sICX en mujeres con AR después de un intervalo de seguimiento mayor a 2 años.
3. Estudiar la LT en leucocitos periféricos de mujeres con AR de diagnóstico temprano y en mujeres sin evidencia de EAI.
4. Determinar si se presenta un cambio en la LT en pacientes con AR después del intervalo de seguimiento.
5. Analizar si hay una correlación entre el sICX y la LT en mujeres con AR.

MATERIAL Y MÉTODOS

9.1 Selección de muestra y definición de los grupos de comparación

Casos. Mujeres que ingresaron a la Clínica de Artritis Reumatoide de Detección Temprana (AR-TE) del Departamento de Inmunología y Reumatología del INCMNSZ en el periodo comprendido entre marzo de 2004 a abril de 2015, cuyo intervalo desde el inicio de los síntomas al diagnóstico de AR fue menor a un año y a quienes al ingreso se les realizó toma de muestra para análisis del patrón de ICX y la LTR previa autorización en el consentimiento informado. Se seleccionaron 132 mujeres que contaban con una muestra de DNA extraído de leucocitos de sangre periférica al ingreso a la clínica; se excluyeron 3 pacientes con diagnósticos definitivos distintos a AR y 3 pacientes con muestra de DNA insuficiente o de baja calidad. La muestra final apta para el análisis molecular se conformó de 126 pacientes. A las mujeres que continuaron en la cohorte y que cumplieran con al menos 2 años de seguimiento se les tomó una segunda muestra (n=80), procedimiento realizado entre febrero de 2014 y abril de 2015. El tiempo de seguimiento para cada una de las participantes fue diferente y dentro de un rango de 2 hasta 11 años.

Controles. Mujeres sin evidencia de EAI que acudieron al banco de sangre del INCMNSZ y fueron invitadas a participar en este estudio de forma voluntaria al donar una muestra de sangre periférica para el análisis molecular. Es importante mencionar que no fue posible realizar el seguimiento longitudinal de los sujetos control, de manera que se formaron dos grupos de controles independientes entre sí que fueron pareados por edad con los casos al primer y al segundo muestreo (figura 11). Se utilizó un intervalo de ± 3 años para el pareamiento.

Todos los procedimientos y análisis se realizaron después del consentimiento informado avalado por el comité de ética del INCMNSZ y firmado por la participante.

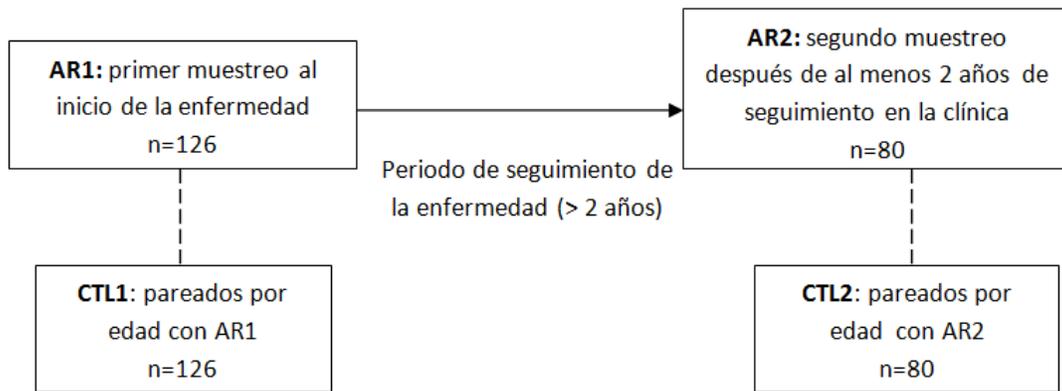


Figura 11. Definición de los grupos de comparación

9.2 Obtención de muestras biológicas y extracción de DNA

Se obtuvieron 4 mL de sangre periférica mediante punción venosa con el sistema *Vacutainer*[®] en tubos con el anticoagulante EDTA. La extracción de DNA se realizó con el sistema comercial *Wizard*[®] (*Promega*[™] cat: A1620) basado en la precipitación con sales. El DNA extraído fue cuantificado en un espectrofotómetro de gota *Nanodrop*[®], diluido a 30 ng/uL para el ensayo de ICX y a 5 ng/uL para la determinación de la LTR, y fue preservado a -20°C hasta su uso.

9.3 Determinación del patrón de inactivación del cromosoma X

9.3.1 Descripción general y fundamento de la técnica

El patrón de ICX se determina mediante la PCR semi-cuantitativa acoplada a restricción enzimática sensible a metilación. Este método fue desarrollado por Allen y cols y es conocido como el ensayo HUMARA (*Allen, 1992*). El ensayo se basa en la cuantificación relativa de los fragmentos amplificados de la región de repetidos en tándem CAG en el primer exón del gen del receptor de andrógenos (*AR*) localizado en el brazo largo del cromosoma X. La naturaleza polimórfica de esta región, debido a un número variable de los repetidos, permite distinguir entre

los dos cromosomas X paterno y materno. Los fragmentos amplificados son de diferente tamaño en un 90% de mujeres siendo estas heterocigotas e informativas para el ensayo. Otra característica importante de esta región es la presencia de sitios de restricción para una enzima sensible a metilación, de tal manera que el único fragmento de PCR que se amplifica después de la digestión del DNA genómico, proviene del alelo metilado del cromosoma Xi (figura 12). Los fragmentos amplificados son separados y cuantificados mediante electroforesis capilar lo cual permite determinar la proporción porcentual de ambos alelos metilados del gen *AR*.

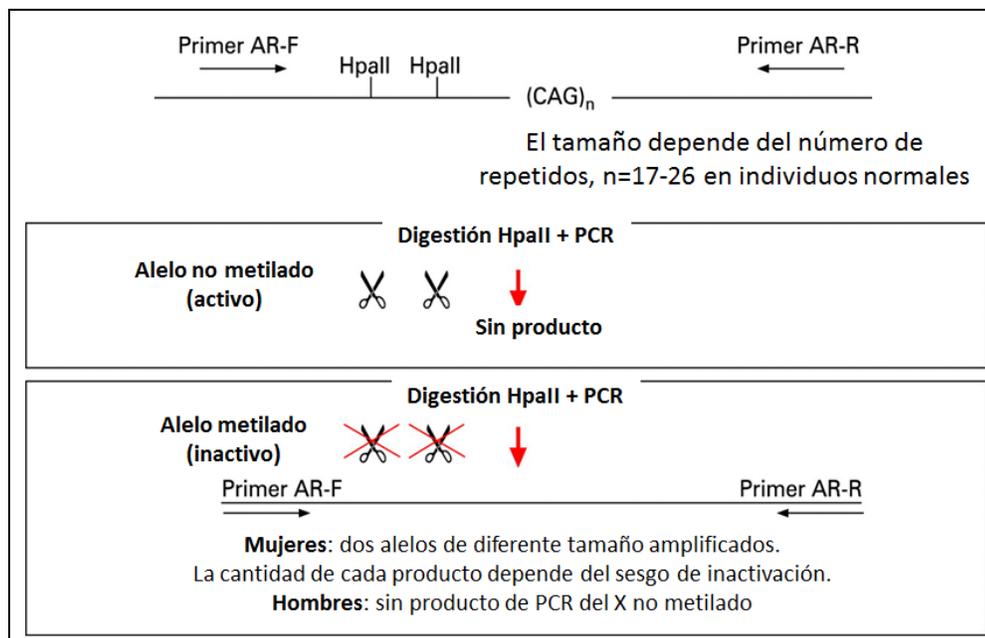


Figura 12. Análisis del perfil de ICX. Modificado de Shaikh MG et al, 2008

9.3.2 Restricción enzimática sensible a metilación

Las muestras de ADN fueron sometidos a digestión enzimática por la enzima sensible a metilación *HpaII*. Una característica inconveniente durante el análisis de los fragmentos, es la amplificación preferencial de los fragmentos más cortos durante la PCR. Por lo tanto es indispensable normalizar cada muestra con un

control de DNA no digerido. De tal manera que para cada análisis de ICX se prepararon dos reacciones:

1) Digestión: 11.1 uL de agua libre de RNasas/DNasas, 2 uL de buffer MultiCore 10x (*Promega*, Cat.R999A), 0.2 uL del BSA acetilado 10mg/uL (*Promega*, Cat. R396D), 1.7 uL de la enzima *HpaII* 6 U/uL (*Promega*, Cat. R6315) y 5 uL de la muestra de DNA 30 ng/uL;

2) No Digestión: 12.8 uL de agua libre de RNasas/DNasas, 2 uL de buffer MultiCore 10x, 0.2 uL del BSA acetilado 10mg/uL, y 5 uL de la muestra de DNA 30 ng/uL.

Cada corrida se preparó en placas de 48 pozos y se incluyeron 11 casos, 11 controles, 1 muestra de ADN masculino como control de la digestión y 1 control sin DNA, todos preparados con y sin enzima. Las reacciones se incubaron a 37°C durante al menos 6 h en el termociclador *DNA Engine Dyad*[®] (*BioRad*[®]). Un tiempo menor de la digestión, como mostraron los ensayos de estandarización, produce digestión incompleta y se manifiesta como un producto de PCR en el control masculino que de manera normal debe ser nulo.

Los productos de la digestión se mantuvieron a 4°C por no más de 3 h previo a la preparación de la reacción de PCR.

9.3.3 Amplificación por PCR de los fragmentos digeridos

Para la reacción de PCR se usaron los oligonucleótidos diseñados por Allen y cols (*Allen, 1992*) con la adición de una marca fluorescente para el análisis mediante electroforesis capilar (tabla 6). Debido a que alrededor del 10% de las mujeres son homocigotas para el número de repetidos CAG del gen *AR*, se optó por usar otros dos marcadores de inactivación para ampliar la muestra de mujeres informativas. Ambos marcadores contienen secuencias repetidas en tándem y sitios de restricción para la enzima *HpaII*. Además, ambos fueron previamente

validados respecto al gen *AR* para la determinación del sICX (*Musakova et al, 2015*).

Identificación	Secuencia	Gen	Locus	Tamaño	Ta, °C
AR-F	5' - FAM6 -TCC AGA ATC TGT TCC AGA GCG TGC 3'	<i>AR</i>	Xq12	~258-300	62
AR-R	5' GCT GTG AAG GTT GCT GTT CCT CAT 3'				
CNK-F	5'- HEX -CGA GCG GGC AAG TTG GCT GA-3'	<i>CNKSR2</i>	Xp22.12	~278-308	68
CNK-R	5'-TGT CGG GTC TCG CGG CTG TA-3'				
TMEM-F	5'- HEX -GGC CCC TCA GGT TCA TGG CG-3'	<i>TMEM185A</i>	Xq28	~243-279	68
TMEM-R	5'-CCC TCG TAC GGA AGC CCG GA-3'				

Tabla 6. Características de los oligonucleótidos utilizados en el análisis de sICX.

Las reacciones de PCR se prepararon usando la mezcla de PCR *HotStarTaq DNA Polymerase* (*Qiagen*[®]) que contiene el medio de la reacción, deoxinucleótidos y la enzima polimerasa. Las reacciones de PCR se prepararon considerando los siguientes volúmenes para cada reacción individual:

- 1) 7.4 µL de la mezcla de PCR [2X], 2 µL de la *Q-solution*TM [5X] (*Qiagen*[®]), 0.3 µL de cada uno de los oligonucleótidos AR-F [10µM] y AR-R [10µM], 5 µL del producto de digestión o del control no digerido.
- 2) 10 µL de la mezcla de PCR [2X], 4 µL de la *Q-solution*TM [5X] (*Qiagen*[®]), 0.3 µL de cada uno de los oligonucleótidos *CNK-F* [10µM], *CNK-R* [10µM], *TMEM-F* [10µM], y *TMEM-R* [10µM], 5 µL del producto de digestión o del control no digerido. Esta reacción de PCR dúplex sólo se usó para los casos no informativos para el gen *AR*.

Las reacciones se sometieron al siguiente programa de termociclado en el equipo *DNA Engine Dyad*[®] (*BioRad*[®]): 95°C/5 min, (95°C/30s, 62 o 68°C/1 min, 72°C/30s) x 30 ciclos, 60°C/45min.

9.3.4 Separación y cuantificación de fragmentos por electroforesis capilar

Los productos de la PCR se prepararon para la separación en el equipo de electroforesis capilar AB3500 (*Applied Biosystems*[®]). Para cada una de las muestras a separar se consideraron los siguientes reactivos:

17.7 µL de formamida *Hi-Di*[™] (*Applied Biosystems*[™], *Thermo Fisher Scientific*, cat: 4311320), 0.3 µL del estándar de tamaño *GeneScan*[™] –500 *LIZ*[®] (*Applied Biosystems*[®], cat: 4322682) y 2 µL del fragmento amplificado.

Los fragmentos amplificados pueden ser visualizados y cuantificados debido a que contienen un marcador fluorescente integrado en el oligonucleótido sentido. Después de la transformación de los datos, las cantidades relativas de cada fragmento se presentan en unidades relativas de fluorescencia (RFU, por sus siglas en inglés) acumuladas en el área bajo la curva.

9.3.5 Cuantificación relativa de la proporción del cromosoma X inactivo

El cálculo de la proporción del alelo inactivo más corto (A1) y del alelo inactivo más largo (A2) del *AR* para cada muestra se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\%A1_{\text{INACTIVO}} = \left[\frac{A1_D / A1_{ND}}{A1_D / A1_{ND} + A2_D / A2_{ND}} \right] \times 100\%$$
$$\%A2_{\text{INACTIVO}} = 100 - A1_{\text{INACTIVO}}$$

donde:

$A1_D$ = área del pico del alelo 1 digerido
 $A1_{ND}$ = área del pico del alelo 1 no digerido
 $A2_D$ = área del pico del alelo 2 digerido
 $A2_{ND}$ = área del pico del alelo 2 no digerido

La fórmula incorpora los valores de la muestra no digerida como una normalización que compensa una potencial amplificación preferencial de los alelos, habitualmente el alelo más corto. La figura 13 presenta un ejemplo de los resultados en la electroforesis capilar y el cálculo del patrón de ICX. Tradicionalmente el sesgo de ICX se presenta como la relación de los porcentajes de los alelos inactivos en cada X (%A1_{INACTIVO}:%A2_{INACTIVO}), por ejemplo 20:80, lo cual significa que el cromosoma X que porta el alelo A1 fue encontrado inactivo en el 20% de las células, mientras que el restante 80% tenían inactivado el cromosoma X portador del alelo A2. El valor de corte para considerar que hay un sesgo significativo y no se debe a la variación de la técnica en este estudio fue $\geq 70:30$. El desvío del valor normal que representa la inactivación aleatoria también se puede expresar en términos del grado de sICX: un patrón de inactivación 50:50 no tiene sesgo entonces el grado de sICX es 0%, el perfil 30:70 tiene el grado de sICX de 20% y un perfil 10:90, un grado de sICX de 40%.

9.3.6 Corrección del área bajo la curva por el tartamudeo de la polimerasa

La amplificación de las regiones que incluyen repetidos no siempre es eficiente, frecuentemente se produce el deslizamiento de la polimerasa que genera productos secundarios con diferencia en un repetido, fenómeno llamado tartamudeo o *stutter* (en inglés). La generación de este producto secundario se favorece en condiciones de mayor concentración de Mg²⁺, mayor cantidad de DNA, cuando la unidad repetida es más corta o cuando el número de repetidos es mayor. En este trabajo se probaron diferentes condiciones para disminuir la amplificación de *stutters* (datos no mostrados), sin embargo por la secuencia y el tipo de repetidos no fue posible eliminarlos. Los alelos con diferencia de un solo repetido son los más afectados por el tartamudeo, ya que este puede ser hasta el 30% del área del alelo principal y se integra en el área bajo la curva del alelo principal más corto, impidiendo el análisis semicuantitativo (figura 14).

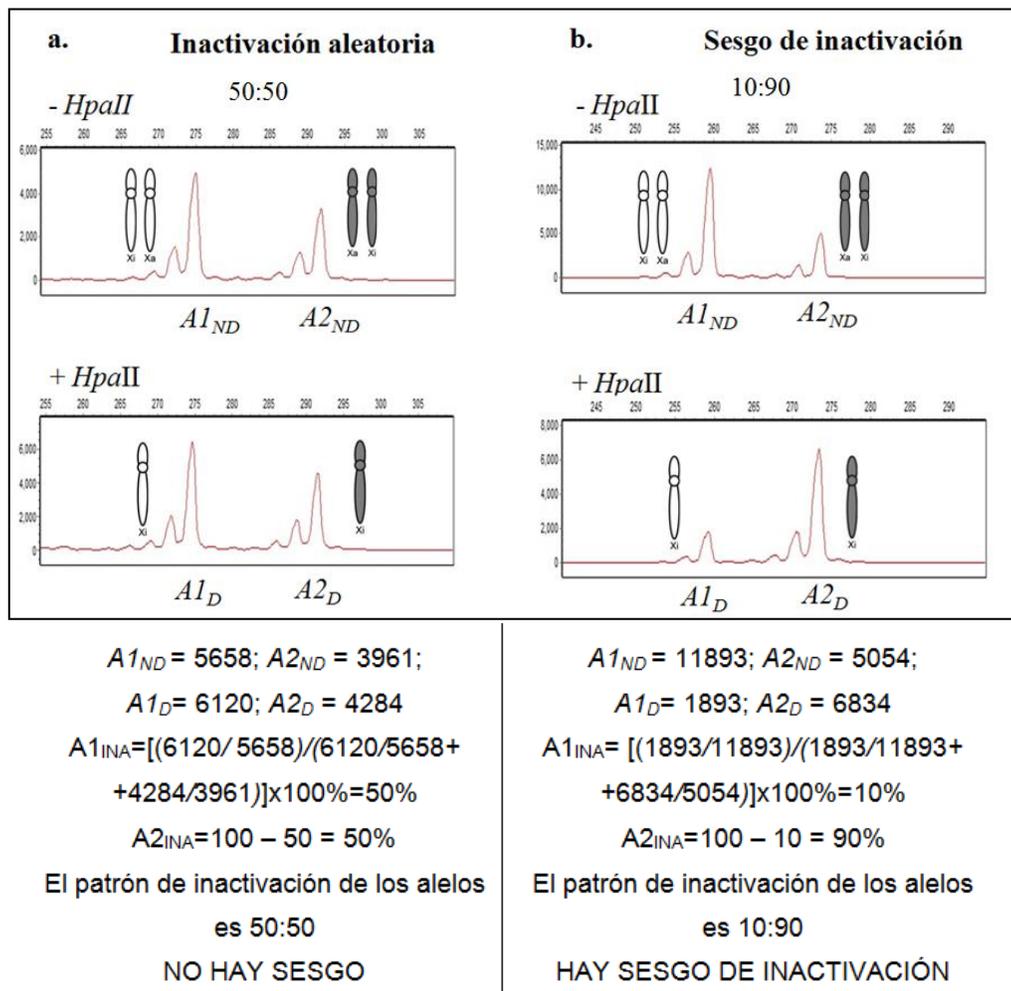


Figura 13. Electroferograma de los productos de PCR posterior a la digestión enzimática para dos muestras de DNA: **a.** Muestra con inactivación al azar de ambos alelos del gen *AR*, y **b.** Muestra con inactivación preferencial del alelo más corto en el 90 % de las células. *A1*: alelo más largo, *A2*: alelo más corto, _{ND}: no digerido, _D: digerido. En ausencia de la enzima *HpaII* se amplifican los alelos tanto del Xi como del Xa, en presencia de la enzima sólo se amplifican alelos de los Xi.

En este trabajo se realizó un procedimiento de corrección del área bajo la curva en las muestras heterocigotas con diferencia en un solo repetido. Del total de las corridas realizadas se seleccionaron aquellas que tuvieran alelos con diferencia de más de 3 repetidos entre ellos, también se incluyeron las corridas de las muestras homocigotas. Se seleccionaron 576 alelos individuales con el tamaño entre 246 y 300 pb, se agruparon por el tamaño del alelo y se determinó el promedio del porcentaje del área bajo la curva del pico *stutter* con respecto al pico

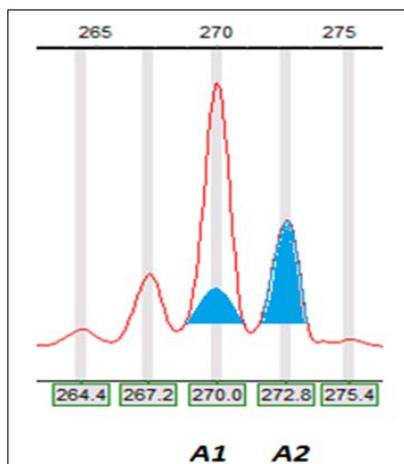


Figura 14. Ejemplo de una muestra heterocigota con los alelos que difieren en un solo repetido. En azul se esquematiza la integración del pico *stutter* del alelo A2 en el área del pico principal del alelo A1.

principal (figura 15). La relación observada entre el tamaño del alelo y el porcentaje del artefacto generado es lineal, entonces se utilizó la ecuación obtenida para estimar su proporción respecto al alelo principal considerando el tamaño del mismo y corregir las muestras afectadas:

$$\% \text{ de } \textit{stutter} = 0.4583 \times \text{tamaño del alelo (pb)} - 92.417$$

$$\text{Área A1 corregida} = \text{Área A1} - \text{Área A2} \times \% \text{ de } \textit{stutter} / 100\%$$

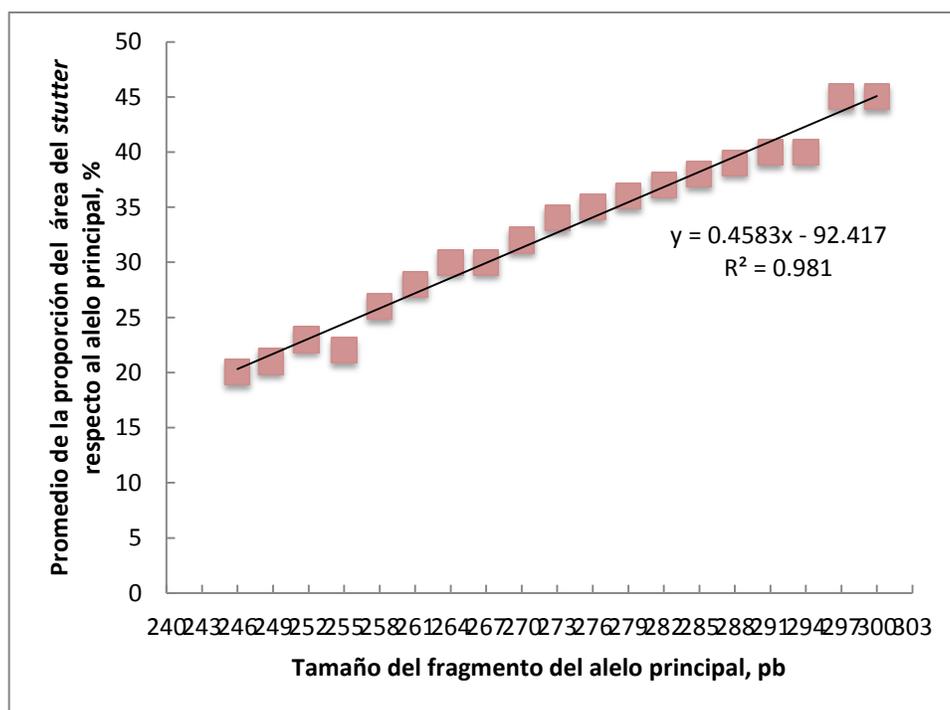


Figura 15. Relación entre el tamaño del fragmento y la proporción del pico secundario generado por el deslizamiento de la polimerasa.

9.4 Determinación de la longitud relativa de los telómeros

9.4.1 Descripción general y fundamento de la técnica

La LTR se determina mediante la PCR cuantitativa multiplex monocromática (MMqPCR, por sus siglas en inglés). Esta técnica fue desarrollada por Cawthon y cols y determina de manera indirecta la LTR mediante la cuantificación del DNA telomérico respecto al DNA total (Cawthon, 2009). La particularidad de esta técnica consiste en que se realizan dos reacciones en paralelo: una para la amplificación de la secuencia telomérica y la otra para la amplificación de un gen de referencia de copia única; además, los oligonucleótidos para la amplificación de la secuencia telomérica tienen un diseño que permite la amplificación de fragmentos de tamaño uniforme. La discriminación de las reacciones se logra debido a la diferencia entre las temperaturas de amplificación de los fragmentos.

9.4.2 Amplificación por MMqPCR

Las características de los oligonucleótidos para la región de repetidos teloméricos y para el gen de copia única se muestran en la tabla 7. Las reacciones de PCR se prepararon usando la mezcla de PCR *QuantiTect SYBR® Green* (Qiagen®) que contiene el medio de la reacción, deoxinucleótidos, colorante fluorescente intercalante y la enzima *Taq* polimerasa *Hot Start*. Las reacciones de PCR se prepararon considerando los siguientes volúmenes para cada reacción individual:

- 1) 7.5 µL de la mezcla de PCR [2X], 0.3 µL de dNTPs [10mM] (Qiagen®), 0.75 µL de cada uno de los oligonucleótidos telg [10µM] y telc [10µM], 0.3 µL de cada uno de los oligonucleótidos albu [10µM] y albd [10µM], 1.5 µL de DNA genómico [5ng/µL] y agua para completar los 15 uL.

Se agregó una cantidad adicional de deoxinucleótidos para favorecer la extensión de un número elevado de copias teloméricas. Cada muestra se analizó por triplicado. Las reacciones se sometieron al siguiente programa de termociclado en el equipo *Rotor-Gene 6000*[®] (*Qiagen*[®]) bajo las condiciones que permitan la amplificación y detección específica de ambos fragmentos a temperaturas diferentes: 1 ciclo de 15 min a 95°C; 2 ciclos de 15s a 94°C, 15s a 49°C; 32 ciclos de 15s a 94°C 10s a 62°C, 15s a 74°C con adquisición de señal, 10s a 84°C, 15s a 88°C con adquisición de señal.

Identificación	Secuencia	Gen	Locus	Tamaño	Ta, °C
telg	5' -ACA CTA AGG TTT GGG TTT GGG TTT GGG TTT GGG TTA GTG T-3'	Repetidos del DNA telomérico	Telómeros	79 pb	74
telc	5' TGT TAG GTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA ACA3'				
albu	5'-cgg cg gcg ggc ggc gcg ggc tgg gcg gAA ATG CTG CAC AGA ATC CTT G-3'	<i>ALB</i>	4q13.3	106 pb	88
albd	5'-GCC CGG CCC GCC GCG CCC GTC CCG CCG gaa aag cat ggt cgc ctg tt-3'				

Tabla 7. Características de los oligonucleótidos utilizados en el análisis de LTR.

Como un control de calidad y una referencia para determinar la eficiencia de las reacciones de PCR, se preparó una curva estándar de 5 diluciones seriadas de una mezcla de DNA comercial y se incluyó en cada corrida. La concentración inicial para la curva estándar fue de 25 ng/uL y las diluciones seriadas fueron de 1:3. El ejemplo de las curvas estándar obtenidas se muestra en la figura 16.

9.4.3 Cuantificación relativa del DNA telomérico

La determinación de la LTR se realizó por el método $\Delta\Delta C_t$ descrito por Schmittgen y Livak (2008). C_t es el número de ciclos de la reacción de PCR al umbral de detección en la fase lineal de la reacción, de tal manera que:

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

donde: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{TELOMERO} - Ct_{ALB})_{muestra} - (Ct_{TELOMERO} - Ct_{ALB})_{referencia}$

Un valor de LTR > 1 indica que la longitud promedio de los telómeros de esta muestra es mayor que la de la muestra de referencia. La referencia seleccionada para este estudio fue una mezcla de DNA de 5 mujeres sanas de 19 años. Un ejemplo de la determinación de la LTR se muestra en la figura 17. El valor final de la LTR es el promedio de las tres determinaciones.

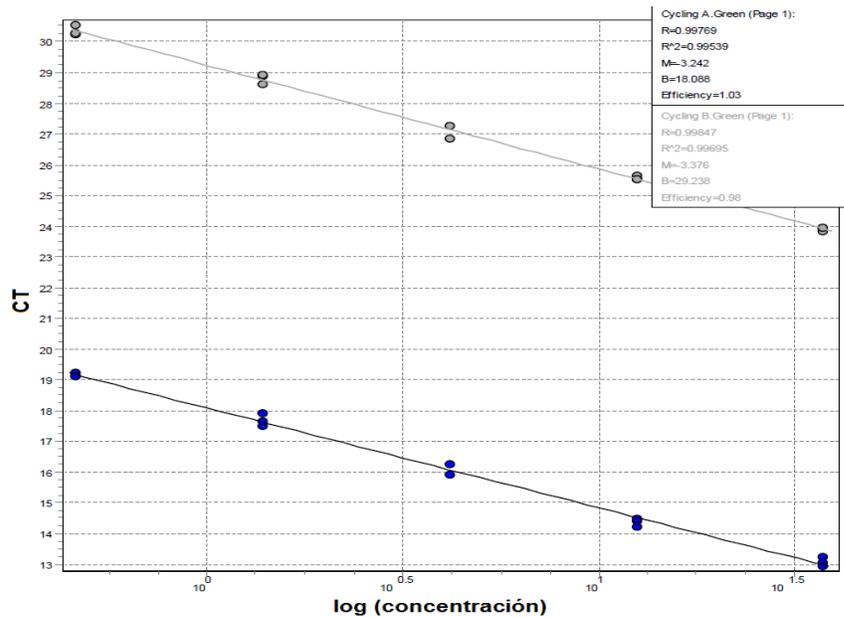
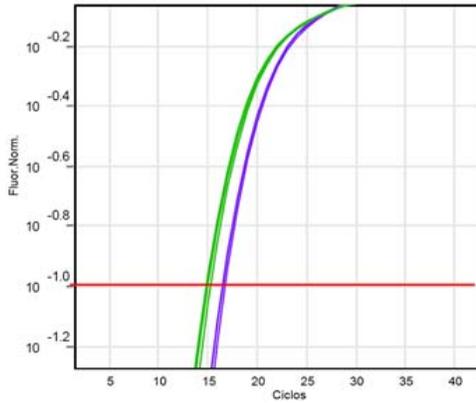


Figura 16. Las curvas estándar típicas obtenidas en cada corrida. En gris ALB, en azul telómeros. CT: ciclo al umbral de detección.

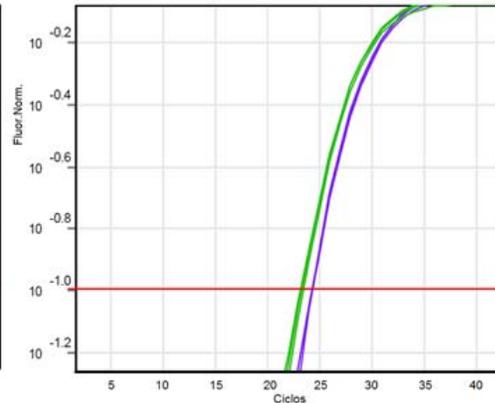
9.5 Análisis estadístico

La organización, descripción y el análisis de los datos se realizó en paquete estadístico *Stata 12* (*StataCorp, 2011*). Por la distribución no normal de los datos, se utilizó para las comparaciones del patrón de ICX y la LTR entre casos y controles la prueba de rangos señalados de Wilcoxon. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

a. Amplificación cuantitativa del DNA telomérico



b. Amplificación cuantitativa de ALB



c. Cálculo de la LTR.

$$\begin{aligned} Ct_{TELOMERO(MI)} &= 16.6 \\ Ct_{TELOMERO(MR)} &= 15.1 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Ct_{ALB(MI)} &= 24.3 \\ Ct_{ALB(MR)} &= 23.4 \end{aligned}$$

$$\Delta\Delta Ct = (16.6 - 24.3) - (15.1 - 23.4) = 0.6$$

$$LTR_{MI} = 2^{-0.6} = 0.66$$

Figura 17. Curvas de una corrida típica para la determinación de LTR. Línea verde: muestra de referencia (MR), línea morada: muestra de interés (MI), línea roja: umbral de detección (debe ser el mismo para ambos fragmentos). El equipo determina el ciclo al umbral (Ct) para cada muestra. En este ejemplo la MR es de una mezcla de DNA de 5 mujeres de 19 años y la MI es una muestra de una mujer de 89 años. Sus telómeros son en promedio 33% más cortos respecto a la muestra de referencia.

RESULTADOS

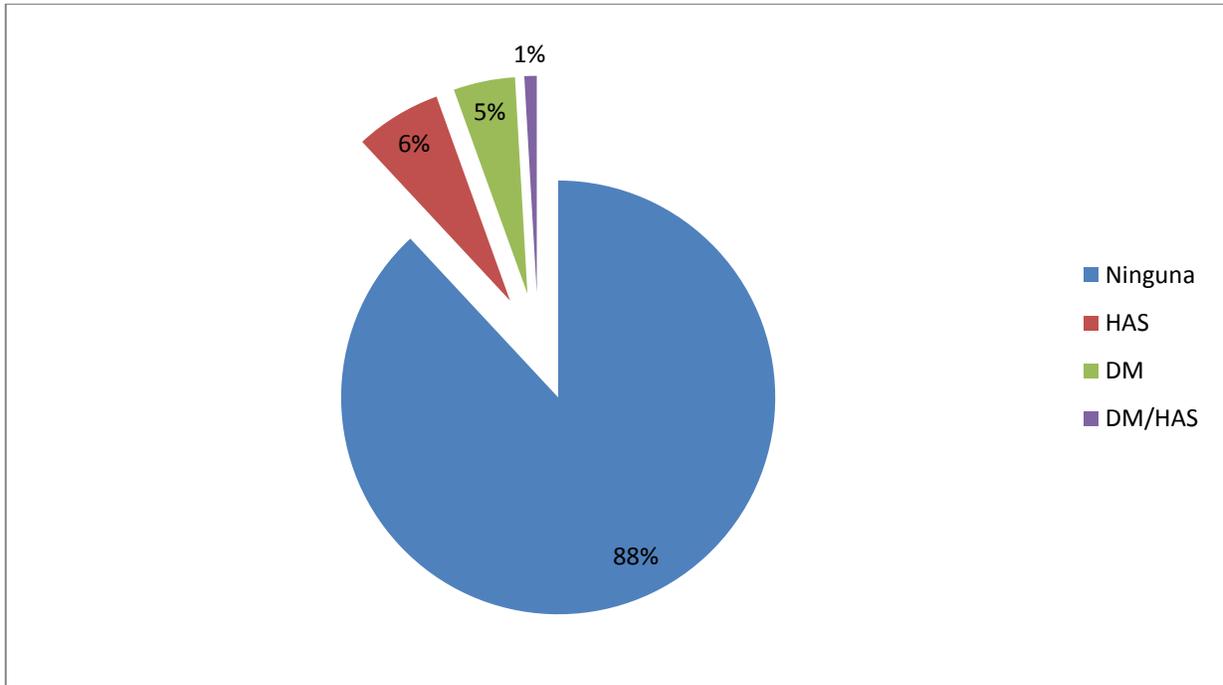
Sujetos

Se recibieron 148 muestras de sangre periférica de mujeres con AR de reciente diagnóstico colectadas en un periodo de 11 años; dos resultaron insuficientes para su estudio, 17 fueron no informativas para el análisis de ICX utilizando el gen *AR* (11.5%, recuperándose dos de ellas por análisis de un segundo marcador polimórfico, el *CNKSR2* en Xp22.12, que correlaciona con el perfil determinado por HUMARA) y en 21 la muestra fue tomada después de su ingreso a la clínica AR-TE (8-125 meses). Finalmente se incluyeron para el análisis los datos del patrón de ICX de 112 casos y 112 controles pareadas por edad y la determinación de la LT en 126 mujeres con AR y el mismo número de controles sin evidencia de EAI. La tabla 6 presenta la comparación de edad entre casos y controles (n 112). Las características clínicas de las mujeres con AR a su ingreso se resumen en la tabla 7, mientras que las gráficas 1 y 2 muestran las comorbilidades y medicamentos usados al momento de obtener el DNA.

EDAD EN LOS CASOS Y CONTROLES PARA ANÁLISIS DE ICX				
	AR 1	CONTROLES 1	AR2	CONTROLES 2
MEDIA EDAD	39.64 años	39.48 años	44.86 años	43.6 años
INTERVALO	18-79 años	19-78 años	22-89 años	22-89 años
MEDIANA	39 años	38 años	43 años	39.5 años

Tabla 6. Edad de casos y controles para análisis del patrón de ICX.

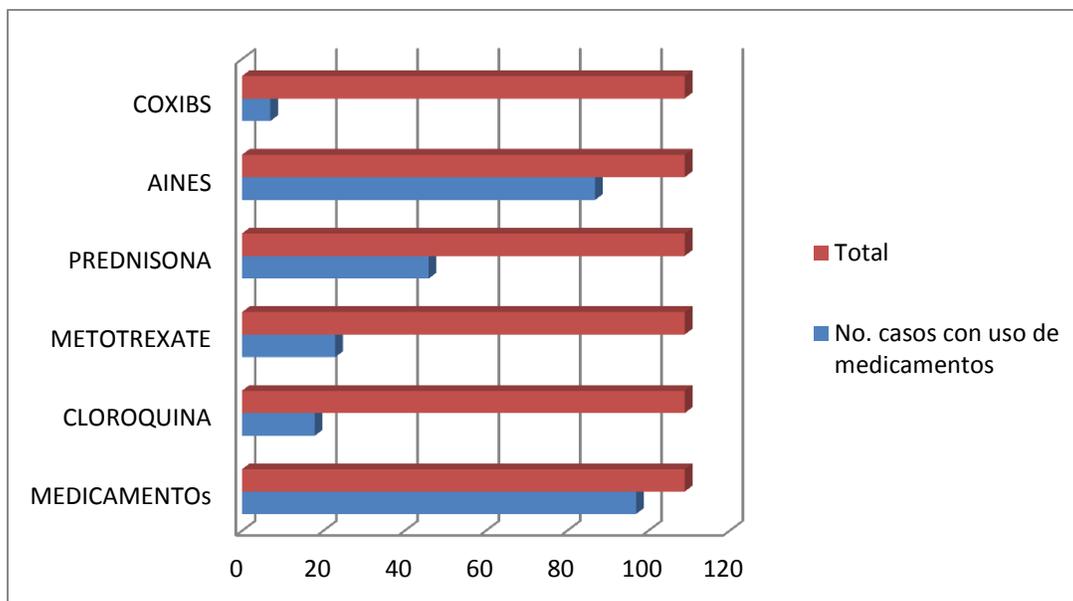
Durante el seguimiento 12 mujeres con AR salieron de la cohorte quedando 118 casos potenciales para muestra de seguimiento, al momento de este estudio se contó con la segunda muestra de DNA de 66 casos para el análisis de ICX y 80 para la determinación de la LT, comparados con un segundo grupo control (independiente del primer grupo de mujeres sanas). El intervalo entre la primera y segunda muestra fue de 2.4 a 10.4 años con mediana de 7 años.



Gráfica 1. Comorbilidades en mujeres con AR al momento de la primera muestra de DNA. HAS: Hipertensión arterial sistémica, DM: Diabetes mellitus.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE MUJERES CON AR AL INGRESO A LA CLÍNICA AR-TE	
EDAD PRESENTACIÓN AR	39.17 años (18.2-78.5 años)
TIEMPO DE EVOLUCIÓN SX-INGRESO	5.6 meses (0.8-13.3 meses)
TIEMPO DE EVOLUCIÓN A LA TOMA	1.36 años (0.07-11 años; mediana 0.45)
VSG	31.24 mm/h (2-102, mediana 26.5)
PCR	1.95 mg/dl (0.02-14.7, mediana 0.8)
FR POSITIVO	97/112 (86.6%)
TÍTULOS DE FR	449.1 U/ml (9-3430, mediana 182)
AAPCC POSITIVOS	102/112 (94.4%)
TÍTULOS DE AAPCC	658.6 U/ml (1.3-4350, mediana 356.3)
ÍNDICE DE ACTIVIDAD DAS28	5.98 puntos (2.1-8.66, mediana 6.04)

Tabla 7. Datos clínicos y bioquímicos promedio de las mujeres con AR a su ingreso a la clínica AR-TE (n 112). VSG: *velocidad de sedimentación globular*, PCR: *proteína C reactiva*, FR: *factor reumatoide*, AAPCC: *anticuerpos anti-péptidos citrulinados cíclicos*.



Gráfica 2. Terapéutica empleada en mujeres con AR al momento de la muestra inicial.

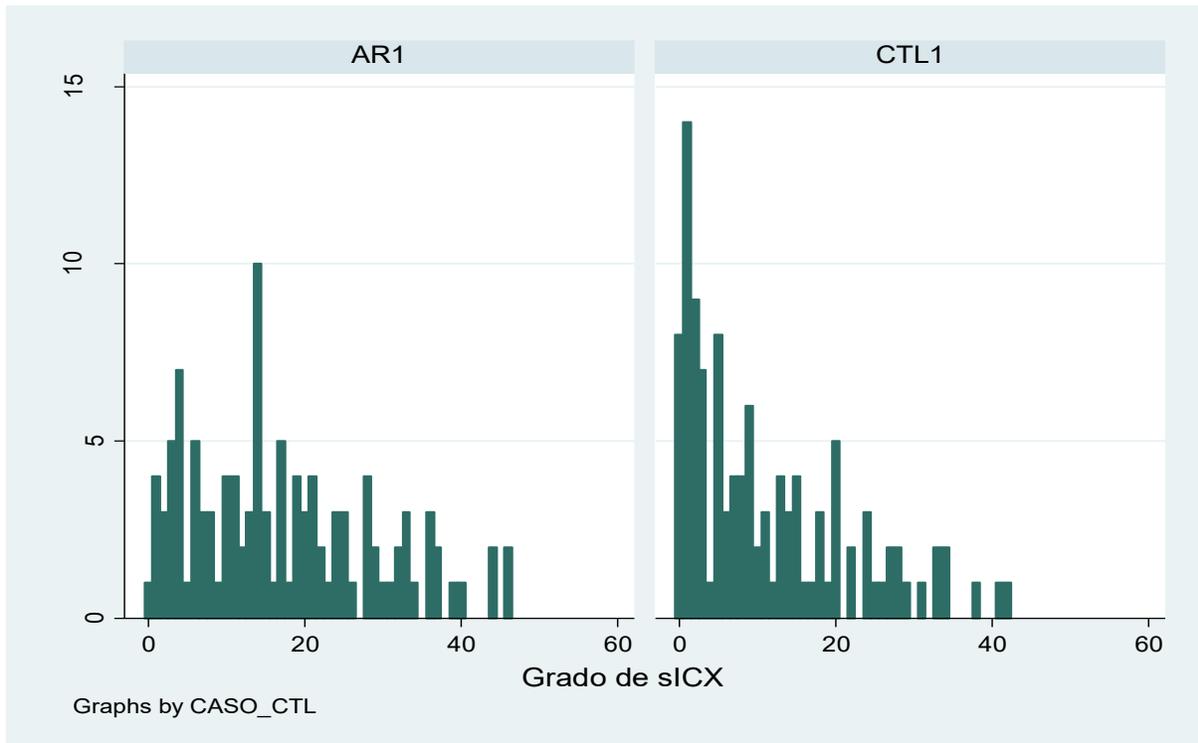
Patrón de inactivación del cromosoma X en muestra inicial

Distribución del sICX en casos y controles (AR1 vs CTL1)

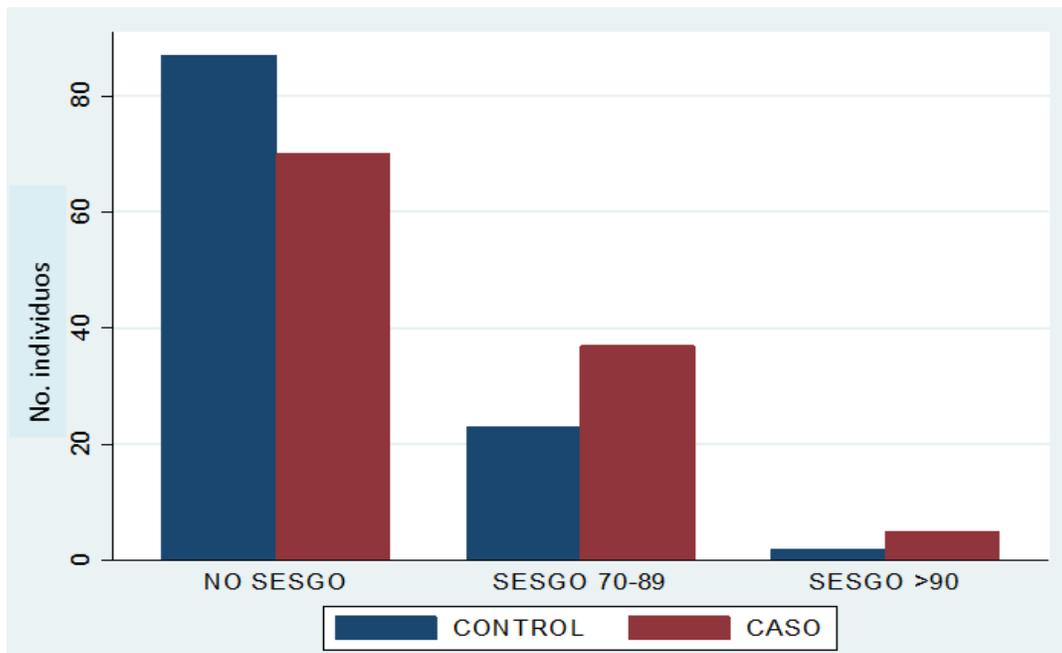
La gráfica 3 presenta la distribución del perfil de ICX en casos y controles, con un GS promedio de 67% (DE 11.75) en los casos y 61% (DE 10.59) en los controles, ambos sin sICX. Entre las mujeres con AR 70 tuvieron inactivación al azar (62.5%), 37 sICX (33%) y 5 sICX extremo (4.5%); mientras que de las controles 87 tuvieron GS entre 50-69% (77.7%), 23 sICX (20.5%) y 2 sICX extremo (1.8%) (gráfica 4). En total 67 muestras evidenciaron sICX, un 62.7% fueron de casos (n 42) y 37.3% de controles (n 25).

El grado de sICX fue significativamente mayor en pacientes con AR respecto a las controles ($P < 0.0001$) (gráfica 5), diferencias que se mantienen cuando se dicotomizó el grado de sICX entre los dos grupos (OR 2.08, IC 95% 1.11-3.93, χ^2 6.15, $P = 0.013$) (gráfica 6). En el análisis por regresión logística el sICX de 70 a 89% mostró una asociación significativa con AR (OR 1.99, IC 95% 1.08-3.67,

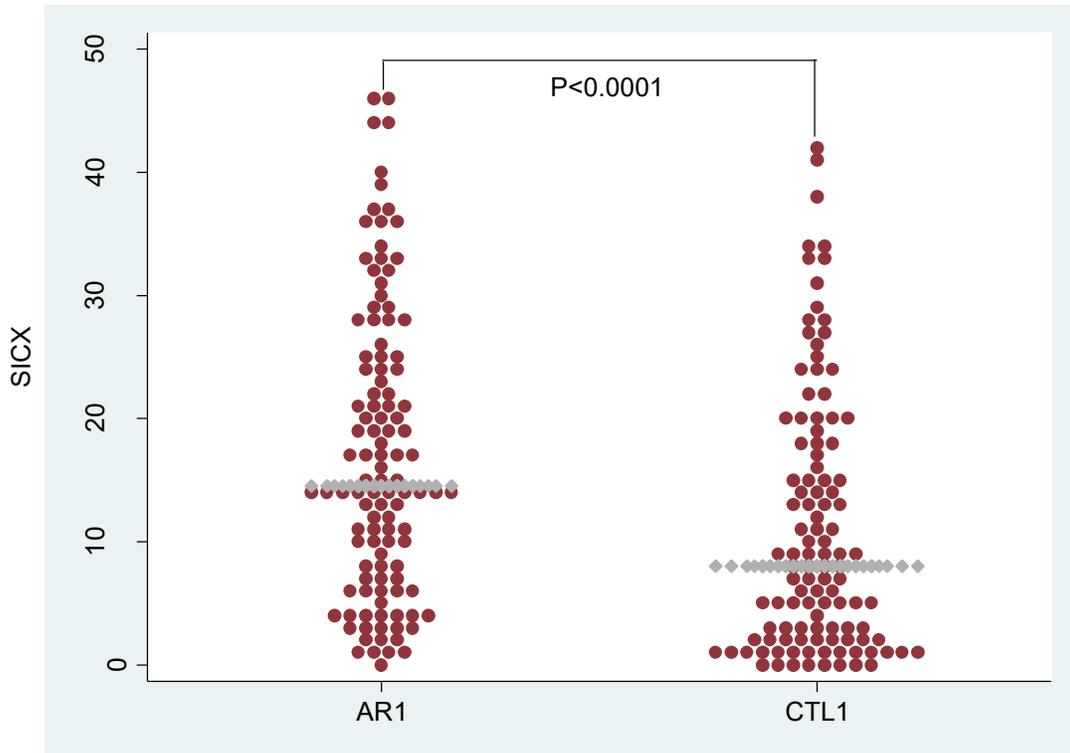
$P=0.026$), con esta misma prueba el aumento en el riesgo para AR por unidad de sesgo fue de 1.04 (IC 95% 1.02-1.07, $P<0.001$).



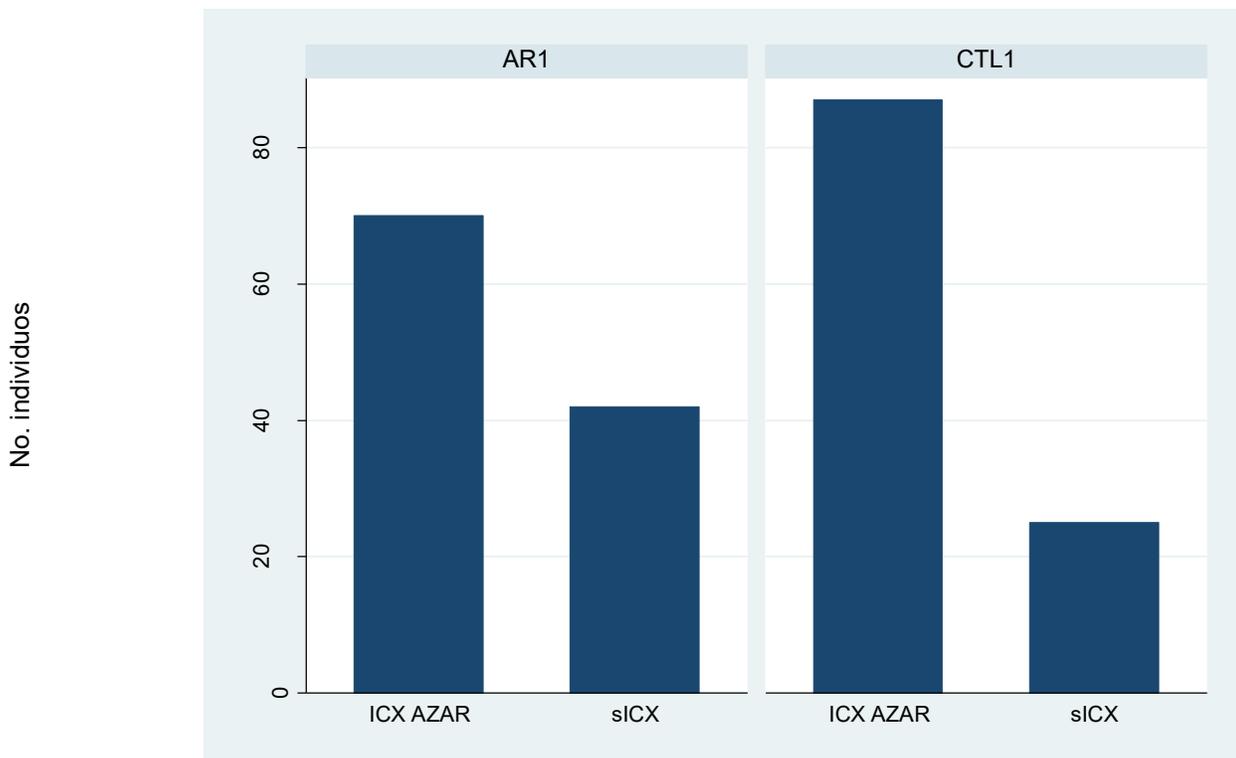
Gráfica 3. Distribución del grado de sICX en casos en mujeres con AR de reciente diagnóstico y controles sanas. AR1: muestra inicial de casos, CTL1: controles sanas.



Gráfica 4. Comparación del grado de sICX en casos y controles (AR1 vs CTL1).



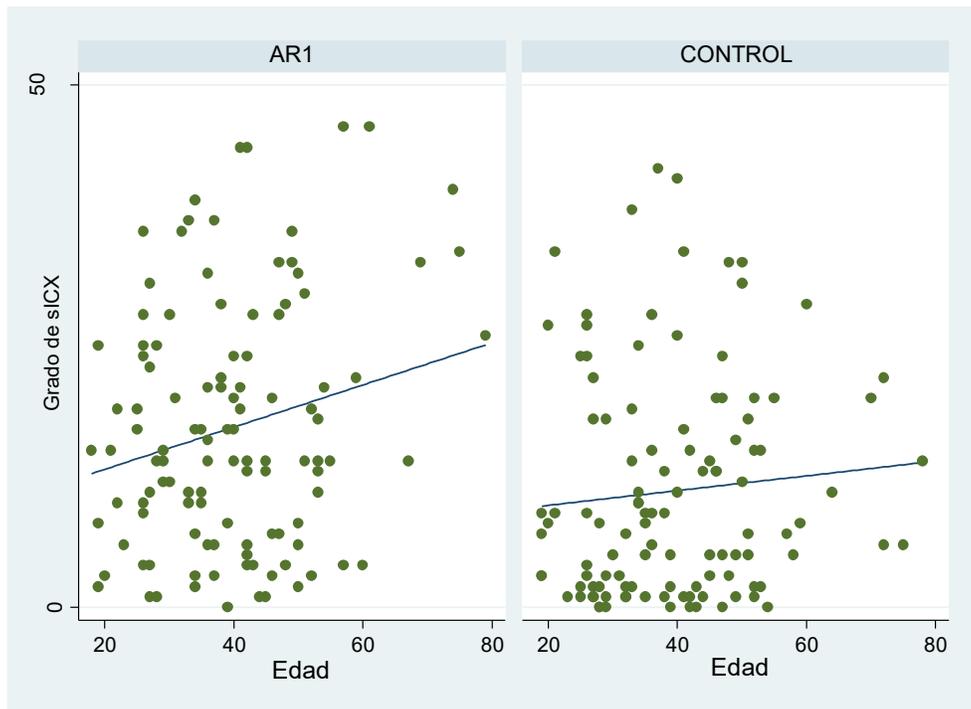
Gráfica 5. Diferencias en el patrón de ICX entre casos y controles. Prueba de suma de rangos de Wilcoxon, $Z = -4.23$, $P < 0.0001$.



Gráfica 6. Inactivación al azar y sICX en mujeres con AR y controles sanas.

Relación del sICX con la edad en casos y controles

La distribución por edad del sICX mostró amplia dispersión en los dos grupos analizados, sin encontrar correlación se observó una tendencia de mayor frecuencia de sICX conforme incrementa la edad en ambos grupos que no fue estadísticamente significativa (total de observaciones (224) $r=0.11$, $P=0.08$; casos (112) $r=0.12$, $P=0.18$).



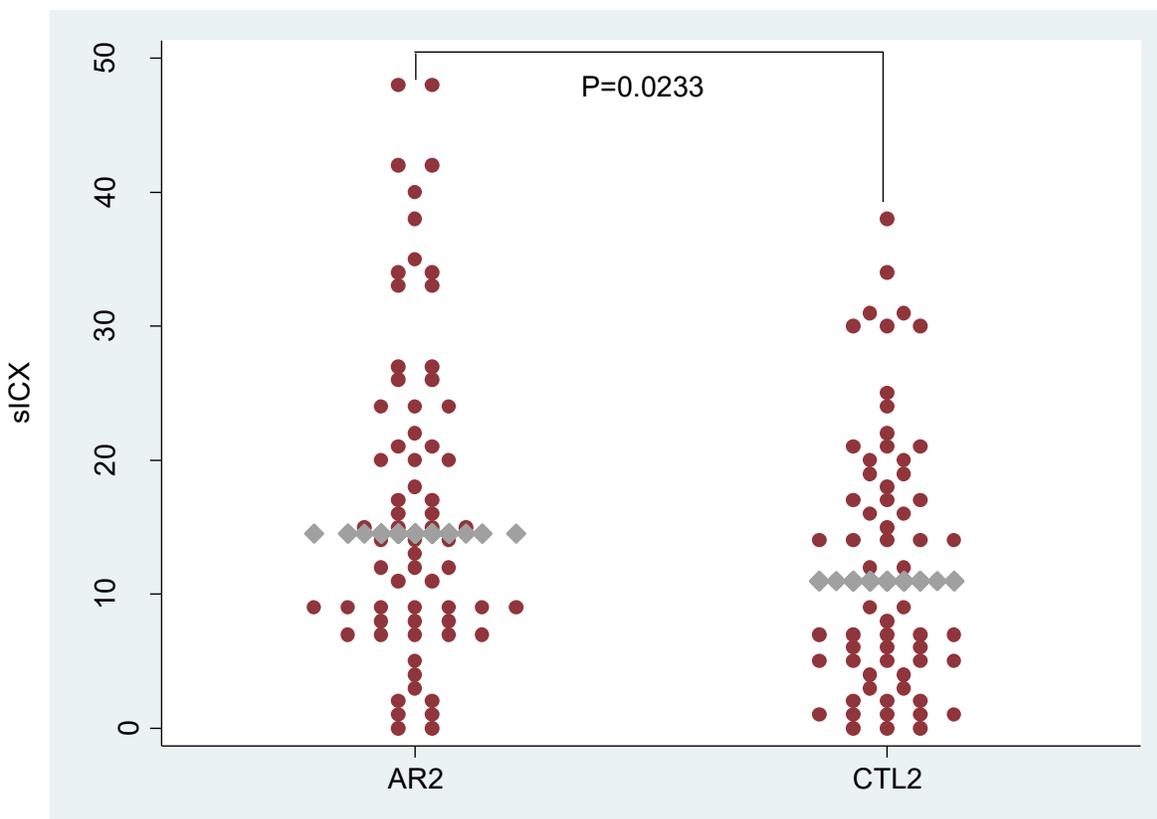
Gráfica 7. Patrón de sICX en relación con la edad en casos y controles.

Patrón de inactivación del cromosoma X en la muestra de seguimiento

Distribución del sICX en casos y controles (AR2 vs CTL2)

En la segunda muestra de DNA de las mujeres con AR observamos un grado de sICX promedio de 67% (DE 12.15), mientras que en las controles fue de 62% (DE 9.63). Las diferencias entre ambos grupos fueron significativas aplicando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon ($Z= -2.26$, $P=0.023$), manteniéndose los

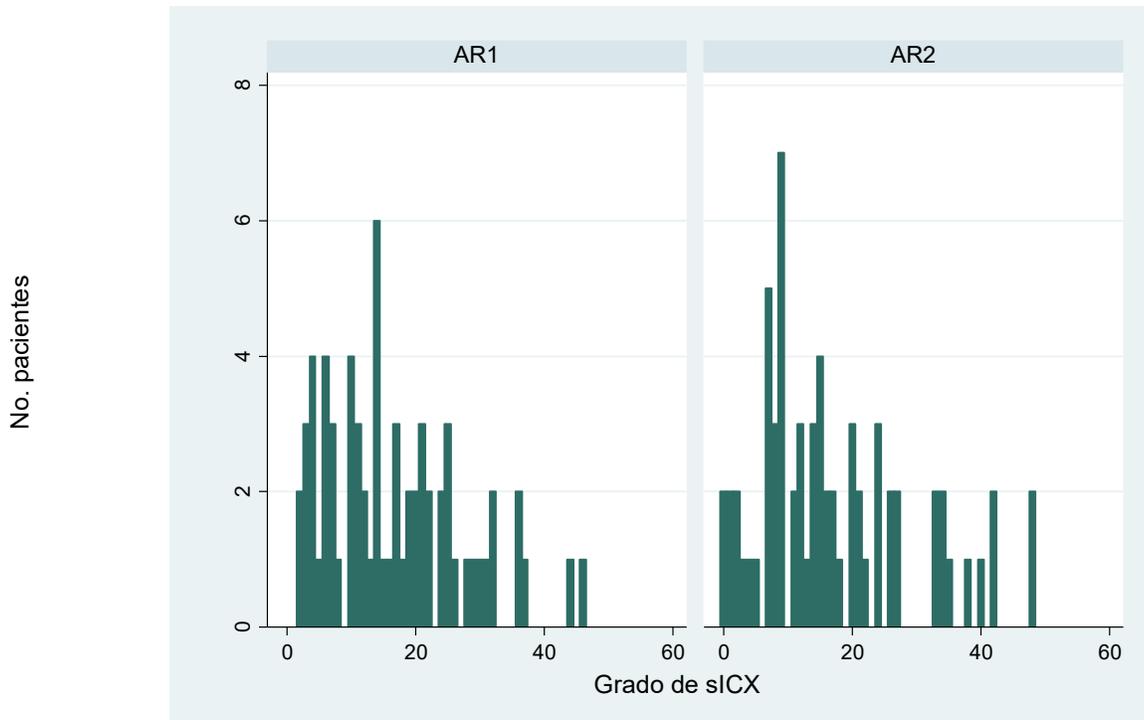
resultados de la comparación inicial (gráfica 8). No se encontró correlación entre la frecuencia de sICX y la edad en ninguno de los dos grupos.



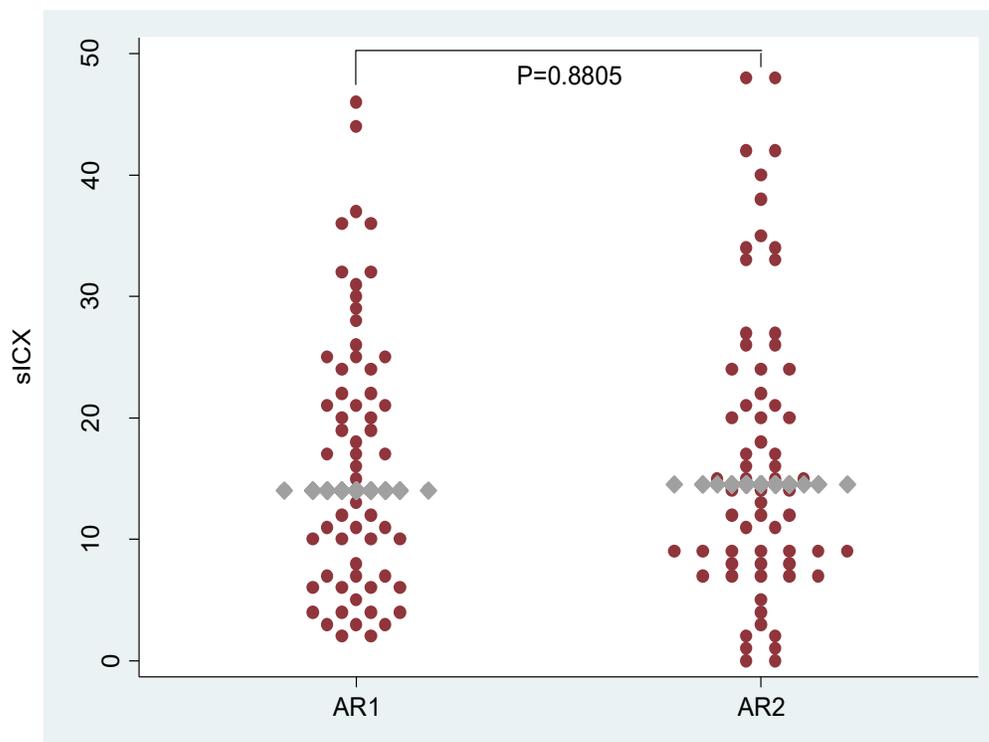
Gráfica 8. Patrón de ICX en la muestra de seguimiento de mujeres con AR (AR2) y un segundo grupo de mujeres sanas (CTL2).

Cambios en el tiempo del patrón de ICX en mujeres con artritis reumatoide

Se comparó el patrón de ICX de 66 mujeres con AR al diagnóstico y durante el seguimiento, en la muestra inicial el grado de sICX promedio fue de 66.6% (DE 10.67) y en la de seguimiento de 67% (DE 12.15), con una distribución similar entre ambas muestras (gráfica 9). No se encontraron diferencias significativas en el análisis antes y después (gráfica 10).



Gráfica 9. Distribución del grado de sICX en las mujeres con AR al ingreso a la clínica (AR1) y después de un intervalo de seguimiento (AR2).

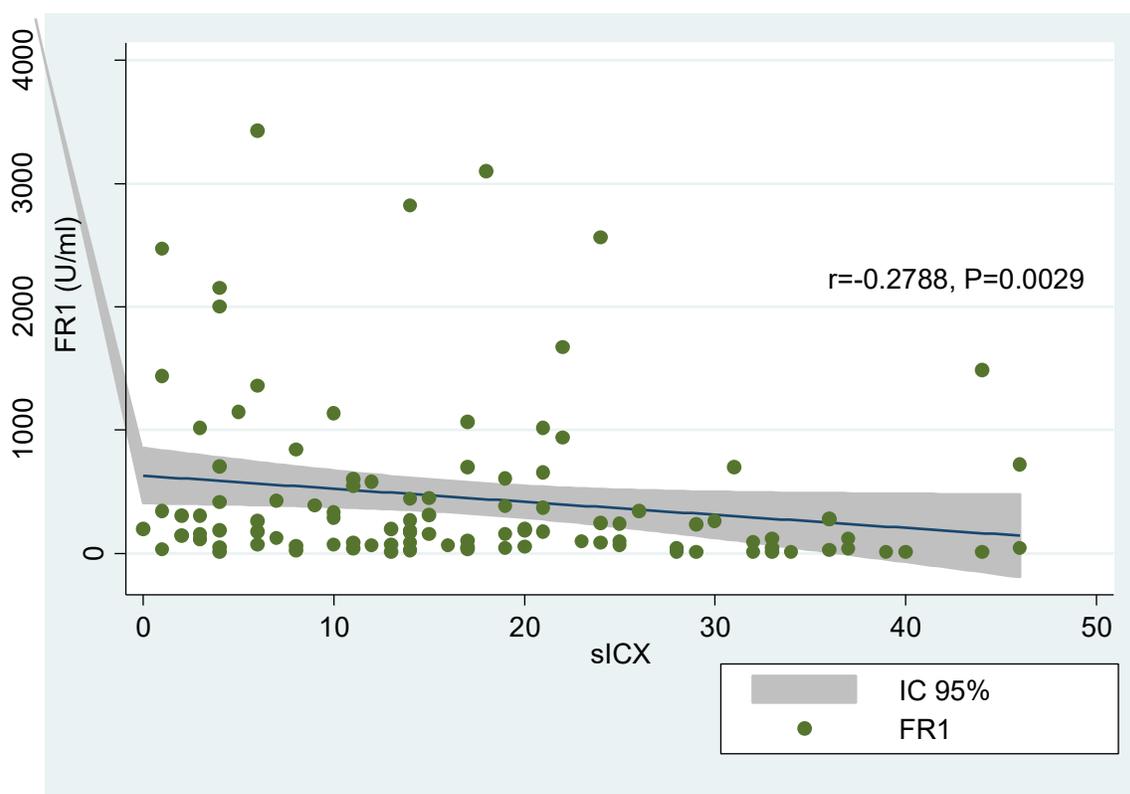


Gráfica 10. Patrón de ICX de mujeres con AR antes y después. AR1: Muestra al diagnóstico, AR2: Muestra de seguimiento.

Patrón de inactivación del cromosoma X y marcadores de la actividad

Se realizó el análisis de correlación entre el sICX y marcadores de la actividad como velocidad de sedimentación globular (VSG) y proteína C reactiva (PCR) sin encontrarse asociación en ninguno de los dos casos ($r = -0.0767$, $P = 0.42$ y $r = -0.0708$, $P = 0.45$, respectivamente).

Entre las mujeres con AR al diagnóstico, 97 presentaron FR positivo (86.6%) con una media de 449.1 U/ml, no se encontró asociación entre la positividad o negatividad de este marcador y la presencia o ausencia de sICX ($\chi^2 3.74$, $P = 0.053$). Aunque el análisis de correlación entre el grado de sICX y los valores del FR mostró una correlación negativa débil ($r = -0.278$, $P = 0.0029$), no se consideró una diferencia clínicamente relevante ya que la cuantificación de FR fue de 8 hasta 245 veces su valor normal (0-14 U/ml) en más de la mitad de la muestra (67/112).



Gráfica 11. Correlación de los valores de factor reumatoide al ingreso (FR1) y el sICX en la muestra inicial en mujeres con AR.

Los AAPCC fueron positivos en 102 casos (94.4%) al ingreso con una media de 658.6 U/ml, sin encontrarse correlación entre los valores de estos y el grado de sICX ($r = -0.1915$, $P = 0.043$). Respecto al índice de actividad DAS28 tampoco se encontró correlación entre el grado de actividad (ausente, baja, moderada o alta) y el sICX, considerando que 83 de los casos (74.1%) fueron clasificados con alta actividad.

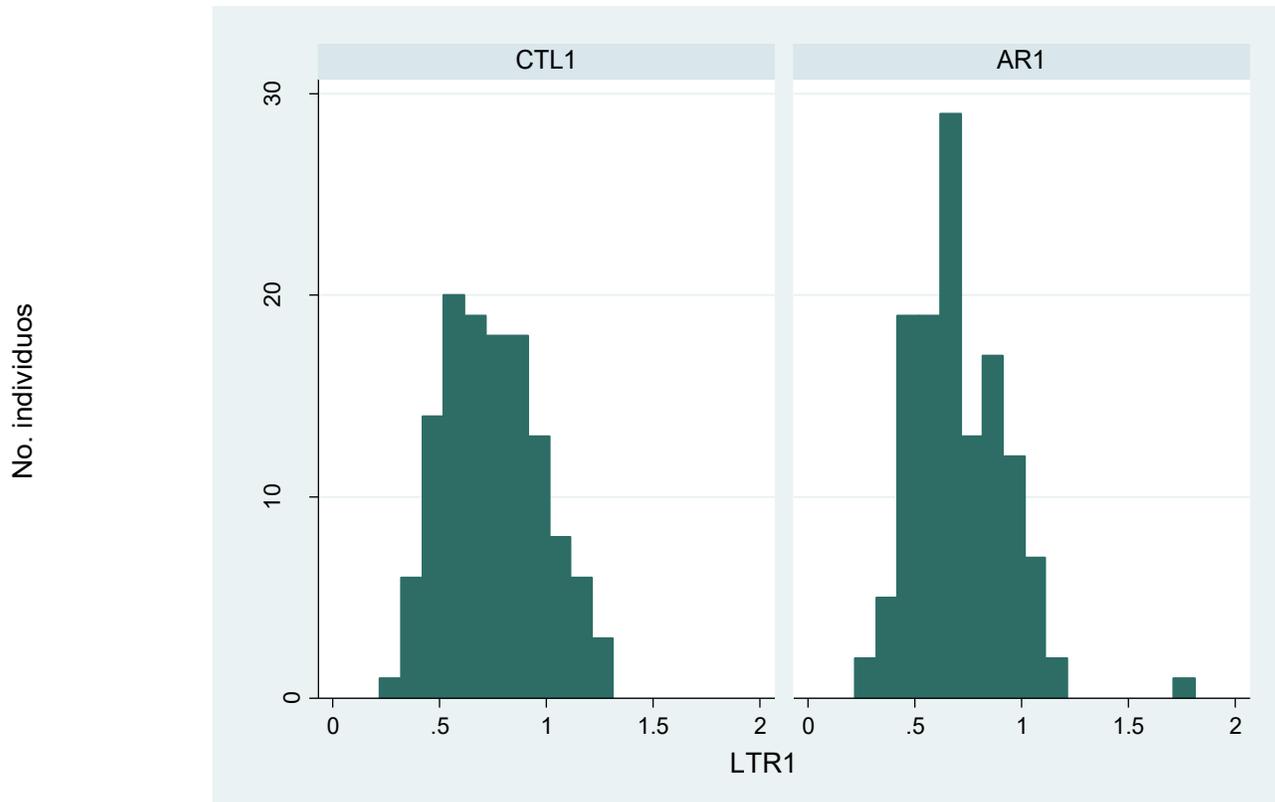
Se dicotomizó la muestra de mujeres con AR en aquellas que utilizaban fármacos modificadores de la enfermedad (FARME) y las que no tenían tratamiento o estaban tratadas con antiinflamatorios (NO FARME), no se encontró relación entre el uso de los fármacos y el grado de sICX al momento de la toma de muestra inicial ($Z = -0.032$, $P = 0.97$). En la muestra de seguimiento tampoco se encontró correlación ($Z = 0.484$, $P = 0.62$) además de que se redujo el número de pacientes que continuaban siendo tratadas con FARME (19.7% vs 29.5% en AR1).

Longitud telomérica relativa en muestra inicial

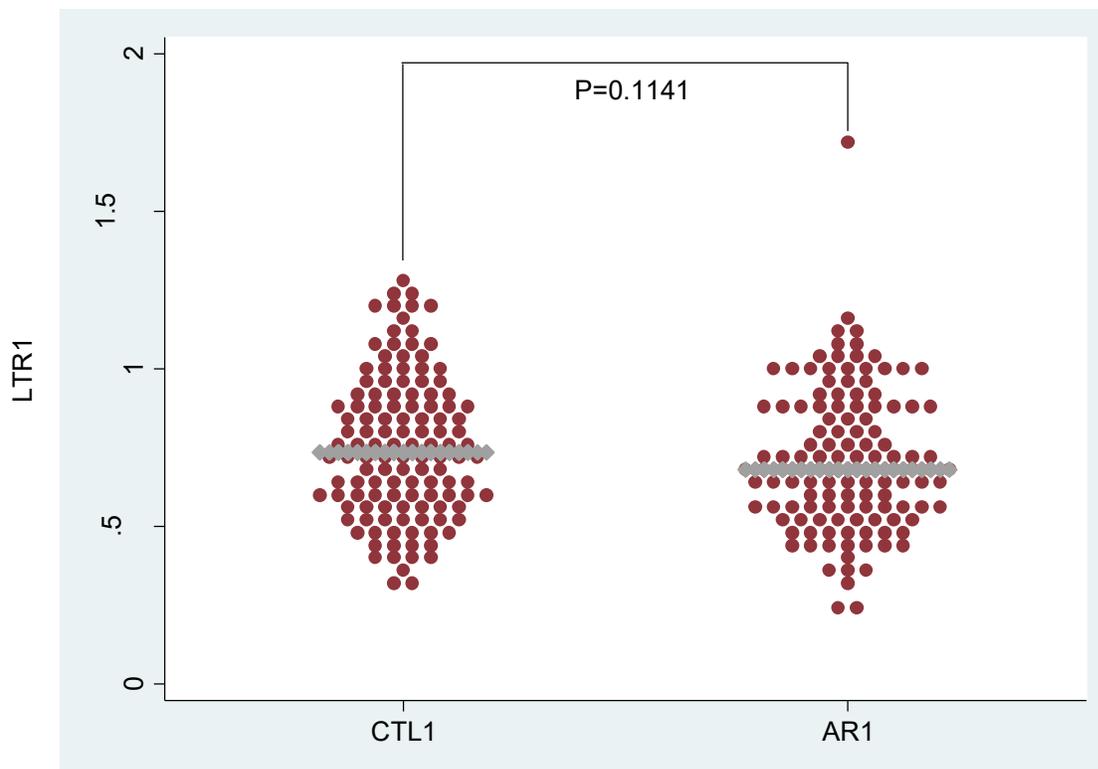
Distribución de la LTR en casos y controles

Se determinó la LTR en 126 mujeres con AR encontrándose una media de 0.70 (DE 0.22), mientras que en las 126 controles sin EAI la media fue de 0.75 (DE 0.22). La edad promedio en los casos fue de 39.57 años (rango de 16 a 79), comparable a la de los controles de 39.6 años (rango 17 a 78 años). La distribución de la LTR en ambos grupos se muestra en la gráfica 12, los casos presentaron distribución no normal por lo que se aplicó estadística no paramétrica para el análisis.

Cuando se comparó la LTR de casos vs controles no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($Z = 1.58$, $P = 0.1141$) (gráfica 13).



Gráfica 12. Distribución de LTR en casos y controles (n 126 por grupo).



Gráfica 13. Comparación de la LTR en casos y controles en muestra inicial.

Correlación de la LTR1 y otros biomarcadores en mujeres con AR

Se buscó correlación entre el sICX y la LTR en los casos sin encontrarse significancia ($r=0.04$, $P=0.62$), hallazgo que se mantuvo aun cuando se comparó la LTR de los casos con ICX al azar (GS 50-69) y aquellos con GS mayor o igual a 70 ($Z=-0.56$, $P=0.57$).

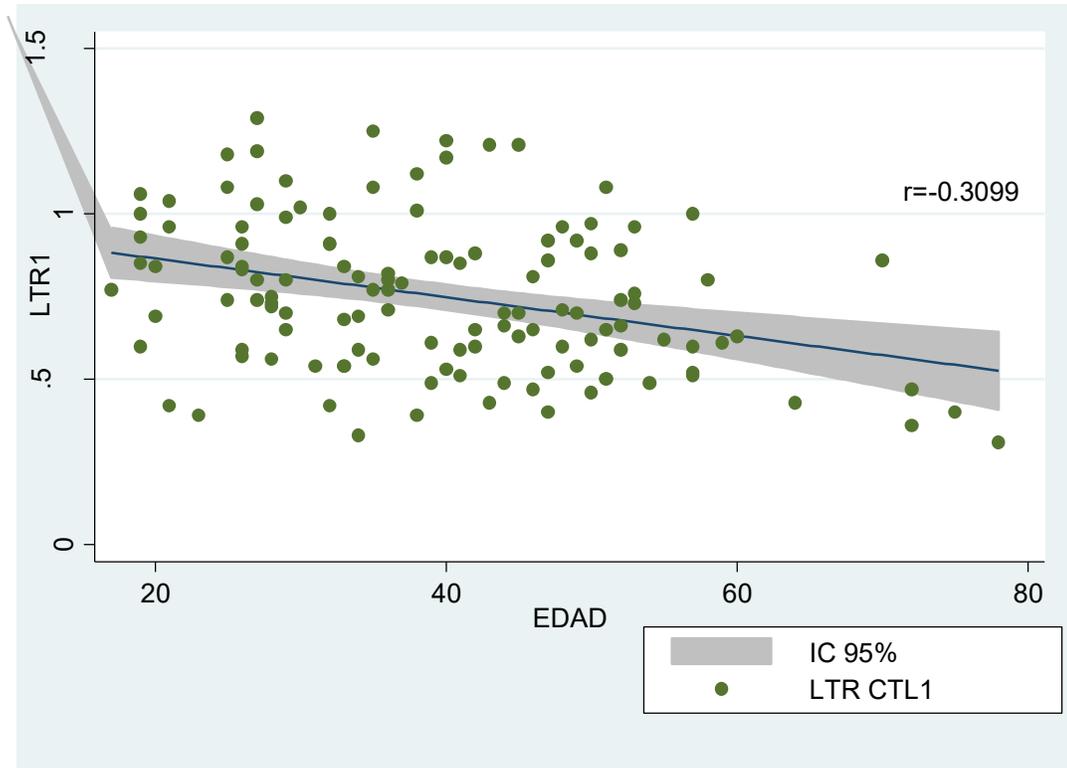
Asimismo, los niveles de marcadores como VSG o PCR fueron independientes de la LTR ($r=0.06$, $P=0.48$ y $r=0.13$, $P=0.14$, respectivamente). También los niveles de FR y AAPCC son independientes de la LTR en la muestra analizada ($r=0.03$, $P=0.74$ y $r=0.008$, $P=0.93$, respectivamente).

Se clasificaron las pacientes con respecto al tratamiento y no hubo diferencias entre la LTR de aquellas que estuvieron con FARME y las que no ($Z=-0.22$, $P=0.82$).

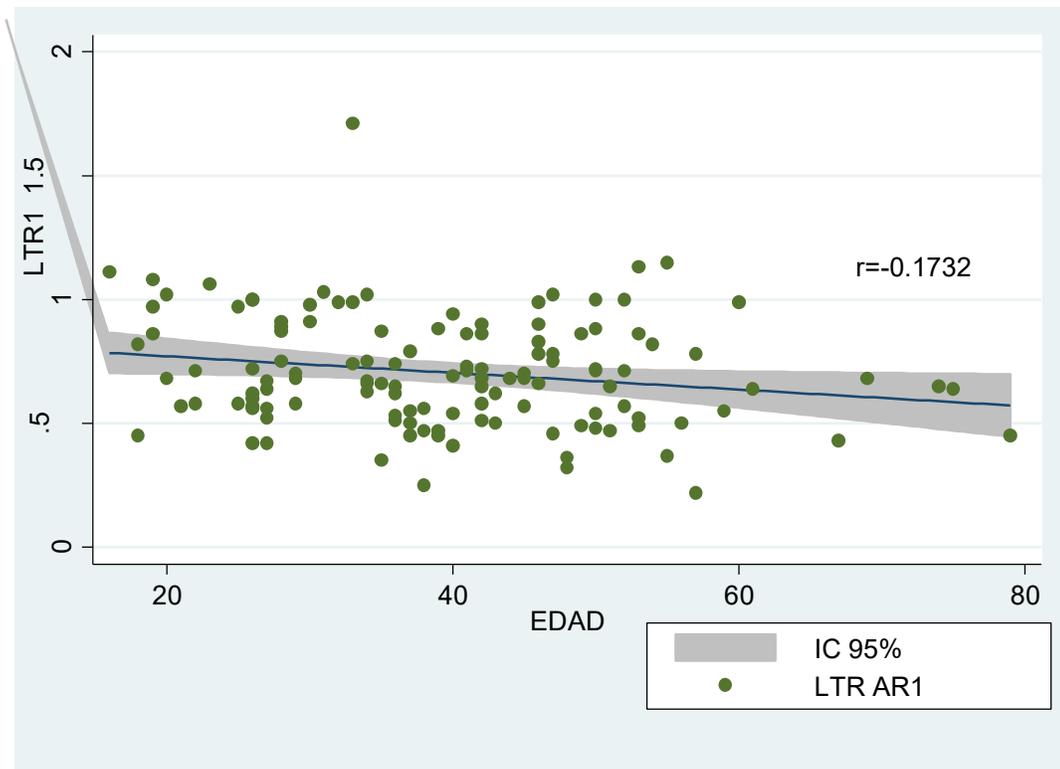
Relación de la LTR1 con la edad en casos y controles

En el grupo de controles sin EAI, la LTR correlacionó significativamente de manera negativa con la edad ($r=-0.3099$, $P=0.0004$) (gráfica 14); mientras que en los casos se encontró una tendencia de la LTR a disminuir conforme avanza la edad que no alcanzó significancia ($r=-0.1732$, $P=0.0525$) (gráfica 15).

Al tratarse de dos grupos independientes, se hizo la correlación de la LTR con la edad utilizando a los dos grupos control (CTL1 y CTL2), manteniéndose la relación inversa entre las dos variables ($r=-0.2214$, $P=0.0014$).



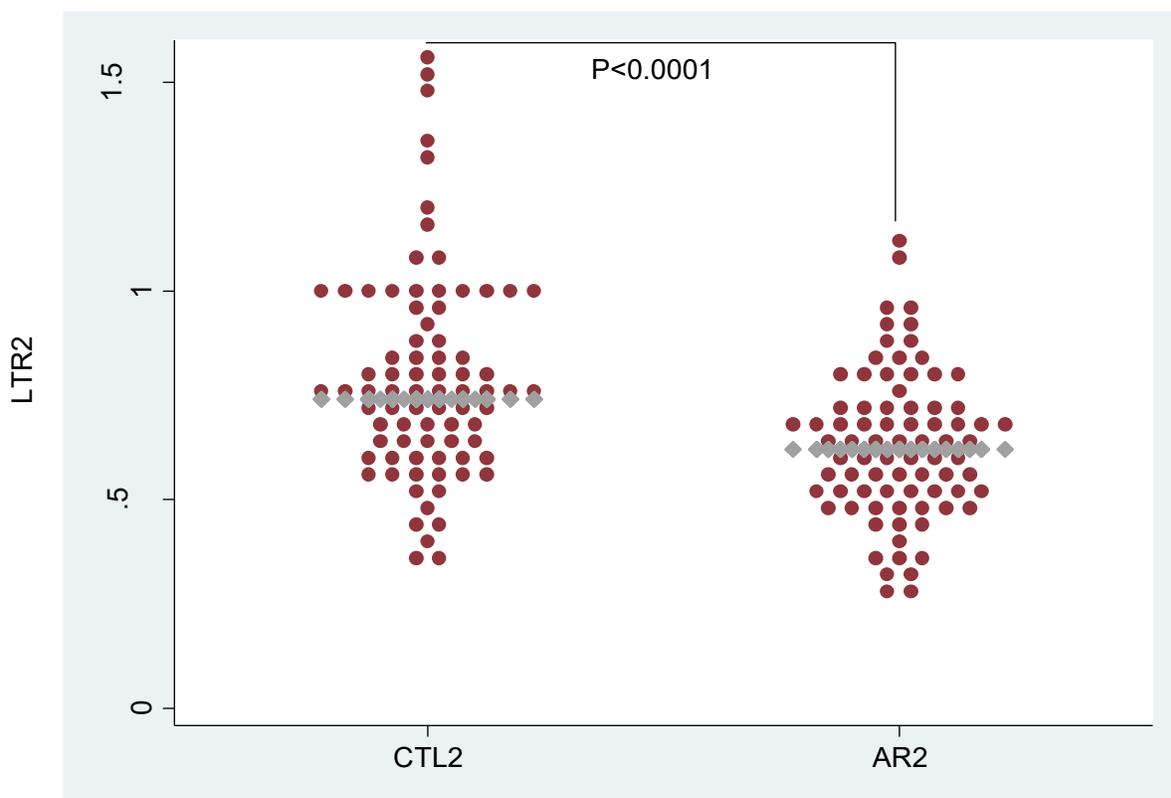
Gráfica 14. Distribución de la LTR con relación a la edad en mujeres sin EAI de la muestra inicial (CTL1).



Gráfica 15. Distribución de la LTR con relación a la edad en mujeres con AR al diagnóstico (AR1).

LTR en casos y controles (AR2 vs CTL2)

Determinada la LTR de 80 mujeres con AR se encontró un promedio de 0.62 (DE 0.17) comparado con el 0.78 (DE 0.25) de los controles. El análisis entre ambos grupos con la prueba de suma de rangos de Wilcoxon mostró diferencia significativa ($Z=4.38$, $P<0.0001$) que se representa en la gráfica 16.



Gráfica 16. Comparación de la LTR en casos y controles en la muestra de seguimiento.

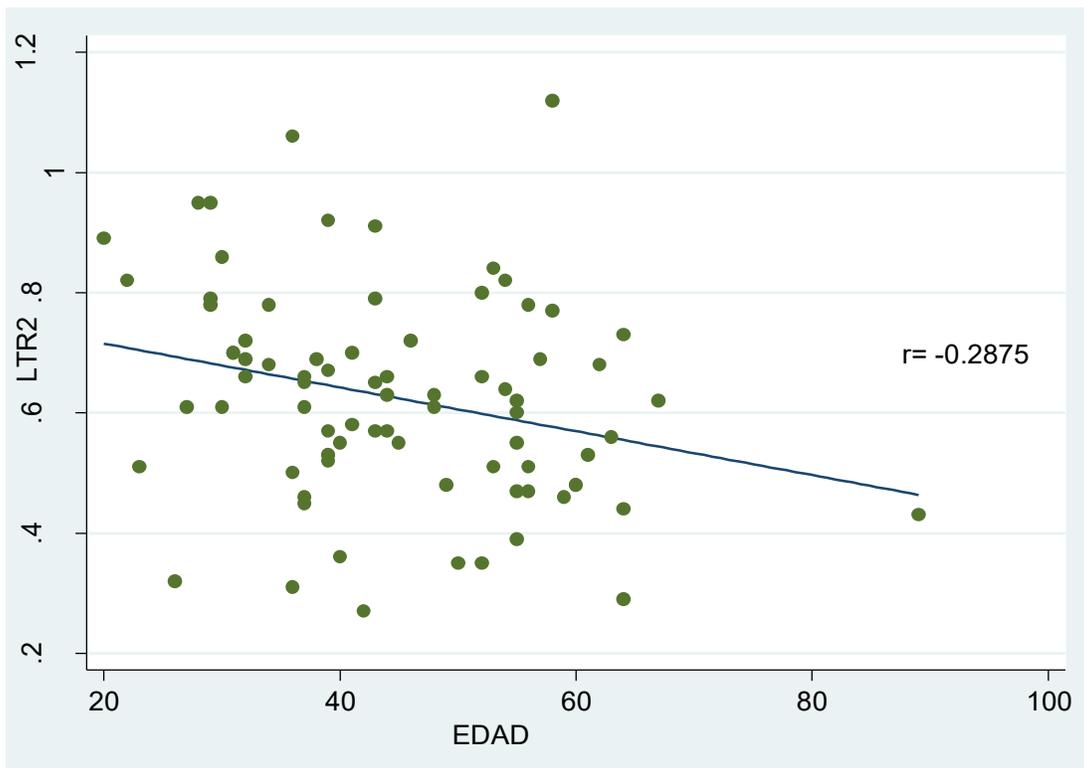
LTR2 en casos y correlación con marcadores de actividad

Al igual que en la muestra inicial (AR1), los marcadores de actividad (VSG y PCR) y los marcadores de enfermedad (FR y AAPCC) fueron independientes de la LTR en la muestra de seguimiento (AR2).

Se hizo el análisis de correlación de la LTR2 con el grado de sICX de casos y controles sin encontrar asociación ($r = -0.11$, $P = 0.1788$).

Correlación de la LTR2 y la edad en mujeres con AR

Se encontró una significativa relación inversa entre la LTR y la edad en la muestra de seguimiento de mujeres con AR ($r = -0.28$, $P = 0.0097$) (gráfica 17).

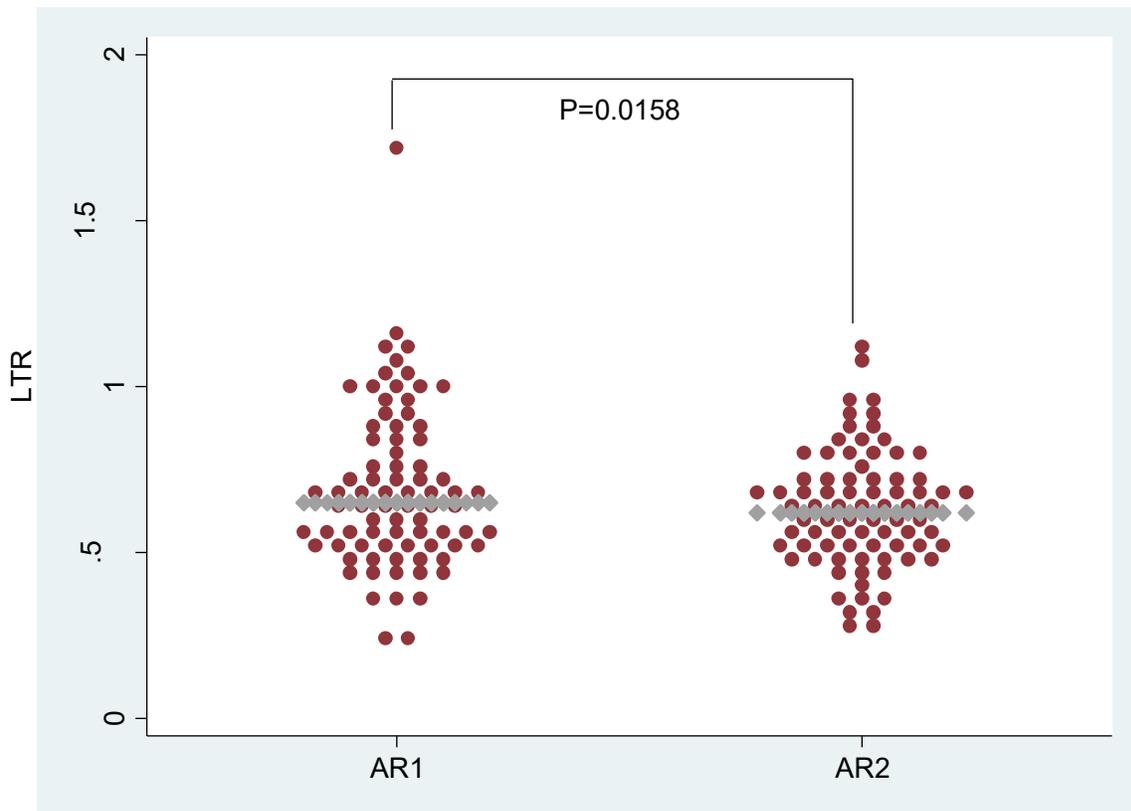


Gráfica 17. Correlación entre la LTR y la edad en la muestra de seguimiento de los casos.

Cambios en el tiempo de la longitud telomérica relativa en mujeres con AR

La muestra para el análisis antes y después de la LTR fue de 80 mujeres con AR, siendo la LTR promedio de la muestra inicial de 0.68 (DE 0.24) y de 0.62 (DE 0.17) en la muestra de seguimiento. Se encontró diferencia significativa entre ambas con disminución de la LTR en la muestra de seguimiento al compararse

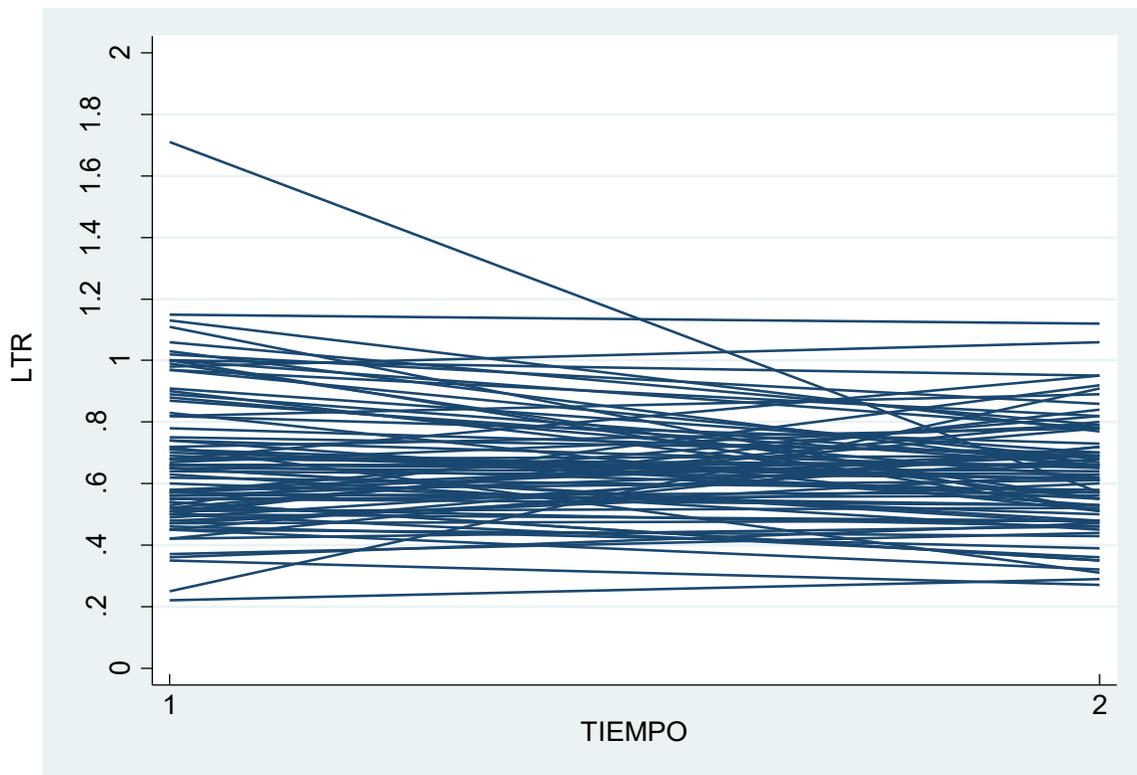
con la prueba de suma de rangos señalados de Wilcoxon para muestras pareadas ($Z = -2.413$, $P = 0.0158$) (gráfica 18).



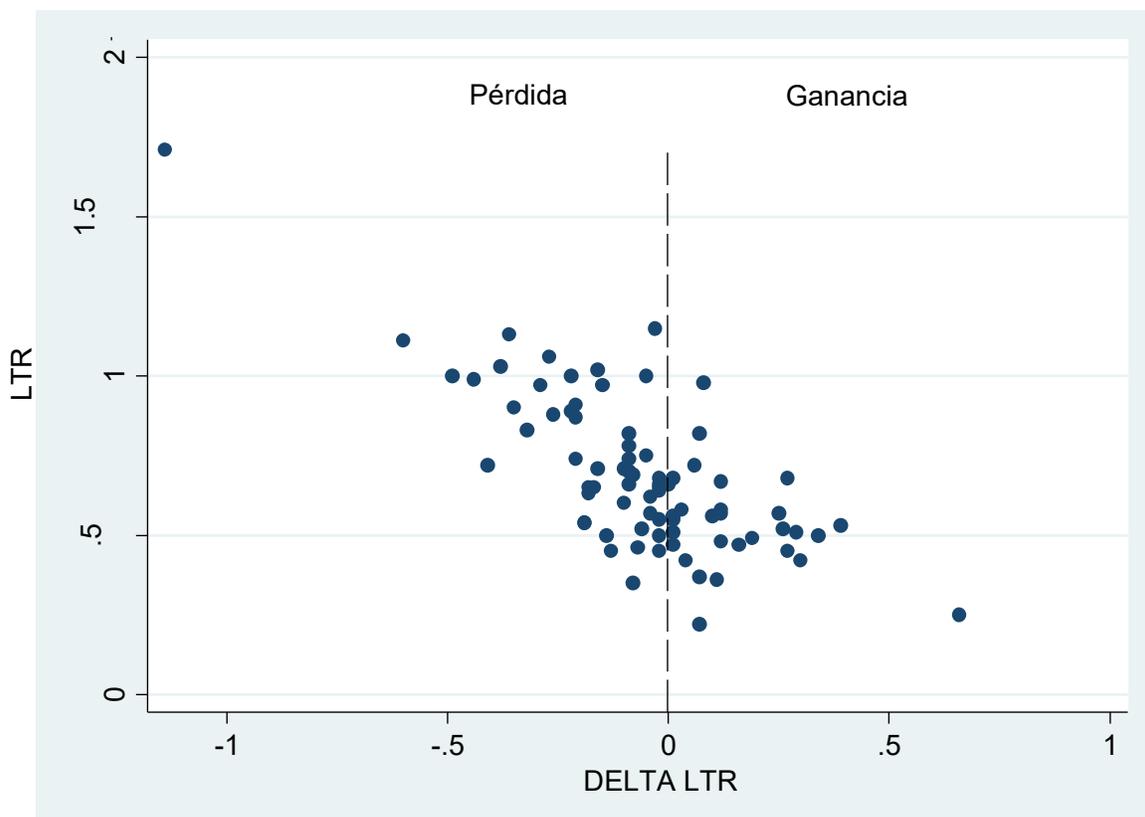
Gráfica 18. Comparación de la LTR entre la muestra inicial y la muestra de seguimiento.

Se valoró el cambio en el tiempo de la LTR individualmente, donde 50 casos disminuyeron la LTR (62.5%), 29 aumentaron (36.25%) y 1 no presentó cambios (1.25%) (gráfica 19). La magnitud del cambio de la LTR en el tiempo (Δ LTR) fue de -0.05 en promedio (DE 0.24), donde la mayoría de los casos ($n = 66$, 82.5%) tuvo Δ LTR de -0.2 a 0.2 (gráfica 20). Entre los casos que aumentaron su LTR la Δ LTR máxima fue de 0.66, comparada con la Δ LTR máxima de 1.14 entre los que la disminuyeron.

En el análisis de correlación se encontró una relación positiva entre la LTR1 y la LTR2 en las mujeres con AR ($r = 0.3876$, $P = 0.0004$).



Gráfica 19. Cambio en el tiempo de la LTR entre la LTR1 y LTR2 de mujeres con AR.



Gráfica 20. Magnitud del cambio en el tiempo de la LTR en mujeres con AR.

DISCUSIÓN

Aproximadamente un 5% de la población en los países occidentales está afectada por alguna EAI y más del 80% de estos pacientes son mujeres. En el caso de la AR el género femenino corresponde a un 60-80% de los casos. Obedeciendo al modelo etiológico de las enfermedades complejas, los factores genéticos asociados al ambiente, factores neuroendócrinos y la influencia hormonal determinan una falla en el correcto reconocimiento de los antígenos propios, que lleva el riesgo potencial del desarrollo de la autoinmunidad.

Pocas hipótesis se han propuesto para explicar la prevalencia de mujeres afectadas por EAI, mientras que no hay evidencia convincente que sustente exclusivamente alguna de estas. La pérdida de la tolerancia inmunológica en la mujer puede estar asociada con las diferencias hormonales, retos inmunológicos durante el embarazo, el microquimerismo fetal o alteraciones asociadas al cromosoma X.

Además del sexo femenino, la edad representa el principal factor de riesgo para el desarrollo de autoinmunidad (*Goronzy y Weyand, 2005*). La mayoría de las mujeres son diagnosticadas después de la menopausia, la incidencia de la AR incrementa con la edad y tiene su pico máximo entre los 75 y 85 años. El proceso del envejecimiento afecta todos los aspectos de la respuesta inmune, pero particularmente al sistema adaptativo con una disminución en la respuesta celular primaria de los linfocitos T.

Nuestro trabajo es un estudio de casos y controles que valoró la presencia de dos fenómenos relacionados con la edad, el sICX y la LTR, en mujeres con AR y controles sin EAI explorando la posibilidad de que sean factores asociados a la enfermedad. Una característica importante de la cohorte de casos estudiada es el diagnóstico temprano, se trata de mujeres con menos de un año de evolución de los síntomas donde la intervención terapéutica se establece de forma precoz y los efectos sistémicos de la inflamación crónica así como sus complicaciones no se esperaría que fueran confusores determinantes sobre los resultados. Representan

marcadores biológicos en estadios muy tempranos de la AR que podrían extrapolarse incluso como presentes al inicio de la enfermedad.

El cambio en el tiempo tanto del sICX como de la LTR se comparó en el análisis antes y después entre la muestra inicial y una muestra de seguimiento tomada con un intervalo variable después del diagnóstico. Esta comparación nos permitió valorar diferencias con respecto a una población sana de referencia y cambios individuales en las muestras pareadas. A nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que evalúa los cambios en el tiempo del sICX y la LTR en mujeres con AR.

Relación del sICX con la AR

Estudios en mujeres sanas muestran un incremento en la frecuencia del sICX en linfocitos de sangre periférica conforme aumenta la edad (*Sharp et al, 2000; Knudsen et al, 2007; Chabchoub et al, 2009*), evento atribuido a selección clonal sobre un grupo relativamente pequeño de precursores hematopoyéticos. Estando relacionada la edad con el sICX, un evento que tiene lugar casi exclusivamente en el género femenino, este ha sido analizado como un mecanismo potencial en el desarrollo de la EAI.

En 2009 Chabchoub y cols reportaron una frecuencia mayor de sICX en mujeres con AR respecto a controles sanas, hallazgo significativo también en estudios de casos y controles estudiando el mismo fenómeno en ES, escleroderma, ARJ y ETAI (*Chabchoub et al, 2009; Broen et al, 2010; Uz et al, 2008; Uz et al 2009*).

Nuestros resultados mostraron un grado de sICX significativamente mayor en las mujeres con AR al diagnóstico como grupo en relación con las controles, además hubo una mayor frecuencia de sICX en las pacientes que en mujeres sanas de la misma edad. Esta diferencia se mantuvo en contraste con un segundo grupo control de la muestra de seguimiento analizada, aunque no hubo cambios

en el tiempo con respecto a la muestra inicial. Así, los datos indican una asociación significativa del sICX con la AR que es independiente de la edad.

En mujeres sanas se han reportado prevalencias de sICX entre 7-21% (0-7% en menores de 25 años y 16-21% en mayores de 50 años), mientras que un sICX extremo se observa en 1.5-2.3% de la población femenina sin EAI (*El Kassar et al, 1998; Sharp et al, 2000; Knudsen et al, 2007; Chabchoub et al, 2009*). Esta distribución del patrón de ICX es comparable a la del grupo control de la muestra inicial (20.5% con sICX y 1.8% con sICX extremo), pero menor que la de los casos (33% con sICX y 4.5% con sICX extremo).

No encontramos correlación entre el sICX y la edad en ninguno de los grupos de comparación, esta correlación en otro estudio fue débil pero significativa (*Knudsen et al, 2007*). Siendo la ICX un fenómeno al azar en su origen, la variabilidad en la prevalencia de sICX puede ser amplia al no excluirse la probabilidad de un sICX por causas estocásticas o ventaja selectiva conferida por algunos alelos del cromosoma X predominantemente activo en mononucleares de sangre periférica.

No hay diferencias en el grado de sICX entre las dos muestras de pacientes en el tiempo, aunque cabe resaltar que el intervalo de seguimiento fue de 6.9 años en promedio y desconocemos el periodo de tiempo necesario para documentar cambios en el patrón de ICX de manera individual. Por otro lado, nuestro trabajo parece indicar que el sICX no está relacionado con la evolución de la enfermedad, sino que es un factor de riesgo en su inicio o estadios tempranos (OR 1.99, IC 95% 1.08-3.67, $P=0.026$).

El grado de sICX en las mujeres con AR no mostró correlación con los marcadores de inflamación, los niveles de AAPCC o el índice de actividad DAS28. Los niveles de FR se encontraron en correlación inversa con el grado de sICX en el análisis estadístico, pero sin relevancia clínica por los valores muy incrementados en una alta proporción de los casos. En general, la actividad de la enfermedad fue alta en más del 70% de la muestra, por lo que la comparación

entre los subgrupos con sICX e inactivación al azar fue poco significativa y con utilidad limitada al interpretar los resultados. Lo anterior probablemente es resultado del diagnóstico temprano cuando los síntomas son evidentes y las pacientes inician con el tratamiento modificador.

Tampoco se encontró relación entre el sICX y el tratamiento con FARME, misma conclusión de un trabajo realizado en pacientes con ARJ donde no se encontró relación entre el patrón de ICX y la duración del tratamiento inmunosupresor (*Uz et al, 2009*).

La relación fisiopatológica del sICX con la aparición de la AR no es sencilla, aunque la participación del cromosoma X en la EAI se ha investigado a detalle en los últimos años. La presencia de inactivación sesgada del cromosoma X podría afectar la tolerancia inmune a antígenos ligados al Xi con respuesta autorreactiva en los tejidos periféricos, lo que supone la hipótesis del mosaicismo. También cambios epigenéticos pudieran estar relacionados con el sICX y la AR, como la reactivación de genes del Xi con expresión de algunos que modulen la respuesta inmune de forma deletérea (observado en LEG con la reactivación de *CD40L*) (*Libert et al, 2010*).

Relacionando a la edad y el sICX como factores de riesgo para el desarrollo de la AR, puede que en un primer evento uno de los dos X tenga desventaja por alguna mutación que limite el potencial proliferativo de las células que lo portan activo dando lugar al sICX. La aparición de la AR subsecuentemente podría estar relacionada con variantes no sinónimas expresadas en el Xa en genes críticos para la regulación de la tolerancia inmune.

En estudios epidemiológicos, los antecedentes familiares constituyen en importancia el tercer factor predisponente para la AR. No hay estudios que hayan explorado la heredabilidad del sICX en familias con EAI y cuál pudiera ser la relación entre ellos. En este caso el sICX no solo tendría un papel somático en la respuesta inmune sino en la predisposición genética, ampliamente estudiada y poco esclarecida, a la EAI.

Relación de la LTR con la AR

La LT disminuye progresivamente con la edad a tasas de 20 a 40 pares de base por año, cambios reconocidos en leucocitos de la población general como parte del envejecimiento celular. El sistema inmune de las pacientes con AR muestra datos de senescencia prematura con disminución en la diversidad de los receptores de las células T, pérdida de CD28 y acortamiento telomérico precoz reportado en diferentes estudios (*Schönland et al, 2003; Steer et al, 2007; Fujii et al, 2009*).

Aunque el estrés oxidativo y la inflamación crónica se han postulado como candidatos del detrimento telomérico en AR, mecanismos subyacentes más complejos que el daño directo al DNA tienen evidencia de estar contribuyendo a estos cambios. El estrés replicativo por estimulación antigénica repetitiva se ha argumentado como causa de acortamiento telomérico en células progenitoras hematopoyéticas, la insuficiencia en la actividad de la telomerasa ha sido confirmada en pacientes con AR, así como la disminución en la eficacia de los mecanismos de reparación del DNA (*Fujii et al, 2009; Weyand et al, 2010*).

Cuando analizamos el comportamiento de la LTR con respecto a la edad en el total de controles se encontró una significativa correlación negativa ($r = -0.22$, $P = 0.0014$); la determinación relativa de la LT no permite establecer una tasa de acortamiento pero sí la tendencia a disminuir conforme incrementa la edad. Otros estudios que valoraron LT en población general reportan valores de r de -0.164 a -0.38 , comparable con nuestros resultados (*Steer et al, 2007; Nordfjäll et al, 2009*). Las tasas de acortamiento reportadas en individuos sanos es de 19-50 pares de bases/año, mayores en hombres que en mujeres (LT ajustada por edad de 6.77 kb en hombres vs 6.92 kb en mujeres) (*Nawrot et al, 2004*).

En los pacientes con AR también observamos una tendencia de la LTR a disminuir con la edad, que fue significativa únicamente en la muestra de seguimiento ($r = -0.28$, $P = 0.0097$). Un incremento en el acortamiento telomérico con la edad en pacientes con AR se ha reportado en estudios transversales

mediante la cuantificación de la LT absoluta por sondas TRF (*terminal restriction fragment*) con una diferencia promedio de 350-2000 pares de bases menos ajustada por edad entre casos y controles (*Steer et al, 2007; Schönland et al, 2003*).

La LTR en pacientes con AR al inicio de la enfermedad fue similar a la de los controles en nuestro estudio. En un estadio temprano aún con marcada actividad de la enfermedad y elevación de reactantes de inflamación en la mayoría de los casos, no encontramos diferencias en la LTR con respecto a mujeres sanas. El contraste entre estos y los resultados del estudio de Steer y cols donde la LT de pacientes con AR es significativamente menor, puede deberse a que aquel se trata de un estudio transversal donde las muestras para análisis fueron tomadas independientemente de la duración de la enfermedad y la población de referencia no estuvo pareada por edad (*Steer et al, 2007*).

En la investigación de Schönland y cols donde el objetivo fue conocer si los haplotipos codificados por los alelos HLA-DRB1*04 tienen relación con la LT, se encontró que independientemente del proceso de enfermedad la inmunosenescencia y el acortamiento telomérico se encuentran relacionados con este genotipo. Los autores observaron que en individuos sanos HLA-DR4⁽⁺⁾ los telómeros de linfocitos CD4⁺ fueron significativamente más cortos que la de controles HLA-DR4⁽⁻⁾, a los 20 años esta diferencia fue de 1500 pares de bases. Siendo el HLA-DRB1*04 el principal factor de riesgo genético para la presentación de la AR, la conclusión de este trabajo es que la senescencia prematura no es consecuencia de la enfermedad sino que precede a su inicio (*Schönland et al, 2009*). Desafortunadamente no contamos con la genotipificación HLA de la cohorte de AR temprana. La relación del HLA con el desarrollo de AR no se conoce, se ha postulado que el DR4 pudiera ser un facilitador de la activación de los linfocitos T afectando la producción de citocinas y factores de crecimiento. Es evidente que no todos los individuos con este genotipo llegan a desarrollar AR, de modo que su relación con la disminución en la LT indica que su expresión, junto con otros marcadores de inmunosenescencia, constituyen el fenotipo de riesgo

para la presentación de la enfermedad y al menos por nuestros resultados, no son un evento exclusivamente primario.

El trabajo de Fujii y cols con enfoque en la inducción de la telomerasa en AR concluyó que la insuficiencia de la actividad enzimática está comprometida en fases tempranas de la enfermedad aunque no sea manifiesto en la LT, haciendo susceptibles a la apoptosis a los linfocitos T vírgenes (*Fujii et al, 2009*). De este modo aunque el acortamiento telomérico no sea evidente en la muestra inicial, la dinámica de la LT con el tiempo se distingue de la de mujeres sanas como se observó en la muestra de seguimiento.

Se encontró una disminución significativa de la LTR en la muestra de seguimiento de las mujeres con AR con respecto al segundo grupo control. De acuerdo a nuestros resultados, la evolución de la enfermedad independientemente de la edad y de los tratamientos establecidos influye negativamente en la LTR. Con estos hallazgos la LTR disminuye como consecuencia del proceso inflamatorio crónico, una mayor duración de la enfermedad también se asoció significativamente con acortamiento telomérico en uno de los estudios citados (*Steer et al, 2007*).

Paradójicamente la actividad de la enfermedad valorada con el índice DAS28 no mostró correlación significativa con la LTR en ninguno de los análisis en el tiempo, aunque ya se comentaron las características clínicas de la cohorte que limitaron estas comparaciones. Al igual que estudios previos, la cuantificación de VSG, PCR, FR y AAPCC no mostró correlación con la LTR, tampoco manifiesta con el uso de FARME o tratamiento antiinflamatorio.

El análisis longitudinal de nuestra muestra evidenció diferencias en la LTR en el tiempo, reforzando los resultados de las comparaciones entre cada subgrupo de casos y controles. La correlación positiva entre la LTR inicial y la de seguimiento es congruente con la dinámica de la LTR con la edad. En relación a la magnitud del cambio en el tiempo (expresado con Δ LTR en los resultados) la mayoría tuvo

cambios discretos en la LTR lo cual es esperado por el tiempo relativamente corto de seguimiento.

Contrario a lo esperado por la edad un 36.25% de la muestra aumentó su LTR en la muestra de seguimiento. No existe antecedente en casos de AR para comparar, pero en su estudio longitudinal de la población general Nordfjäll y cols encontraron que un tercio de su muestra mantuvo su LTR estable o con aumento discreto en el periodo de una década (*Nordfjäll et al, 2009*). De este modo aunque la disminución de la LT es dependiente de la edad, existen aparentemente muchas excepciones a esta “regla”.

Destaca que entre las mujeres que aumentaron su LTR con el tiempo la Δ LTR máxima fue menor que la de aquellas que tuvieron acortamiento telomérico. Telómeros más largos inicialmente se acortan en mayor grado que lo que telómeros relativamente cortos aumentan en un periodo de tiempo, esto pudiera tener relación tanto con el intervalo variable de seguimiento como con regulación epigenética o de la actividad telomerasa sobre la LT.

No pudimos evaluar los cambios en el tiempo de la LTR de las mujeres sanas, tratándose de muestras independientes los dos grupos de controles analizados, lo cual podría permitirnos caracterizar mejor las comparaciones y parear a los casos en seguimiento con su control inicial.

Relación del sICX y la LTR

Además de ser fenómenos relacionados con la edad es difícil establecer un vínculo entre el sICX y la LTR, aunque ambos se hayan encontrado asociados significativamente con la AR. Estos fenómenos fueron independientes en nuestro análisis aun cuando se analizó exclusivamente la correlación de la LTR en aquellos que tuvieron sICX mayor al 70%.

Un estudio sobre la heredabilidad de la LT propuso un mecanismo ligado al X que explicara la mayor concordancia en la LT entre madre-hijos y padre-hija que

entre padre-hijo. Observaron también que no había diferencias entre los sexos en la LT en neonatos, pero se hacía evidente posteriormente. Los autores discuten que la ICX podría influir en la LT inactivando alelos que influyen sobre telómeros cortos (*Nawrot et al, 2004*).

En el cromosoma X se codifica la DKC1, proteína del complejo telomerasa que permite la estabilidad del hTR, se desconoce si variantes en este gen pudieran influir en la LT. Hasta ahora otros estudios tampoco han encontrado correlación entre sICX y LT (*Robertson et al, 2000; Barna Kanaan et al, 2013*), aunque los datos son limitados en esta área y la investigación a nivel molecular pudiera proporcionar mayor claridad a este respecto.

CONCLUSIONES

El sICX y el acortamiento telomérico son eventos relacionados con el envejecimiento fisiológico, estudiados en la población general con una correlación inversa con la edad. Se encontraron asociados con la AR en nuestro estudio pero son independientes entre sí. Los mecanismos patogénicos por lo que estos fenómenos contribuyen a la enfermedad han sido poco estudiados y requieren ser analizados desde otras perspectivas fuera de un estudio de asociación.

Nuestros resultados sugieren que el sICX es un factor que contribuye al riesgo de presentación de AR en mujeres y no parece ser un modificador de la misma. Las hipótesis del papel del sICX en el desarrollo de la AR son escasas, se ha comparado la representatividad del patrón de ICX en linfocitos de sangre periférica con células madre hematopoyéticas, pero no en otros tejidos blanco de la enfermedad. La inactivación sesgada del cromosoma X permitiría la expresión de alelos que influyen en la respuesta inmune, pero estos genes requieren caracterizarse con sus variantes y sus efectos.

No observamos cambios en la frecuencia del sICX en la muestra de seguimiento, si esto se debe a un intervalo corto entre ambas muestras puede analizarse posteriormente para conocer si las tendencias se mantienen.

La participación del acortamiento telomérico como evento primario o secundario en la EAI es controversial. Nuestros resultados sugieren que no se trata de un evento exclusivamente primario en AR, sino que las diferencias en la LTR respecto a los controles aparecen con la evolución de la enfermedad. Aunque hay evidencia en la literatura de que la disminución en la LT precede a la enfermedad o es indistinguible entre pacientes con diagnóstico temprano y aquellas con enfermedad de larga data, nuestros datos manifiestan el carácter multifactorial de esta variable y un probable rol en el curso de la AR.

El cambio en la LTR se relaciona con la LTR inicial, esto ha sido reportado en población general y fue relacionado con actividad preferencial de la telomerasa sobre telómeros cortos y cambios en la expresión génica que limitan el potencial

replicativo de la célula. No fue posible establecer la relación de tasas de acortamiento telomérico en casos y controles porque la LT se determinó de forma relativa, como se expuso previamente esta guarda una fuerte correlación con otros métodos utilizados por lo que los resultados son comparables con los de los estudios citados.

La importancia de un estudio longitudinal que explora cambios en el sICX y la LTR en casos y controles radica en la posibilidad de conocer la dinámica de estos eventos con el tiempo de forma individual. Los estudios transversales realizados hasta ahora muestran datos de una observación con un tiempo de evolución o situación clínica particular. Nuestros resultados proponen al sICX como un factor de riesgo para AR y a la LTR como un factor asociado a la evolución de la enfermedad.

Estudios subsecuentes en los casos de la cohorte que consideren antecedentes familiares, genotipo HLA o factores de riesgo ambientales pueden arrojar resultados interesantes que complementen este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

Allen RC, et al. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992; 51(6):1229-1239.

Amur S, Parekh A, Mummaneni P. Sex differences and genomics in autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2012; 38:254-265.

Augui S, Nora EP, Heard E. Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. *Nature Rev Genet*, 2011; 12:429-442.

Bhatnagar S, et al. Genetic and pharmacological reactivation of the mammalian inactive X chromosome. *PNAS* 2014; 11:12591-12598.

Bianchi I, Lleo A, Gershwin ME, Invernizzi P. The X chromosome and immune associated genes. *J Autoimmun* 2012; 38:187-192.

Briggs SF, Reijo Pera RA. X chromosome inactivation: recent advances and a look forward. *Curr Opin Genet Dev* 2014; 28:78-82.

Broen JC et al. Skewed X chromosomal inactivation impacts T regulatory cell function in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:2213-2216.

Broer L, Codd V, Nyholt DR, Deelen J, Mangino M, et al. Meta-analysis of telomere length in 19 713 subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect. *Eur J Hum Genet* 2013; 21: 1163-1168.

Brooks WH. X Chromosome Inactivation and Autoimmunity. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2010; 39:20-29.

Burgos-Vargas R, Catoggio LJ, Galarza-Maldonado C, Ostojichd K, Cardiel MH. Current therapies in rheumatoid arthritis: A Latin American perspective. *Reumatol Clin* 2013; 9(2):106-112.

Cárdenas-Roldán J, Rojas-Villarraga A, Anaya JM. How do autoimmune diseases cluster in families? A systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine* 2013; 11:73.

Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(3):e21-e21.

Chabchoub G, et al. Analysis of skewed X-chromosome inactivation in females with rheumatoid arthritis and autoimmune thyroid diseases. *Arthritis Res Ther* 2009; 11(4):R106.

Chitnis S, et al. The role of X-chromosome inactivation in female predisposition to autoimmunity. *Arthritis Res* 2000; 2: 399–406.

Cho JH, Feldman M. Heterogeneity of autoimmune diseases: pathophysiologic insights from genetics and implications for new therapies. *Nat Med* 2015; doi:10.1038/nm.3897

Costenbader KH, Prescott J, Zee RY, De Vivo I. Immunosenescence and Rheumatoid Arthritis: Does Telomere Shortening Predict Impending Disease? *Autoimmun Rev* 2011; 10(9):569-573.

Desai-Mehta A, et al. Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J Clin Invest* 1996; 97: 2063–2073.

El Kassar N, Hetet G, Brière J, Grandchamp B. X-Chromosome inactivation in healthy females: incidence of excessive lyonization with age and comparison of

assays involving DNA methylation and transcript polymorphisms. Clin Chem 1998; 44 (1): 61–67.

Elshazli R, Settin A. Association of PTPN22 rs2476601 and STAT4 rs7574865 polymorphisms with rheumatoid arthritis: A meta-analysis update. Immunobiology 2015; 220(8):1012-1024.

Fujii H, Colmegna I, Goronzy JJ, Weyand CM. Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis. Proc Natl Acad Sci 2009; 106(11):4360-4365.

Furukawa H, Oka S, Shimada K, Hashimoto A, Tohma S. Human leukocyte antigen polymorphisms and personalized medicine for rheumatoid arthritis. J Hum Genet 2015; doi: 10.1038/jhg.2015.36

Georgin-Lavialle S, et al. The telomere/telomerase system in autoimmune and systemic immune-mediated diseases. Autoimmun Rev 2010; 9:646-651.

Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology and diagnosis of rheumatoid arthritis. Am J Manag Care 2012; 18(13):295-302.

Goronzy JJ, Weyand CM. Rheumatoid arthritis. Immunol Rev 2005; 204:55-73.

Goronzy JJ, Fujii H, Weyand CM. Telomeres, immune aging and autoimmunity. Exp Gerontol 2006; 41:246-251.

Gregersen PK, Chitnis S, Monteiro J. Increased X-inactivation skewing in SLE? Immunol Today [Carta al editor] 1999; 20 (3): 152.

Guan JZ et al. Patients with multiple sclerosis show increased oxidative stress markers and somatic telomere length shortening. Mol Cell Biochem 2015; 400:183-187.

Hatakeyama C, Anderson CL, Beever CL, Peñaherrera MS, Brown CJ, Robinson WP. The dynamics of X-inactivation skewing as women age. *Clin Genet* 2004; 66:327-332.

Hodes RJ, Hathcock KS, Weng N. Telomeres in T and B cells. *Nat Rev Immunol*, 2002;2:699-706.

Huang Q, Parfitt A, Grennan DM, Manolios N. X-chromosome inactivation in monozygotic twins with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 1997; 26(2):85-93.

Klareskog L, Amara K, Malmström V. Adaptive immunity in rheumatoid arthritis: anticitrulline and other antibodies in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2014; 26:72-79.

Knudsen GPS, Pedersen J, Klingenberg O, Lygren I, Ørstavik KH. Increased skewing of X chromosome inactivation with age in both blood and buccal cells. *Cytogenet Genome Res* 2007; 116:24-28.

Knudsen GPS, et al. X chromosome inactivation in females with multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2007; 14:1392-1396.

Lahiri M et al. Using lifestyle factors to identify individuals at higher risk of inflammatory polyarthritis (results from the European Prospective Investigation of Cancer-Norfolk and the Norfolk Arthritis Register-the EPIC-2-NOAR Study). *Ann Rheum Dis* 2014;73:219-226.

Libert C, Dejager L, Pinheiro I. The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nature Rev Immunol*, 2010; 10:594-604.

Lockshin MD. Sex differences in autoimmune disease. *Lupus* 2006; 15:753-756.

Lyon MF. Sex chromatin and gene action in the Mammalian X-chromosome. *Am J Hum Genet*, 1962; 14(2): 135–148.

Mengel-From J, Thinggaard M, Christiansen L, Vaupel JW, Orstavik KH, Christensen K. Skewed X inactivation and survival: a 13-year follow-up study of elderly twins and singletons. *Eur J Hum Genet* 2012; 20: 361-364.

Mikuls TR, et al. Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66(5): 1090-1100.

Moreno-Montoya J, et al. Association of Regional and Cultural Factors with the Prevalence of Rheumatoid Arthritis in Mexican Population. A Multinivel Analysis. *J Clin Rheumatol* 2015; 21(2):57-62.

Musalkova D, Minks J, Storkanova G, Dvorakova L, Hrebicek M. Identification of novel informative loci for DNA-based X-inactivation analysis. *Blood Cells Mol Dis* 2015; 54(2):210-216.

Naumova AK, et al. Heritability of X Chromosome-Inactivation Phenotype in a Large Family. *Am J Hum Genet* 1996; 58:1111-1119.

Nawrot TW, Staessen JA, Gardner JP, Aviv A. Telomere length and possible link to X chromosome. *Lancet* 2004; 363:507-10.

Nordfjäll K, Svenson U, Norrback KF, Adolfsson R, Lenner P, et al. The individual blood cell telomere attrition rate is telomere length dependent. *PLoS Genet*, 2009; 5(2):e1000375.doi:10.1371

Ozcelik T. X chromosome inactivation and female predisposition to autoimmunity. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2008; 34:348-351.

O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(3):171-81

Panning B. X-chromosome inactivation: the molecular basis of silencing. *Journal of Biology* 2008; 7:30.

Pedersen M, et al. Environmental risk factors differ between rheumatoid arthritis with and without auto-antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Res Ther* 2006; 8:R133 (doi:10.1186/ar2022)

Pennell LM, Galligan CL, Fish EN. Sex affects immunity. *J Autoimmun* 2012; 38:282-291.

Richardson AL, et al. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell* 2006; 9: 121-132.

Sarma K, et al. ATRX Directs Binding of PRC2 to Xist RNA and Polycomb Targets. *Cell* 2014; 159:869-883.

Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 2008; 3(6):1101-1108.

Schönland S, et al. Premature telomeric loss in rheumatoid arthritis is genetically determined and involves both myeloid and lymphoid cell lineages. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100(23):13471-13476.

Selmi C. The X in sex: how autoimmune diseases revolve around sex chromosomes. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008; 22(5):913-922.

Shaikh MG, et al. Skewed X inactivation is associated with phenotype in a female with adrenal hypoplasia congenita. *J Med Genet* 2008; 45(9):e1.doi:10.1136.

Sharp A, Robinson D, Jacobs P. Age-and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet* 2010; 107:343-349.

Spatz A, Borg C, Feunteun J. X-chromosome genetics and human cancer. *Nature Rev Cancer*, 2004; 4:617-629.

Steer SE, et al. Reduced telomere length in rheumatoid arthritis is independent of disease activity and duration. *Ann Rheum Dis* 2007; 66:476-480.

Svryrd Y, et al. X chromosome monosomy in primary and overlapping autoimmune disease. *Autoimmun Rev* 2012; 11 (5): 301-304.

Thouin MM, Giron JM, Hoffman EP. Detection of Nonrandom X Chromosome Inactivation. *Curr Protoc Hum Genet* 2002; 9.7.1-9.7.6.

Uz E, et al. Increased Frequency of Extremely Skewed X Chromosome Inactivation in Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 60(11): 3410-3412.

Uz E, et al. Skewed X-chromosome Inactivation in Scleroderma. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008; 34(3):352-355.

Vasanth KM, Nalini G, Rajasekhar G. Association of susceptible genetic markers and autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Genet*, 2014; 93: 597–605.

Weyand CM, Shao L, Goronzy JJ. Immune aging and rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2010; 36(2):297-310.

Yang XK, et al. Associations Between PADI4 Gene Polymorphisms and Rheumatoid Arthritis: An Updated Meta-analysis. *Arch Med Res* 2015; 15:00131-9.

Yarwood A, Huizinga TWJ, Worthington J. The genetics of rheumatoid arthritis: risk and protection in different stages of the evolution of RA. *Rheumatology*, 2014; 53-63.