



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**
FACULTAD DE MEDICINA
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

**“EVALUACIÓN DE LA VARIANTE GENÉTICA rs704840 DE
TNFSF4 Y SU RELACIÓN CON QUERATITIS ULCERATIVA
PERIFÉRICA EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE”**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN MEDICINA
(REUMATOLOGÍA)**

**PRESENTA:
ADA ROCÍO MORALES MEZA**

TUTORES DE TESIS:

**DR. GUSTAVO ESTEBAN LUGO ZAMUDIO
DRA. ISELA MONTÚFAR ROBLES**



**NÚMERO DE REGISTRO DE PROTOCOLO HJM 131/22-R
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. 2023**



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.

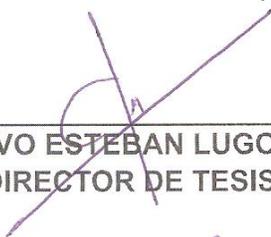
AUTORIZACIÓN DE TESIS

“EVALUACIÓN DE LA VARIANTE GENÉTICA rs704840 DE *TNFSF4* Y SU RELACIÓN CON QUERATITIS ULCERATIVA PERIFÉRICA EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE”

HJM 131/22-R



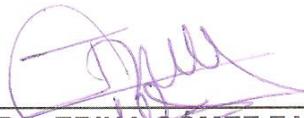
DRA. ADA ROCÍO MORALES MEZA
(TESISTA)



DR. GUSTAVO ESTEBAN LUGO ZAMUDIO
(DIRECTOR DE TESIS)



DRA. ISELA MONTUFAR ROBLES
(DIRECTORA DE TESIS)



DRA. ERIKA GÓMEZ ZAMORA
(SUBDIRECTORA DE ENSEÑANZA)



DR. ERIK EFRAIN SOSA DURÁN
(JEFE DE POSGRADO)

DEDICATORIA

A mis padres, que son mi motor, mi inspiración y mis más grandes maestros, este agradecimiento por darme la vida, la oportunidad de vivirla y seguir mis sueños. Por toda su comprensión, paciencia, apoyo en este largo camino que decidí recorrer. Por todo su amor incondicional.

A toda mi familia que siempre han sido y serán lo más importante para mí.

A Isaac y Samy por siempre escucharme, comprenderme, animarme y estar presentes siempre que los necesito.



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosa Elda Barbosa Cobos, y al Dr. Gustavo Esteban Lugo Zamudio, por permitirme formar parte del equipo de reumatología, ser un verdadero ejemplo para seguir y enseñarme acerca de liderazgo. A la Dra. Anna Sofía Vargas Avilés, Dra. Lucía Verónica Maya Piña, Dra. Cristina Hernández Díaz y al Dr. Ricardo Sabido Sauri por todas sus enseñanzas que van más allá de la propia reumatología.

A las Dras. Pamela Medina San Millán, Ivonne de la Luz Romero Vázquez, Cinthia Jahoska Samuria Flores, María José García Cedeño y al Dr. Ricardo Francisco López Suárez, por todo su apoyo, paciencia y enseñarme lo que significa ser un gran equipo.

A mis compañeras Dra. Kari y Miri, por compartir conmigo todo este trayecto.



ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Justificación	6
3. Pregunta de investigación.....	6
4. Hipótesis	6
5. Objetivos	6
6. Metodología	7
7. Análisis e interpretación de resultados	12
8. Recursos	12
9. Consideraciones éticas	13
10. Aspectos de bioseguridad	13
11. Resultados	13
12. Discusión	20
13. Conclusión.....	21
14. Bibliografía.....	22
15. Anexos	24

1. Introducción

1.1. Artritis reumatoide

1.1.1. Definición

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica, tipo autoinmune que afecta de forma inicial las articulaciones, se caracteriza por la inflamación progresiva y simétrica de las mismas, lo que conduce a destrucción del cartílago y discapacidad. Así mismo puede involucrar órganos extraarticulares (1).

1.1.2. Epidemiología

Tiene una prevalencia que abarca del 0.4 al 1.3% de la población, afecta en su mayoría a las mujeres, siendo de 2 a 3 veces más frecuente en mujeres que en hombres, sin embargo, esta diferencia de género disminuye en adultos mayores (1, 2). Su pico de incidencia es entre los 40 y 50 años, no obstante, puede ocurrir a cualquier edad incluyendo niños y adolescentes, el riesgo de presentar AR aumenta de forma considerable después de los 60 años (2, 3). La principal causa de muerte en pacientes con AR es la enfermedad cardiovascular, se ha reportado que tienen el doble de riesgo de padecer infarto al miocardio y que la mortalidad por riesgo cardiovascular se encuentra incrementada hasta en un 50% (4).

1.1.3. Manifestaciones clínicas

La AR es una enfermedad poliarticular, simétrica que involucra múltiples articulaciones de manera bilateral; la presentación clínica incluye dolor, inflamación y rigidez articular mayor de 30 minutos, inicialmente afectando pequeñas articulaciones como metacarpofalángicas, interfalángicas proximales, carpos y metatarsfalángicas, posteriormente afectando grandes articulaciones (5, 6). Sin embargo, el proceso inflamatorio sistémico puede involucrar otros tejidos y órganos, originando manifestaciones extraarticulares, cuya prevalencia se ha estimado en un 17.8 a un 40.9% (6). Entre los órganos y sistemas que pueden verse afectados se

encuentran piel, sistema nervioso, ojos, corazón, riñón, pulmón, aparato gastrointestinal, vascular, etc. Las manifestaciones oculares ocupan una parte significativa de las manifestaciones extraarticulares debido a su estructura anatómica y sistema inmune privilegiado, el segmento anterior suele ser el más afectado, entre estas manifestaciones se encuentran la queratoconjuntivitis seca, la epiescleritis, la escleritis, la queratitis ulcerativa periférica (QUP), etc. Siendo la queratoconjuntivitis seca la alteración más frecuente (7, 8).

1.1. 4. Diagnóstico

Los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología (ACR) y de la Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR) del 2010 incluyen un grupo de variables como el número de articulaciones involucradas, serología (factor reumatoide y anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados), reactantes de fase aguda (velocidad de sedimentación globular, proteína C reactiva) y duración de los síntomas, un paciente que obtenga una puntuación ≥ 6 clasifica para AR (9).

1.2. Queratitis ulcerativa periférica

1.2.1. Definición

La QUP es una condición inflamatoria, que condiciona el adelgazamiento periférico, progresivo del estroma corneal, causado por mediadores inflamatorios liberados a partir de una vasculitis del limbo corneal, la cual puede potencialmente causar ceguera y es considerado como un marcador de enfermedad sistémica activa (10, 11, 15).

1.2.2. Epidemiología

Tiene una incidencia promedio de 0.2 a 3 individuos por millón de habitantes (12). Posee una predilección por el sexo femenino, aunque se cuenta con pocos reportes donde se establece una relación hombre: mujer de 1 a 1 (13). Se ha reportado que la prevalencia de QUP en AR es de 1.4 a 3% (14).

1.2.3. Etiología

La QUP puede ser causada por una variedad de desórdenes, su etiología puede ser infecciosa y no infecciosa. Puede asociarse con enfermedad sistémica o ser de origen idiopático (13). Los trastornos subyacentes asociados, son de índole autoinmune, desórdenes dermatológicos, neoplasias, etc. De las causas no infecciosas, las autoinmunes representan el 50%; la AR es la enfermedad sistémica que con mayor frecuencia se asocia a este trastorno, siendo la causa hasta en un 34% de las veces (10). Otras enfermedades autoinmunes que pueden hallarse incluyen lupus eritematoso sistémico (LES), poliarteritis nodosa, síndrome de Sjögren, policondritis recidivante, arteritis de células gigantes y granulomatosis con poliangitis (12).

1.2.4. Fisiopatología

La córnea periférica es una zona de transición entre la córnea y la esclera. El grosor de la córnea periférica es de 1 mm, es más grueso que la córnea central la cual es de 0.5 mm. En esta zona las células epiteliales están unidas con mayor fuerza a la membrana basal y al estroma, siendo su principal componente el colágeno tipo IV y el colágeno tipo I respectivamente, así mismo tienen un mayor poder replicativo. La integridad corneal es mantenida por un balance entre colagenasas y sus inhibidores tisulares (12, 13). Los vasos linfáticos subconjuntivales acompañan a los capilares del limbo a la córnea periférica, sus ramas aferentes permiten la entrada del sistema inmunitario (12).

Aunque el mecanismo fisiopatológico exacto de QUP no ha sido determinado (15), se han propuesto diversos mecanismos, entre los cuales se encuentran, un desbalance entre las cifras de las metaloproteinasas de la matriz (MPM) y una colagenasa específica causa la degradación de la matriz extracelular y de su inhibidor tisular de metaloproteinasas de la matriz en el estroma corneal, lo que puede provocar una alteración del recambio de la matriz corneal, pudiendo

incrementar la tasa de queratolisis, reacciones autoinmunes hacia el antígeno corneal, depósito de complejos inmunes circulantes y las reacciones de hipersensibilidad a los antígenos exógenos (11, 13). Un incremento de la inflamación vía vascular y linfática puede culminar en ulceración corneal por la liberación de enzimas proteolíticas (MPM), entre las que participan en el proceso, se encuentran la 1, 2, 8 y 9. Las MPM 2 y 9, son enzimas que van a hidrolizar el colágeno tipo IV, mientras que la MPM 8 y 1 hidrolizan el colágeno tipo I. Entre las citoquinas proinflamatorias que se han encontrado que participan en el proceso de activación de queratinocitos, se encuentran la IL-6, IL-1B y el factor de necrosis tumoral alfa, lo cual facilita la respuesta autoinmune de proteínas y la precipitación de anticuerpos, así como de la reacción hiperinmune mediada por células (12).

1.2.5. Manifestaciones Clínicas

Los síntomas asociados a QUP dependen del grado de afectación y de si hay escleritis asociada. La mayoría de los pacientes presentan dolor ocular, epífora, inyección conjuntival y disminución de la agudeza visual. Algunas características asociadas que pueden estar presentes incluyen escleritis, perforación, infección secundaria, uveítis, hipopión e incremento de la presión intraocular (16). Durante el curso de la AR se puede presentar QUP antes de las manifestaciones articulares o durante las mismas, sin embargo, tiene mayor predominio en pacientes con AR de larga evolución y se asocia a factores de mal pronóstico (AR erosiva, títulos altos de anticuerpos, nodular) (14).

1.3. *TNFSF4*

Las enfermedades autoinmunes (EA) se caracterizan por una heterogeneidad genética y comparten algunos genes de susceptibilidad, sin embargo, es la combinación de las variantes genéticas en las diferentes EA lo que confiere

susceptibilidad o protección (17). Los miembros de las superfamilias del factor de necrosis tumoral juegan un rol importante en diversas enfermedades autoinmunes, incluyendo la AR. El incremento en la expresión de superficie celular de estos miembros se ha observado en linfocitos autorreactivos y otras células competentes en pacientes con AR (18). El miembro 4 de la superfamilia de ligandos del factor de necrosis tumoral (*TNFSF4*) se localiza en la región cromosómica 1q25 (19). Es un locus de susceptibilidad clásico en LES, sin embargo, su rol en la AR no está bien dilucidado (17). Este miembro codifica OX40L o CD252, proteínas unidas a membrana que se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígeno, cuyo receptor está expresado en células CD4+ y CD8+. El OX40 y su ligando OX40L, como ya se comentaba, son ampliamente expresados y regulados en muchos tipos celulares, incluyendo células T, natural killer, células B y células dendríticas; estas moléculas son proinflamatorias y se ha demostrado que juegan un rol en el desarrollo de múltiples enfermedades como colitis, asma, diabetes, esclerosis múltiple, AR, etc. en modelos murinos (20). La interacción entre OX40 y su ligando se ha relacionado con varias funciones regulatorias asociadas con la activación, proliferación y supervivencia de células T, así como con la producción de citoquinas, generación de células de memoria y la presencia de autoanticuerpos. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), refiriéndose a que un solo nucleótido es reemplazado por otro, se han asociado fuertemente a la susceptibilidad de algunas enfermedades, ya que se altera la expresión o función de los genes. Se han encontrado al menos una docena de SNP en *TNFSF4*, siendo identificados como locus de susceptibilidad para algunas enfermedades como las autoinmunes, cáncer, enfermedad arterial coronaria y alergias (17,19). Hasta ahora ha sido evaluada la asociación entre *TNFSF4* y sus variantes (rs1234315C/T, rs2205960G/T, rs704840T/G) con la susceptibilidad para AR (17), sin embargo, su asociación con QUP no ha sido descrita.

2. Justificación

Dado que la AR es el trastorno reumatológico autoinmune, crónico, más frecuente, el cual puede presentar una amplia gama de alteraciones a nivel articular y extraarticular, que se encuentra mayormente asociado a QUP; considerando que en el caso de no ser atendidas, ambas alteraciones pueden conducir a discapacidad, disminución de la productividad y aumento en costos, repercutiendo tanto en la economía familiar como en la social, provocando un aumento en la morbimortalidad, por lo que es importante conocer marcadores genéticos tempranos que se asocien a susceptibilidad para presentar QUP en pacientes con AR, para identificar la población de riesgo y seleccionar el tratamiento más adecuado de manera oportuna, disminuyendo la morbimortalidad.

3. Pregunta de Investigación

¿La variante rs704840 presente en *TNFSF4* está relacionada con QUP en pacientes con AR?

4. Hipótesis

La presencia de la variante genética rs704840 localizada en *TNFSF4* está relacionada con QUP en pacientes con AR.

5. Objetivos

5.1. Objetivo primario

Determinar si la variante rs704840 del gen *TNFSF4* está relacionada con QUP en pacientes con AR.

5.2. Objetivos secundarios

- Determinar la frecuencia alélica y genotípica de la variante de polimorfismo rs704840 del gen *TNFSF4* en controles, en pacientes con QUP y AR.

- Determinar si la variante rs704840 de *TNFSF4* están asociadas con susceptibilidad y gravedad para el desarrollo de QUP en pacientes con AR.

6. Metodología

6.1. Diseño de la investigación

Observacional, transversal, retrospectivo, analítico.

6.2. Tipo de estudio

Casos y controles.

6.3. Ubicación temporal y espacial

Servicio de Reumatología y Laboratorio Provisional de Investigación del Hospital Juárez de México; de noviembre del 2022 a julio del 2023.

6.4. Población

Criterios de inclusión:

- Sexo femenino
- Mayores de 18 años.
- Mestizos mexicanos.
- Diagnóstico de Artritis Reumatoide de acuerdo con los criterios de clasificación ACR/EULAR 2010.
- Atendidos en el servicio de Reumatología del Hospital Juárez de México.
- Consentimiento informado firmado.

Criterios de exclusión:

- Coexistencia de otra enfermedad autoinmune (síndrome de sobreposición).

Criterios de eliminación:

- Revocación del consentimiento.
- Muestra inadecuada.

6.5. Definición de variables

Variable	Tipo	Unidad de medida	Definición conceptual	Definición operativa
Dependiente				
Queratitis ulcerativa periférica	Cualitativa dicotómica nominal	Presente o ausente	Condición inflamatoria, que condiciona el adelgazamiento periférico, del estroma corneal, caracterizado por aparición de dolor ocular, epífora, inyección conjuntival y disminución de la agudeza visual (10,11,15).	Condición inflamatoria, que condiciona el adelgazamiento periférico, del estroma corneal, caracterizado por aparición de dolor ocular, epífora, inyección conjuntival y disminución de la agudeza visual (10,11,15).

Artritis Reumatoide	Cualitativa dicotómica nominal	Presente o ausente	Enfermedad crónica, autoinmune que afecta de forma inicial las articulaciones, caracterizada por la inflamación progresiva y simétrica de las mismas, lo que conduce a destrucción del cartílago y discapacidad. Así mismo puede involucrar órganos extraarticulares	enfermedad crónica, tipo autoinmune que afecta de forma inicial las articulaciones, se caracteriza por la inflamación progresiva y simétrica de las mismas, lo que conduce a destrucción del cartílago y discapacidad. Así mismo puede involucrar órganos extraarticulares
Independiente				
Genotipo <i>TNFSF4</i> rs704840	Cualitativa dicotómica nominal	Presente o ausente	Gen localizado en la región del cromosoma 1q25 humano, codifica una proteína unida a membrana en la superficie de células inmunitarias, principalmente	Gen localizado en la región del cromosoma 1q25 humano, codifica una proteína unida a membrana en la superficie de células inmunitarias, principalmente

			células presentadoras de antígeno, así como en células del endotelio vascular (19, 20).	células presentadoras de antígeno, así como en células del endotelio vascular (19, 20).
--	--	--	---	---

6.6. Cálculo del tamaño de la muestra

De acuerdo con el programa WinEpi, que evalúa el tamaño de la muestra tomando en cuenta la prevalencia de la enfermedad, asumiendo distribución binomial con un tamaño de la población desconocido, se calculó una muestra con 63 individuos con AR con y sin QUP, para una proporción estimada de 0.5% y una amplitud del intervalo de confianza igual al doble del error aceptado (10%) con un nivel de confianza del 95%. Sin embargo, debido a que la QUP es poco frecuente en nuestra población se aceptaron a todos aquellos pacientes durante el periodo de noviembre del 2022 a julio del 2023, siempre y cuando se cumplieran con los criterios de inclusión y los pacientes aceptaran participar en el estudio mediante su firma en la carta de consentimiento informado.

6.7. Descripción operativa

6.7.1. Detección de pacientes

Se detectaron a los pacientes de acuerdo con los criterios de selección, en los servicios de reumatología y oftalmología del Hospital Juárez de México. Se invitó a los pacientes a participar en el protocolo de investigación; en caso de aceptar se procedió a la firma del consentimiento informado.

6.7.2. Revisión de expedientes

Se realizó revisión de expedientes para la caracterización clínica de los pacientes.

6.7.3. Toma de muestras

Se tomó una muestra de sangre periférica de 5 ml, en tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante.

6.7.4. Extracción de ADN

1. Las muestras contenidas en tubos con EDTA (ácido etilendiaminotetracético) fueron centrifugadas a 3000 r.p.m durante 10 minutos.
2. Se tomó la capa de leucocitos y se colocó en un tubo limpio de 15 ml para iniciar el procedimiento de extracción del ADN.
3. Se agregó a cada tubo de 15 ml, 6 ml de buffer de lavado.
4. Nuevamente, se centrifugó la muestra obtenida de la mezcla, durante 5 minutos a 3500 r.p.m.
5. Se decantó el sobrenadante.
6. Se agregaron 3 ml de buffer de lisis de células, más proteinasa K (30 microlitros)
7. Se incubó la muestra con la mezcla de reactivos durante 1h/60 °C
8. Se agregó NaCl (500 ul) a la mezcla de reacción, posteriormente se centrifugó la muestra a 3500 r.p.m durante 5 minutos.
9. Se obtuvo el sobrenadante y se agregaron 3 ml de alcohol etílico absoluto para obtener la hebra de DNA
10. Finalmente, se agregó buffer de elusión de ADN (200 microlitros), se cuantificó el ADN y se hicieron diluciones a 5 ng/microlitro

6.7.5. Genotipificación de *TNFSF4*

El genotipo del polimorfismo de un solo nucleótido rs704840 del gen *TNFSF4* fue evaluado mediante la técnica 5´exonucleasa “TaqMan”. El vial contiene un par de sondas para identificar cada uno de los alelos de los SNP. Cada sonda en su extremo 5´contiene un fluoróforo, ya sea el fluoróforo VIC o FAM, que se excitan y emiten fluorescencia a diferente longitud de onda, la cual es detectada por un software y traducida en colores en un plot de discriminación alélica.

- De cada paciente se emplearon 5 microlitros de reacción (cada microlitro contiene 5 ng).
- Los 5 microlitros se colocaron en lugares específicos de una placa de 96 pozos.
- Posteriormente, cada pozo se le agregaron 5 microlitros de mezcla de reacción (2.5 microlitros de master mix 2X, 2.465 de agua y 0.035 microlitros de sonda).
- Las placas fueron colocadas posteriormente en un equipo de PCR en tiempo real (de BioRad) durante 45 ciclos, cada ciclo de PCR consistió en 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C.
- Después de 2 horas, los resultados fueron visualizados en la pantalla del equipo.
- Finalmente, se realizó la discriminación alélica para rs704840 del gen *TNFSF4*.

7. Análisis e interpretación de resultados

El análisis estadístico descriptivo se realizó con el software IBM SPSS versión 21 y el inferencial con FINETTI. Las variables cuantitativas se describieron mediante medidas de tendencia central y dispersión de acuerdo con la distribución de los datos; las cualitativas mediante frecuencia y porcentaje. Posteriormente se realizó un análisis de homogeneidad entre los grupos de AR con y sin QUP. El genotipo se cuantificó por conteo directo. La prueba estadística empleada fue Chi-cuadrado (χ^2). El valor de OR, IC 95% y el valor de p se obtuvo con el programa FINETTI, el cual además evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg entre el genotipo del SNP, rs704840, de *TNFSF4*.

8. Recursos

Equipo médico del servicio de reumatología e investigadores de la Unidad de Investigación.

9. Consideraciones éticas

La presente tesis de investigación se realizó de acuerdo con lo dispuesto en la Ley General de Salud, en materia de investigación en salud y en materia del genoma humano que se publicó en el Diario Oficial de la Federación del 16 de noviembre 2011. El estudio se apegó a los principios de la asamblea médica mundial para la investigación en seres humanos establecidos en la declaración de Helsinki. Se presentó el proyecto al Comité de ética, investigación y bioseguridad del Hospital Juárez de México para su aprobación.

10. Aspectos de bioseguridad

La toma de muestra fue realizada en los cubículos para toma de muestra del laboratorio clínico del HJM. El personal que tomó las muestras sanguíneas está altamente capacitado para hacerlo. Para esto, el profesional de la salud portó bata, cubre bocas, y guantes. Las agujas vacutainer y jeringas fueron desechados en contenedor rojo conforme a la NOM087. Los procedimientos experimentales (extracción de DNA y RT-PCR) fueron llevados a cabo en el laboratorio provisional asignado a la División de Investigación, el personal operativo usó equipo de protección personal, como lo es bata, guantes cubre boca. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo bajo un gabinete de bioseguridad clase II. Las mesas y superficies donde se llevó a cabo la extracción se desinfectaron antes y después de llevar a cabo el procedimiento. Asimismo, los residuos generados de la extracción de DNA y el material de desecho del RT-PCR fueron recolectados y destruidos como desechos de riesgo biológico (RPBI) de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 en contenedores rígidos o bolsas rojas.

11. Resultados

En este estudio se captó un total de 29 pacientes, de los cuales 17 tenían AR, 9 tenían AR con QUP y 3 QUP sin enfermedad autoinmune. De acuerdo con el cálculo del tamaño de muestra esta fue de 63 pacientes, sin embargo, debido a que la QUP es

poco frecuente y aún más la AR con QUP, decidimos incluir a todos aquellos pacientes que llegaron al servicio de reumatología y oftalmología que cumplieran con los criterios de inclusión durante el periodo de noviembre del 2022 a julio del 2023, todos los pacientes aceptaron su participación en el estudio mediante su firma en la carta de consentimiento informado. La descripción de los tres grupos evaluados se menciona a continuación: En el primer grupo se incluyeron 9 mujeres mexicanas, mestizas, mayores de 18 años que presentaban AR con QUP; el segundo grupo utilizado como control fueron pacientes con AR solamente (n=17) y el tercer grupo consistió en 3 pacientes que presentaban QUP sin enfermedad autoinmune.

Las variables cuantitativas, edad, tiempo de evolución y tiempo de diagnóstico (las cuales fueron expresadas en años), presentaron una distribución libre: en pacientes con AR con QUP la mediana y rango intercuartílico (RIQ) de la edad fue de 56 años (54-66), del tiempo de evolución de la enfermedad fue de 12.7 años (2.45-23.95) y del tiempo de diagnóstico fue de 5.47 años (0.6-18.45); en los pacientes con AR sin QUP fue de 52 años (48-58), 12.2 años (2.2-24.2) y 4.2 años (0.58-16.2) respectivamente; en los pacientes con QUP sola (sin enfermedad autoinmune) la mediana de edad y rango intercuartílico fue de 67 años (63-70).

Los antecedentes demográficos, personales patológicos, características clínicas y tratamiento se describen en las tablas 1-4. Lugar de origen: Ciudad de México 10 (34.4%), Estado de México 4 (13.7%), Guanajuato 1 (3.4%), Guerrero 2 (6.8%), Hidalgo 3 (10.3%), Morelos 1 (3.4%), Oaxaca 2 (6.8%), Puebla 1 (3.4%), San Luis Potosí 1 (3.4%), Zacatecas 1 (3.4%). Antecedentes personales patológicos: tabaquismo: positivo 7 (24.1%), negativo 19 (65.5%); comorbilidades: diabetes tipo II: 7 (24.1%), hipertensión arterial sistémica 9 (31.0%), infarto agudo al miocardio 0 (0%), hipotiroidismo 1 (3.4%), cáncer 2 (6.8%). Características clínicas: factor reumatoide: negativo 6 (20.6%), positivo bajo 5 (17.2%), positivo alto 15 (51.9%), no especificado 0 (0%); anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinado: negativo 10 (34.4%), positivo bajo 3 (10.3%), positivo alto 14 (48.2%), no especificado 0 (0%); estado nutricional: bajo peso 2 (6.8%), normal 9 (31%), sobrepeso 10 (34.4%), obesidad grado I: 4

(13.7%), obesidad grado II: 1 (3.4%); nódulos reumatoides presentes 3 (10.3%), ausentes 23 (79.3%); DAS28-PCR: remisión 13 (44.8%), actividad leve 4 (13.7%), actividad moderada 7 (24.1%), actividad alta 2 (6.8%); DAS28-VSG: remisión 8 (27.2%), actividad leve 6 (20.6%), actividad moderada 5 (17.2%), actividad alta 7 (24.1%). Tratamiento actual: metotrexato 22 (75.8%), hidroxicloroquina 1 (3.4%), leflunomida 5 (17.2%), sulfasalazina 10 (34.4%), biológicos 5 (17.2%); tratamiento sin FARME 1 (3.4%); con uso de glucocorticoides 10 (34.4%), sin uso de glucocorticoides 16 (55.1%).

Respecto a los análisis genéticos, se obtuvo una muestra de sangre total de cada uno de los participantes de los tres grupos evaluados en este estudio. Se realizó la extracción del DNA y se procedió a la realización del RT-PCR con sondas Taqman (ver técnica en material y métodos), los resultados de los tres grupos se presentan en la tabla 5. Nuestros resultados muestran que la variante rs704840 del gen *TNFSF4* no es un factor de riesgo para el desarrollo de queratitis ulcerativa periférica o queratitis ulcerativa periférica en pacientes con artritis reumatoide, ya que el valor de p fue mayor a 0.05 en todos los grupos estudiados.

Tabla 1. Antecedentes demográficos de los pacientes

	Con QUP n=9	Sin QUP n=17	QUP sin AR n=3	Total n=29
Lugar de origen				
Ciudad de México	2 (6.8%)	8 (27.5%)		10 (34.4%)
Estado de México	0 (0%)	4 (13.7%)		4 (13.7%)
Guanajuato	1 (3.4%)	0 (0%)		1 (3.4%)
Guerrero	1 (3.4%)	1 (3.4%)		2 (6.8%)
Hidalgo	1 (3.4%)	2 (6.8%)		3 (10.3%)
Morelos	1 (3.4%)	0 (0%)		1 (3.4%)
Oaxaca	1 (3.4%)	1 (3.4%)		2 (6.8%)
Puebla	0 (0%)	1 (3.4%)		1 (3.4%)
San Luis Potosí	1 (3.4%)	0 (0%)		1 (3.4%)
Zacatecas	1 (3.4%)	0 (0%)		1 (3.4%)

AR: Artritis reumatoide, QUP: Queratitis ulcerativa periférica.

Tabla 2. Antecedentes personales patológicos de los pacientes

	Con QUP n=9	Sin QUP n=17	QUP sin AR n=3	Total n=29
Tabaquismo				
Positivo	0 (0%)	7 (24.1%)		7 (24.1%)
Negativo	9 (31.0%)	10 (34.4%)		19 (65.5%)
Comorbilidades				
Diabetes tipo II	3 (10.3%)	4 (13.7%)		7 (24.1%)
Hipertensión Arterial Sistémica	4 (13.7%)	5 (17.2%)		9 (31.0%)
Infarto Agudo al Miocardio	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)
Hipotiroidismo	1 (3.4%)	0 (0%)		1 (3.4%)
Cáncer	0 (0%)	2 (6.89%)		2 (6.8%)

AR: Artritis reumatoide, QUP: Queratitis ulcerativa periférica.

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes

	Con QUP n=9	Sin QUP n=17	QUP sin AR n=3	Total n=29
Factor reumatoide				
Negativo	4 (13.7%)	2 (6.8%)		6 (20.6%)
Positivo bajo	2 (6.8%)	3 (10.3%)		5 (17.2%)
Positivo alto	3 (10.3%)	12 (41.3%)		15 (51.9%)
No especificado	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)
Anti-CCP				
Negativo	7 (24.1%)	3 (10.3%)		10(34.4%)
Positivo bajo	0 (0%)	1 (3.4%)		3 (10.3%)
Positivo alto	2 (6.8%)	12 (41.3%)		14 (48.2%)

No especificado	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)
Estado nutricional (IMC)				
Bajo peso (<18.5)	1 (3.4%)	1 (3.4%)		2 (6.8%)
Normal (18.6-24.9)	3 (10.3%)	6 (20.6%)		9 (31.0%)
Sobrepeso (25-29.9)	3 (10.3%)	7 (24.1%)		10 (34.4%)
Obesidad grado I (30-34.9)	2 (6.8%)	2 (6.8%)		4 (13.7%)
Obesidad grado II (>35)	0 (0%)	1 (3.4%)		1 (3.4%)
Nódulos reumatoides				
Presentes	2 (6.8%)	1 (3.4%)		3 (10.3%)
Ausentes	7 (24.1%)	16 (55.1%)		23 (79.3%)
DAS-28 PCR				
Remisión	5 (17.2%)	8 (27.5%)		13 (44.8%)
Actividad leve	2 (6.8%)	2 (6.8%)		4 (13.7%)
Actividad moderada	1 (3.4%)	6 (20.6%)		7 (24.1%)
Actividad alta	1 (3.4%)	1 (3.4%)		2 (6.8%)
DAS-28 VSG				
Remisión	3 (10.3%)	5 (17.2%)		8 (27.2%)
Actividad leve	2 (6.8%)	4 (13.7%)		6 (20.6%)
Actividad moderada	2 (6.8%)	3 (10.3%)		5 (17.2%)
Actividad alta	2 (6.8%)	5 (17.2%)		7 (24.1%)

Anti-CCP: Anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinado, AR: Artritis reumatoide, DAS-28: Disease Activity Score, remisión <2.6, actividad leve 2.6-3.2, moderada 3.2-5.1, alta >5.1; IMC: Índice de masa corporal; Positivo bajo: menos de tres veces su límite superior normal, Positivo alto: más de tres veces su límite superior normal; QUP: Queratitis ulcerativa periférica.

Tabla 4. Tratamiento actual de los pacientes

	Con QUP n=9	Sin QUP n=17	QUP sin AR n=3	Total n=26
Tratamiento con FARME				
Metotrexato	8 (27.2%)	14 (48.2%)		22 (75.8%)
Hidroxicloroquina	0 (0%)	1 (3.4%)		1 (3.4%)
Leflunomida	2 (6.8%)	3 (10.3%)		5 (17.2%)
Sulfasalazina	4 (13.7%)	6 (20.6%)		10 (34.4%)
Biológicos	1 (3.4%)	4 (13.7%)		5 (17.2%)
Tratamiento sin FARME	1 (3.4%)	0 (0%)		1 (3.4%)
Uso de glucocorticoide				
Sí	6 (10.3%)	4 (13.7%)		10 (34.4%)
No	3 (10.3%)	14 (48.2%)		16 (55.1%)

AR: Artritis reumatoide, FARME: Fármaco antirreumático modificador de la enfermedad, QUP: Queratitis ulcerativa periférica.

Tabla 5. Frecuencias genotípicas, alélicas y análisis de asociación del SNP rs704840 T/G del gen *TNFSF4* entre pacientes con artritis, queratitis ulcerativa periférica y artritis+queratitis ulcerativa periférica

Grupo (n)	Modelo codominante			OR (95% CI)	P
	11 n(%)	12 n(%)	22 n(%)		
	TT	TG	GG		
AR (17)	7 (41.2)	6 (35.3)	4 (23.5)		
AR+QUP (9)	2 (22.2)	5 (55.6)	2 (22.2)	2.92 (0.41 – 20.9)	0.55
QUP (3)	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	0.17 (0.06 – 22.9)	0.94
	Modelo alélico			OR (95% CI)	P
	1	2			
	T	G			
AR (17)	20 (59)	14 (41)			
AR+QUP (9)	9 (50)	9 (50)		1.42 (0.45 – 4.50)	0.54
QUP (3)	3 (50)	3 (50)		1.42 (0.25 – 8.13)	0.68

1=T, 2=G; p<0.05: estadísticamente significativo. SNV: variante de un solo nucleótido; OR: odds ratio; CI: Intervalo de confianza; AR: Artritis reumatoide; AR+QUP: Artritis reumatoide + Queratitis ulcerativa periférica; QUP: Queratitis ulcerativa periférica.

12. Discusión

La AR es una enfermedad crónica, tipo autoinmune, con una amplia gama de manifestaciones tanto articulares como extraarticulares (1,5,6,7,8). La QUP, es una afectación extraarticular grave de la AR, traducida en inflamación corneal, que tiene el potencial de provocar ceguera irreversible (10,11,15). El origen de la AR y de la QUP aún es desconocido, sin embargo, se ha demostrado que los factores genéticos participan en su desarrollo, varios genes han sido propuestos como genes candidatos para estas dos enfermedades, uno de ellos es el gen *TNFSF4* el cual codifica proteínas unidas a membrana que se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígeno (OX40L o CD252), cuyo receptor está expresado en células CD4+ y CD8+. El OX40 y su ligando OX40L, son expresados y regulados en células T, natural killer, células B y células dendríticas (20). La interacción entre OX40 y su ligando se ha relacionado con varias funciones regulatorias asociadas

con la activación, proliferación y supervivencia de células T, así como con la producción de citoquinas, generación de células de memoria y la presencia de autoanticuerpos en AR (17).

Las variantes de *TNFSF4*, rs1234315, rs2205960 y rs704840 han sido estudiadas en pacientes mexicanos con AR, comprobado su asociación con la enfermedad; de igual forma se han estudiado en pacientes mexicanos con síndrome de Sjögren sin encontrarse asociación (17). Sin embargo, la asociación entre *TNFSF4* y el desarrollo de QUP tanto en pacientes con AR como en pacientes sin enfermedad autoinmune no ha sido descrita, por lo que nos interesamos en evaluar la variante rs704840T/G en pacientes con QUP. Los resultados obtenidos de la evaluación del SNP rs704840, no se asociaron con susceptibilidad ni gravedad para desarrollar QUP en mujeres, mexicanas, mestizas con AR, ni se encontró asociación en pacientes con QUP sin enfermedad autoinmune asociada.

Nuestro estudio es el primero en evaluar la variante rs704840 del gen *TNFSF4* en la QUP, lo cual nos ayudará a conocer los factores genéticos asociados a la aparición de la enfermedad, en este caso y de acuerdo a nuestro estudio, la variante rs704840T/G no es un factor de riesgo para el desarrollo de la QUP, sin embargo, hay que señalar que el tamaño de muestra del estudio es muy bajo, lo que podría influir en la ausencia de asociación. En estudios posteriores, deberá aumentarse el tamaño de muestra para encontrar la verdadera asociación de la variante rs704840 con AR con QUP y QUP sola.

13. Conclusión

- El SNP rs704840, localizado en *TNFSF4* no es un factor de riesgo para el desarrollo de QUP en pacientes con AR, ni para el desarrollo de QUP sin enfermedad autoinmune asociada, en mujeres mexicanas.

- El SNP rs704840 no se asoció con gravedad en pacientes con AR con QUP, ni con QUP sin enfermedad autoinmune asociada, en mujeres mexicanas.

14. Bibliografía

- 1) Lin YJ, Anzaghe M, Schülke S. Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells*. 2020;9(4):880.
- 2) Cush JJ. Rheumatoid Arthritis: Early Diagnosis and Treatment. *Rheum Dis Clin North Am*. 2022; 48(2):537-547.
- 3) van der Woude D, van der Helm-van Mil AHM. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2018;32(2):174-187.
- 4) Figus FA, Piga M, Azzolin I, McConnell R, Iagnocco A. Rheumatoid arthritis: Extra-articular manifestations and comorbidities. *Autoimmun Rev*. 2021; 20(4):102776.
- 5) Aletaha D, Smolen JS. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA*. 2018; 320(13):1360-1372.
- 6) Conforti A, et al. Beyond the joints, the extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2021;20(2):102735.
- 7) Marcucci E, et al. Extra-articular rheumatoid arthritis. *Reumatismo*. 2018; 70(4):212-224.
- 8) Kemeny-Beke A, Szodoray P. Ocular manifestations of rheumatic diseases. *Int Ophthalmol*. 2020;40(2):503-510.
- 9) Radu AF, Bungau SG. Management of Rheumatoid Arthritis: An Overview. *Cells*. 2021;10(11):2857.
- 10) Gomes BF, Santhiago MR. Biology of peripheral ulcerative keratitis. *Exp Eye Res*. 2021;204:108458.
- 11) Cohen F, et al. Peripheral ulcerative keratitis in rheumatoid arthritis patients taking tocilizumab: paradoxical manifestation or insufficient efficacy? *Rheumatology (Oxford)*. 2021;60(11):5413-5418.

- 12) Hassanpour K, et al. Peripheral Ulcerative Keratitis: A Review. *J Ophthalmic Vis Res.* 2022;17(2):252-275.
- 13) Gupta Y, et al. Peripheral ulcerative keratitis. *Surv Ophthalmol.* 2021; 66(6):977-998.
- 14) Barbosa R, De Anda A, Lugo G, De la Torre C. Queratitis ulcerativa periférica. *An Med (Mex)* 2016; 61(3):195-201
- 15) Reddy AK, Kolfenbach JR, Palestine AG. Ocular manifestations of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Ophthalmol.* 2022;33(6):551-556.
- 16) Höllhumer R. Peripheral ulcerative keratitis: A review of aetiology and management. *Afr Vision Eye Health.* 2022;81(1): a697.
- 17) Ramírez J, et al. *TNFSF4* is a risk factor for rheumatoid arthritis but not for primary Sjögren's syndrome in the Mexican population. *Immunobiology.* 2022; 227(4):152244.
- 18) Vinay DS, Kwon BS. Targeting TNF superfamily members for therapeutic intervention in rheumatoid arthritis. *Cytokine.* 2012;57(3):305-12.
- 19) Yang Y, et al. Associations between *TNFSF4* gene polymorphisms (rs2205960 G > A, rs704840 T > G and rs844648 G > A) and susceptibility to autoimmune diseases in Asians: a meta-analysis. *Immunol Invest.* 2021;50(2-3):184-200.
- 20) Croft M, Duan W, Choi H, Eun SY, Madireddi S, Mehta A. TNF superfamily in inflammatory disease: translating basic insights. *Trends Immunol.* 2012; 33(3):144-52.

15. Anexos



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Dirección de Investigación y Enseñanza
Comité de Investigación

Ciudad de México, a 16 de enero de 2023.

CI/014/2023

Asunto: Carta de Aceptación

DRA. ADA ROCÍO MORALES MEZA

Médico Residente

Presente

En relación al proyecto de tesis titulado **“EVALUACIÓN DE LA VARIANTE GENÉTICA RS704840 DE TNFSF4 Y SU RELACIÓN CON QUERATITIS ULCERATIVA PERIFÉRICA EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE”**, con número de registro **HJM 131/22-R**, bajo la dirección del Dr. Gustavo Lugo Zamudio, fue evaluado por el Subcomité para Registro de Protocolos de Tesis de Especialidades Médicas, quienes dictaminan:

“ACEPTADO”

A partir de esta fecha queda autorizado y podrá dar inicio al protocolo. La vigencia para la culminación del proyecto es de un año, quedando como fecha límite para la entrega de este, el 16 de enero del 2024.

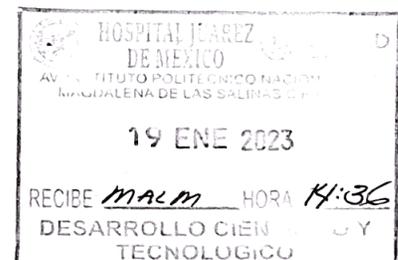
Le informo también que cualquier gasto adicional que sea necesario para el desarrollo de su proyecto deberá ser costeado por usted, por lo tanto, será necesario contar con recursos para cubrir los costos adicionales generados por el mismo.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. en C. Juan Manuel Bello López
Presidente del Comité de Investigación
Hospital Juárez de México

JMBL/NSW/MVC



Av. Instituto Politécnico Nacional No. 5169, Col. Magdalena de las Salinas C.P. 07760, Alcaldía Gustavo A. Madero CDMX
Tel: 57-47-75-60 Ext. 7375



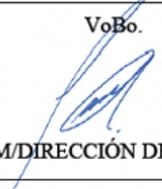
2023
AÑO DE
**Francisco
VILLA**



Lista de Cotejo de Validación de Tesis de Especialidades Médicas

Fecha	13	julio	2023
	día	mes	año

INFORMACIÓN GENERAL (Para ser llenada por el área de Posgrado)					
No. de Registro del área de protocolos	Si	<input checked="" type="checkbox"/>	No	Número de Registro	HJM 131/22-R
Título del Proyecto EVALUACIÓN DE LA VARIANTE GENÉTICA rs704840 DE TNFSF4 Y SU RELACIÓN CON QUERATITIS ULCERATIVA PERIFÉRICA EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE					
Nombre Residente	ADA ROCÍO MORALES MEZA				
Director de tesis	DR. GUSTAVO ESTEBAN LUGO ZAMUDIO				
Director de tesis metodológico	DRA. ROSA ELDA BARBOSA COBOS				
Ciclo escolar que pertenece	2023-2024	Especialidad	REUMATOLOGÍA		
INFORMACIÓN SOBRE PROTOCOLO/TESIS (Para ser validado por la División de Investigación/SURPROTEM)					
VERIFICACIÓN DE ORIGINALIDAD	HERRAMIENTA	PLAGIUS	PORCENTAJE	20%	
COINCIDE TÍTULO DE PROYECTO CON TESIS	SI	<input checked="" type="checkbox"/>	NO		
COINCIDEN OBJETIVOS PLANTEADOS CON LOS REALIZADOS	SI	<input checked="" type="checkbox"/>	NO		
RESPONDE PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	SI	<input checked="" type="checkbox"/>	NO		
RESULTADOS DE ACUERDO CON ANÁLISIS PLANTEADO	SI	<input checked="" type="checkbox"/>	NO		
CONCLUSIONES RESPONDEN PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	SI	<input checked="" type="checkbox"/>	NO		
PRETENDE PUBLICAR SUS RESULTADOS	SI		NO	x	
VALIDACIÓN (Para ser llenada por el área de Posgrado)					
Si	<input checked="" type="checkbox"/>	Comentarios:			
No		Tesis validada para continuar su trámite de titulación en Enseñanza.			

VoBo.

SURPROTEM/DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN