

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA  
CIUDAD DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

***“POLIMORFISMOS EN LOS GENES CTLA4, MBL Y CFH Y SU  
ASOCIACIÓN CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO EN  
PACIENTES PEDIÁTRICOS MEXICANOS”***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

**P R E S E N T A**

**QFB. MARÍA GUADALUPE SALAS MARTÍNEZ**

**T U T O R**

**DRA. LORENA OROZCO**

**COTUTOR**

**DR. RAFAEL VELÁZQUEZ**

**A S E S O R E S**

**DR. HUMBERTO NICOLINI**

**M. EN C. SILVIA JIMÉNEZ**

**MÉXICO, D.F.**

**MARZO, 2007**

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

### DERECHOS RESERVADOS<sup>©</sup>

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

3-20786

**Este proyecto ha sido apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) México, Salud 2004-01-153; Fondo de Fomento para la Investigación Médica (FOFOI) FP-2003/014; así como económica y académicamente por la Universidad Autónoma de la ciudad de México (UACM).**

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Genómica de Enfermedades Multifactoriales del Instituto Nacional de Medicina Genómica, en colaboración con los hospitales Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital Infantil de México, Centro Médico La Raza y el Instituto Nacional de Pediatría, bajo la dirección de la Dra. Lorena Orozco y el Dr. Rafael Velázquez Cruz, y la asesoría de la M en C. Silvia Jiménez Morales y el Dr. Humberto Nicolini.**

**Un agradecimiento muy especial a las Familias con Lupus Eritematoso Sistémico, por permitirnos realizar éste estudio, mi agradecimiento infinito.**

## DEDICATORIAS

A Raúl, por estar siempre a mi lado amándome, respetándome y apoyando mis decisiones, compartiendo los buenos momentos y superando los momentos difíciles que nos permiten cada día crecer juntos.

A alguien muy especial en mi vida que permitió concluir una etapa más en mi formación académica y que es la razón de seguir adelante cada día.

A mi Papá José Salas Juárez, por ser un gran hombre por estar siempre ahí, a mi lado, en las buenas y en las malas, apoyándome en todos los aspectos y por darme lo más valioso de la vida su amor, confianza, comprensión y cariño; por inculcarme tantos valores; y “aunque físicamente no este” siempre estará en mi corazón.

A mi Mamá Silvia Martínez Medina, por brindarme la fortaleza y sensibilidad a través de su amor, por su deseo de superación y capacidad de superar cualquier adversidad, y sobre todo porque esta apoyando y contribuyendo con mi caminar en la vida.

A mi Familia, hermanos Hilda, Armando, Alfredo, José Antonio, Marisol y Juan Isidro; a todos mis sobrinos...y a todos los que siempre me han dado su cariño, apoyo moral y confianza y por permitirme disfrutarlos por estar siempre a mi lado, dispuestos a todo.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios ...por darme la vida y la oportunidad de cambiar día a día.

A la Dra. Lorena Orozco, por compartirme parte de sus grandes conocimientos que me han permitido concluir una de las etapas más importantes en mi formación académica; por la confianza y apoyo profesional y humano que son base fundamental en la realización de esta tesis y por haber aceptado ser mi tutora.

A Rafael Velázquez Cruz, por su valiosa participación, por su paciencia y confianza que me permitieron concluir una de las etapas más importantes en mi vida profesional; y por haber sido mi co-tutor

A Silvia Jiménez Morales, por su apoyo, moral y por compartir conmigo su experiencia académica, además de su gran asesoría que tuve y que fue invaluable en la realización de esta tesis.

Al Dr. Humberto Nicolini S, por su brillante asesoría, apoyo profesional y participación en la realización de esta tesis.

Al Dr. Vicente Baca, por su confianza en facilitarnos las muestras de sus pacientes y compartirnos parte de sus conocimientos e importante apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Francisco Espinoza, y todos los residentes que contribuyeron en la captación de las muestras.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de enfermedades multifactoriales, Silvia, Yolanda, Julian, Rafael, Emilio, Teresa, Federico y a la Dra. Lorena; por su apoyo en la contribución de mi desarrollo profesional y por todas las cosas que hemos compartido...!Gracias!

A todos los chicos estudiantes, Humberto G., Alfredo, Angel, Juan, Erika y Humberto M., por brindarme su amistad y apoyo en este laboratorio.

A nuestra directora del posgrado Dra. Esther Orozco, y nuestra coordinadora Minerva Camacho, por habernos brindado toda su confianza, apoyo académico pero sobre todo compartir conmigo su calidad humana.

A mis amigos y compañeros del posgrado Julian, Karla, Mauro, Jorge, Vicenta, Paloma, Alberto, Veronica, Paty, Alma, por compartir conmigo su amistad, sus conocimientos, y por su apoyo incondicional para crecer juntos.

ÍNDICE	PÁGINA
Dedicatoria -----	ii
Agradecimientos -----	v
Índice de Figuras -----	ix
Índice de tablas -----	ix
Abreviaturas -----	xi
Resumen -----	1
I. Introducción -----	3
Lupus -----	4
Lupus Eritematosos Sistémico -----	5
Epidemiología -----	6
Manifestaciones clínicas -----	6
Diagnóstico -----	7
Tratamiento -----	8
Patogenia -----	9
Alteraciones inmunológicas -----	10
Linfocitos B y auto anticuerpos -----	12
Factores Genéticos -----	14
Estudios de Asociación -----	15
Genes candidatos relevantes en la etiopatogénia de LES -----	17
Complejo principal de histocompatibilidad -----	19
Gen antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos -----	19
Genes del complemento -----	21
Gen de lectina de unión a manosa -----	24
Gen factor H del complemento -----	27
II. Justificación -----	30

III. Objetivos	
Objetivo general -----	31
Objetivos particulares -----	31
IV. Hipótesis -----	32
V. Material y método -----	32
Población de estudio -----	32
Clasificación de la investigación -----	33
Extracción de DNA -----	33
Genotipificación de SNPs en genes candidato -----	34
Diseño de oligonucleotidos y sondas específicas -----	35
Método fluorescente de la 5' exonucleasa -----	35
Análisis estadístico -----	37
VI. Resultados -----	37
Gen <i>CTLA4</i> -----	38
Gen <i>MBL</i> -----	45
Gen <i>CFH</i> -----	54
VI I. Discusión -----	56
VIII. Conclusiones -----	63
IX. Bibliografía -----	64
X. Anexo -----	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de enfermedades autoinmunes .....	3
Figura 2. Esquematización de los tipos de LES y algunas manifestaciones clínicas .....	5
Figura 3. Estudios de asociación .....	17
Figura 4. Interacción célula presentadora de antígeno con células T .....	22
Figura 5. Activación y regulación del Complemento .....	24
Figura 6. Estructura del gen <i>MBL2</i> y su proteína .....	26
Figura 7. Representación del gen <i>CFH</i> .....	29
Figura 8. Gel de integridad del ADN .....	34
Figura 9. Representación de la discriminación genotípica .....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de clasificación clínica de LES .....	8
Tabla 2. Secuencias de sondas para el ensayo 5' exonucleasa .....	35
Tabla 3. Grupo de estudio .....	38
Tabla 4. Distribución genotípica y alélica del SNP -318(C/T) del Gen <i>CTLA4</i> .....	39
Tabla 5. Distribución genotípica y alélica del SNP -318(C/T) del Gen <i>CTLA4</i> en la población femenina .....	40
Tabla 6. Distribución genotípica y alélica del SNP 49(A/G) del gen <i>CTLA4</i> .....	41
Tabla 7. Distribución genotípica y alélica del SNP +49(A/G) del gen <i>CTLA4</i> en población femenina .....	42

Tabla 8. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo CT60(A/G) del gen CTLA4 -----	43
Tabla 9. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo CT60(A/G) del gen CTLA4 en la población Femenina -----	44
Tabla 10. Análisis de los haplotipos en el Gen <i>CTLA4</i> -----	45
Tabla 11. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo -550(C/G) del gen MBL -----	46
Tabla 12. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo -550(C/G) del gen MBL en la población femenina -----	47
Tabla 13. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo 52(C/T) del gen MBL -----	48
Tabla 14. Distribución genotípica y alélica del SNP 52C/T) del gen MBL en población Femeninos -----	49
Tabla 15. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo 54A/G del gen MBL -----	50
Tabla 16. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo 54(A/G) del gen MBL en población femenina -----	51
Tabla 17. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo 57G/A del gen <i>MBL</i> -----	52
Tabla 18. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo 57G/A del gen <i>MBL</i> en población femenina -----	53
Tabla 19. Análisis de los haplotipos de los SNPs del Gen <i>MBL</i> -----	54
Tabla 20. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo 402T/C del gen <i>CFH</i> -----	55

## ABREVIATURAS

a.a	Aminoácido
AAF	Anticuerpos anti-fosfolípidos
AARo	Anticuerpos anti-ribonucleoproteínas
ACR	Colegio Americano de Reumatología
ANA	Anticuerpos antinucleares
APC	Célula presentadora de antígenos
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
CD	Proteínas de diferenciación celular
CFH	Factor H del complemento
COX-2	Ciclo oxigenas-2
CRD	Dominio de reconocimiento de carbohidratos
CTLA4	Antígeno 4 de los linfocitos T citotóxico
Cys	Cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilen – diaminotetracético
EA	Enfermedad Autoinmune
Fc	Fracción cristalizable de un anticuerpo
Fc $\gamma$	Fracción gama cristalizable
Fc $\gamma$ RI	Receptor I de la fracción gama cristalizable
Fc $\gamma$ RII	Receptor II de la fracción gama cristalizable
Fc $\gamma$ RIII	Receptor III de la fracción gama cristalizable
FLIP	Proteína inhibidora viral
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
HLA	Antígeno leucocitario humano
IgG	Inmunoglobulina subtipo G
IgM	Inmunoglobulina subtipo M
IL	Interleucina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social

INMEGEN	Instituto Nacional de Medicina Genómica
INF $\gamma$	Interferon gama
INP	Instituto Nacional de Pediatría
IRF5	Factor 5 regulador del interferon
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
Kp	Prevalencia de la enfermedad en la población
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
LB	Linfocitos B
LD	Desequilibrio de ligamiento
LOD	Valor de desequilibrio de ligamiento
LT	Linfocitos T
MBL	Lectina de unión a manosa
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MEP	Metilprednisolona
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
NSAID	Anti-inflamatorios no esteroides
NF - $\kappa\beta$	Factor nuclear kappa beta
OR	Razón de momios
RCB	Receptores de células B
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTPN22	Tirosin – fosfatasa 22
TAPBP	Proteína de unión a TAP
TDT	Prueba de desequilibrio de transmisión
TE	Tris - EDTA
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
Thr	Treonina
TNF – $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TYK2	Tirosina cinasa 2
SCLE	Lupus eritematoso cutáneo subagudo

SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
STRs	Repeticiones cortas en tandem
UTR	Región no traducidas
UV	Luz ultra violeta
VEB	Virus Epstein Bar
VNTRs	Repeticiones en tandem de número variable
Valor $\lambda$	Riesgo de los familiares a padecer la enfermedad
$\lambda_s$	Riesgo de recurrencia en hermanos

## RESUMEN

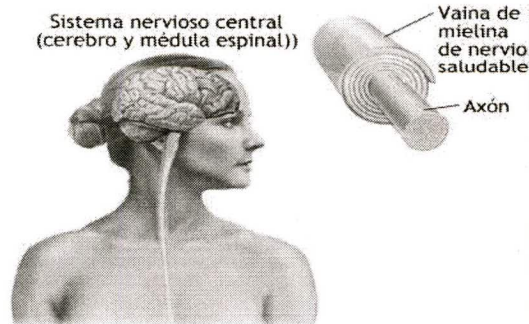
**INTRODUCCIÓN:** El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es el prototipo de las enfermedades autoinmunes, se caracteriza por la producción de una gran variedad de autoanticuerpos y daño a múltiples órganos. El LES afecta principalmente al sexo femenino (>90%) y aproximadamente el 15-17% de todos los casos se manifiesta en la edad pediátrica. El LES es una enfermedad multifactorial que resulta de la interacción de múltiples genes con el medio ambiente. Recientemente, diversos estudios han identificado SNPs asociados a LES en genes que participan en la respuesta inmune y en la respuesta contra patógenos, tales como *CTLA4* y *MBL* respectivamente. Sin embargo estos resultados no han sido replicados en todas las poblaciones analizadas. **OBJETIVO:** Determinar si polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en los genes *CTLA4* y *MBL*, se encuentran asociados a la susceptibilidad para desarrollar LES en pacientes pediátricos mexicanos. **MATERIALES Y MÉTODOS:** Se realizó un estudio de asociación de casos y controles. En el análisis se incluyeron 250 pacientes no relacionados diagnosticados con LES antes de los 16 años de edad, sus padres y 355 controles sanos. El proyecto incluyó el análisis de 3 polimorfismos en el gen *CTLA4*, 4 en el gen *MBL* y 1 en el gen *CFH*, el cual codifica para el principal inhibidor de la vía alterna del complemento, el factor H. En todos los individuos se extrajo DNA genómico a partir de una muestra de sangre periférica. El análisis de discriminación alélica, se realizó mediante la técnica fluorescente de la 5' exonucleasa (Taqman). La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas entre casos y controles fueron comparadas mediante  $X^2$  y prueba exacta de Fisher. Para determinar si las poblaciones analizadas se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg se utilizó el programa FINETTI (utilizando la prueba de  $X^2$ ). Las frecuencias alélicas de los casos y controles fueron usadas para calcular la razón de momios (OR) con un intervalo de confianza del 95% (95% IC). El análisis de haplotipos se realizó mediante el programa HAPLOVIEW v3.2. Los valores de  $P \leq 0.05$  fueron considerados como

significativos. **RESULTADOS:** El análisis de los SNPs -318C/T y 49A/G del gen *CTLA4* y -550 G/C, 52C/T, 54G/A y 57A/G del gen *MBL*, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes y los controles cuando se compararon la distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de estos polimorfismos. Tampoco las frecuencias de los haplotipos conformados por los cuatro SNPs del gen *MBL*. Sin embargo, el alelo A del SNP CT60A/G del gen *CTLA4* reveló una asociación significativa con susceptibilidad para desarrollar LES en edad pediátrica cuando se realizó la comparación entre pacientes y controles (47.3% vs 41.67%,  $p=0.050$ , OR= 1.26 95% CI= 1-1.586), datos que también se observaron en el análisis de las frecuencias del alelo A en pacientes femeninos y controles femeninos (46.67% vs 40.32%,  $p=0.042$ , OR=1.29 95% CI=1.01-1.663). El análisis de haplotipos en casos y controles femeninos en el gen *CTLA4* (318C/T, 49A/G, CT60 A/G), evidenció la presencia de cinco haplotipos, de los cuales solamente cuatro mostraron una frecuencia mayor al 1%. El haplotipo CGG se detectó en el 49% de los controles, mientras que en los pacientes, se observó en el 42.34% ( $p=0.03$ ); sin embargo, después de corregir el valor de  $P$  con 10,000 permutaciones ésta diferencia perdió su significancia estadística ( $p=0.12$ ). Por otro lado, el haplotipo CAA se observó con mayor frecuencia en pacientes que en controles (46% vs 40%), pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0.06$ ). Por otro lado y de forma relevante, en este trabajo se documenta por primera vez la asociación del polimorfismo rs1061170 T/C (Y402H) del gen *CFH* que codifica para el factor H involucrado en la regulación de la vía alterna del complemento, con la susceptibilidad a desarrollar LES ( $P = 0.0040$ , OR = 1.595, 95% IC: 1.16-2.19). **CONCLUSIONES:** Estos resultados sugieren que el alelo A del SNP CT60A/G del gen *CTLA4*, así como el alelo 402H del gen *CFH* están asociados a la susceptibilidad de desarrollar LES de inicio en la edad pediátrica en nuestra población. Mientras que el genotipo homocigoto GG del SNP CT60AG y el haplotipo CGG del gen *CTLA4* confieren protección en nuestra pacientes pediátricos mexicanos con LES.

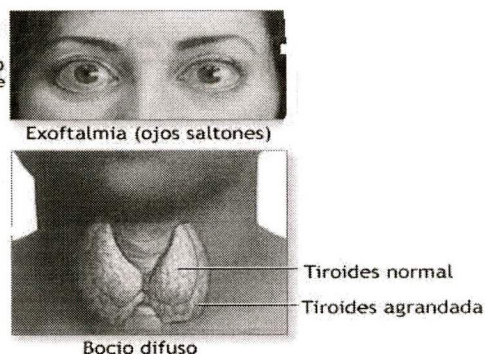
# I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades autoinmunes (EA) son entidades complejas de curso crónico que resultan de la pérdida de tolerancia a antígenos propios. Estas enfermedades tienen una prevalencia del 4-5% de la población general, con un mayor predominio en el sexo femenino. De hecho, se propone que aproximadamente 1 de cada 30 individuos padece algún tipo de EA (Vyse y Todd, 1996). Las EAs se caracterizan por la presencia de alteraciones en uno o más tejidos tales como viceromegalia, hipertrofia del músculo cardíaco, nefropatías, artropatías, entre otras. Los trastornos autoinmunes más comunes son: tiroiditis de Hashimoto, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes tipo I, artritis reumatoide, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple, enfermedad de Graves y lupus (fig. 1).

## a) ESCLEROSIS MÚLTIPLE



## b) ENFERMEDAD DE GRAVES

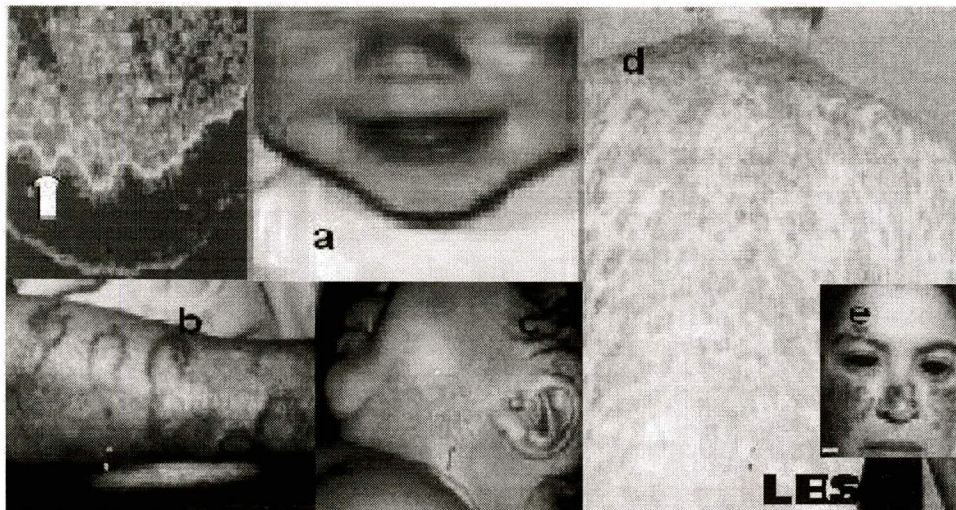


**Figura 1.** Ejemplos de enfermedades autoinmunes. a) **Esclerosis Múltiple**, que es una enfermedad que afecta a la mielina o materia blanca del cerebro (la vaina de mielina, es una sola célula cuya membrana envuelve los axones, sufre destrucción por inflamación y cicatrización) y de médula espinal, provocando la aparición de placas escleróticas que impiden el funcionamiento normal de esas fibras nerviosas. b) **Enfermedad de Graves**, que es la causa común de hipertiroidismo, hay una producción excesiva de hormona tiroidea, la cual causa el agrandamiento de la tiroides y otros síntomas, como la exoftalmia (intolerancia al calor y ansiedad).

# LUPUS

El nombre de “Lupus” proviene del latín que significa “lobo”, ya que las lesiones en el rostro de los pacientes, semeja a la máscara de un lobo. Esta patología comprende un grupo de enfermedades caracterizadas principalmente por la pérdida de tolerancia a antígenos propios (Sánchez-Rodríguez y cols., 2004). Con base a sus manifestaciones clínicas y a su desarrollo, en esta entidad se identifican 4 tipos:

1. **Lupus discoide**, caracterizada por lesiones en la piel parecidas a cicatrizaciones; las manifestaciones clínicas de este tipo de lupus se limitan a la piel, las cuales se identifican por una erupción que puede aparecer en la cara, la nuca y el pericráneo. El diagnóstico de lupus discoide se realiza a partir de una biopsia de la erupción. Esta entidad, no compromete órganos internos, pero puede evolucionar a un lupus sistémico, donde se ven afectados diversos órganos o sistemas (fig. 2).
2. **Lupus eritematoso cutáneo subagudo (SCLE)**, caracterizado por dermatitis fotosensible, no hay daño en la piel y no existe cicatrización (fig. 2).
3. **Lupus inducido por drogas**: esta entidad, se desarrolla después del uso de ciertos medicamentos, sus síntomas son similares a los de lupus sistémico y suelen desaparecer cuando se suspende el tratamiento. Los fármacos comúnmente asociados con esta enfermedad son la hidralazina (usada para tratar hipertensión arterial) y la procainamida (usada para tratar arritmias).
4. **El lupus eritematoso sistémico (LES)**. Comprende el tipo de enfermedad lúpica más grave (fig. 2).



**Figura 2.** Esquemática de los tipos de LES y algunas manifestaciones clínicas. Banda lúpica, observada en biopsia de piel por inmunofluorescencia indirecta en suero de paciente con LE, la flecha indica la unión dermoepidérmica en donde se depositan los complejos inmunes, **a)** lesión cutánea: eritema en alas de mariposa en el rostro de un paciente con LE, **b)** lesión característica de lupus discoide, **c)** lupus eritematoso neonatal **d)** ejemplo de lupus cutáneo subagudo **e)** LES

## LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

El lupus eritematoso sistémico (LES) es el prototipo de las enfermedades autoinmunes, se caracteriza por la producción de autoanticuerpos contra una gran variedad de antígenos tisulares, como DNA (principalmente contra DNA de doble-cadena), histonas, eritrocitos, plaquetas, leucocitos, factores de la coagulación, ribonucleoproteínas y fosfolípidos de membrana; así como por la activación del sistema del complemento y el depósito de complejos inmunes, que afecta diferentes órganos y sistemas; (Tan y cols., 1982).

## **A. Epidemiología**

Aunque la prevalencia de LES varía entre los distintos grupos étnicos y raciales, se estima que esta entidad se presenta en 1 de cada 2,000 individuos, con mayor predominio en afro-americanos, orientales e hispanos, afectando principalmente a las mujeres en edad reproductiva. En Finlandia se describe la presencia de 1-2 por 250, 000, en Cánada 1 por 200,000 mientras que en Taiwan se reportan 6 casos por cada 100 000 individuos (Malleon y cols., 1996; Huemer y cols., 2001; Huang y cols., 2004).

De hecho, su incidencia en mujeres caucásicas con inicio de LES antes de los 19 años de edad es de entre 6 y 18.9 casos/100, 000, mientras que en mujeres afroamericanas es de 20-30/100, 000 y en mujeres de Puerto Rico es de 16-36.7/100, 000 (Jiménez y cols., 2003). En niños, el LES se presenta en 1 de cada 10 000 individuos y comúnmente se manifiesta en la etapa de la adolescencia (Boon y McCurdy, 2002).

Al igual que en población adulta en la adolescencia la relación entre sexos indica una mayor prevalencia de la enfermedad en niñas comparada con los niños (9:1). Siendo su aparición más comunmente después de la pubertad; rara vez se manifiesta antes de los 5 años de edad(Boon y McCurdy, 2002).

## **B. Manifestaciones Clínicas de LES**

Al inicio de la enfermedad la mayoría de los niños (cerca del 90%) manifiestan síntomas sistémicos como fiebre, cansancio o pérdida de peso, los cuales pueden estar asociados con afectación renal (20-82%), alteraciones musculoesqueléticas (20-74%), eritema malar (22-74%), linfadenopatías (15-45%) y visceromegalia (15-74%) (Iqbal y cols., 1999, Bogdanovic y cols., 2004, Sibbitt y cols., 2002, Bader-

Meunier y cols., 2003). La nefritis, la hepato-esplenomegalia, así como la anemia hemolítica autoinmune y la trombocitopenia se presentan con mayor frecuencia en niños que en adultos (Lang y cols., 1993; Boon y McCurdy, 2002).

La inflamación generalizada en vasos y tejido conectivo que afectan a una amplia variedad de órganos y sistemas, son el resultado del depósito de complejos inmunes o secundarias a la acción específica de autoanticuerpos contra antígenos celulares específicos (Arnett y cols., 1997a). Estas características y el grado de afectación en los diferentes órganos varían dependiendo de la edad de presentación, el sexo y la raza; generalmente los síntomas en pacientes pediátricos son más graves y más agresivos que en los adultos (Swaak y cols., 1989; Lehman y cols., 1989; Vyas y cols., 2002). de hecho se ha estimado que la tasa de mortalidad en niños es el doble que en adultos (Moss y cols., 2002)

## **C. Diagnóstico**

La naturaleza heterogénea de LES hace que su diagnóstico sea un reto médico. Debido a que no hay síntomas patognomónicos de la enfermedad, el Colegio Americano de Reumatología (ACR) ha establecido criterios clínicos generales para la evaluación inicial de los pacientes con sospecha de lupus. Los criterios creados en 1982 y actualizadas en 1997 combinan 11 signos y síntomas (clínicos y de laboratorio) el diagnóstico de LES se establece cuando al menos cuatro de estos están presentes (tabla 1) (Hochberg, 1997). Aunque estos criterios fueron establecidos para adultos, también son muy útiles en pacientes pediátricos (Tan y cols., 1982).

## D. Tratamiento

El tratamiento de lupus depende de la gravedad de las manifestaciones clínicas y de la presencia o ausencia de afectación de órganos vitales. Aunque los corticoides constituyen una causa importante de morbilidad en el LES pediátrico, estos fármacos continúan siendo fundamentales en el tratamiento. La administración intravenosa de bolos de metilprednisolona (MEP) se ha utilizado con éxito cuando existe afectación de órganos vitales y/o ciertas manifestaciones que conllevan una elevada mortalidad. Los antipalúdicos son efectivos en presencia de manifestaciones más leves y, a su vez mejoran la densidad ósea y la dislipoproteinemia (Borba y cols., 2001). La ciclofosfamida (CYC) permanece como tratamiento de elección en la afectación de órganos vitales. Se ha demostrado que reduce la morbilidad y la mortalidad de pacientes con lupus.

**Tabla 1. Criterios de clasificación clínica de LES**

1	Eritema malar: eritema fijo, plano o elevado, sobre las prominencias malares, sin afectación de los pliegues nasolabiales.
2	Erupción discoide: placas eritematosas elevadas con descamación queratótica adherente; cicatrización atrófica que puede ocurrir en lesiones antiguas
3	Fotesensibilidad: erupción cutánea como resultado de una reacción inusual a los rayos solares, por historia u observación del médico.
4	Úlceras orales: ulceración oral o nasofaríngea, usualmente indolora, observada por el médico.
5	Artritis: no erosiva, involucrando a dos articulaciones periféricas o más, caracterizada por dolor, tumefacción o derrame.
6	Serositis a) Pleuritis: historia de dolor pleurítico, roce auscultado por el médico o evidencia de derrame pleural b) pericarditis: documentada por electrocardiograma, roce o evidencia de derrame pericárdico
7	Alteraciones renales a) proteinuria de más de 0.5 g/24h o 3+, persistente b) cilindros celulares: glóbulos rojos, hemoglobina, glanulares, tubulares o mixtos
8	Afección neurológica a) convulsiones: en ausencia de medicamentos ofensivos o de alteración metabólica b) Psicosis. En ausencia de medicamentos ofensivos o de alteración metabólica
9	Alteraciones hematológicas a) anemia hemolítica b) leucopenia inferior a 4.000/ul en dos o más ocasiones c) linfopenia inferior a 1.500/ul en dos o más ocasiones d) trombocitopenia inferior a 100.000/ul en ausencia de fármacos expeditivos
10	Alteración inmunológica a) anticuerpo anti-ADN elevado b) anticuerpo anti-Smith positivo c) hallazgos positivos de anticuerpos antifosfolípidos basado en: _ anticardiolipinas IgG/IgM _ prueba serológica de sífilis falsa positiva, presente como mínimo durante 6 meses _ anticoagulante lúpico
11	Anticuerpo anti-nuclear en valores elevados

Tomada de Hochberg MC, 1997.

En general los pacientes con LES son tratados con dosis bajas de esteroides, anti-inflamatorios no esteroides, cloroquina o metotrexate, aunque algunos pacientes requieren tratamientos más agresivos que incluyen dosis altas de esteroides, azatioprina, ciclosporina y ciclofosfamida (Carreño y cols., 2002).

La protección contra los rayos ultravioletas, tratamiento y prevención de las infecciones que podrían reducir la exacerbación y gravedad de la enfermedad. Son igualmente importantes en el tratamiento de LES

A pesar de que en los últimos 50 años el tratamiento de LES pediátrico ha aumentando la tasa de supervivencia del 50 al 90% (Miettunen y cols., 2004), esta entidad sigue siendo una enfermedad que plantea grandes retos, sobre todo en caso de respuesta parcial al tratamiento donde el riesgo de complicaciones graves es mayor. Sin duda, a medida que se comprenda mejor la patogenia del LES se desarrollarán tratamientos más eficaces y menos tóxicos, que contribuirán de manera significativa a reducir los efectos colaterales del tratamiento actual y a mejorar la sobrevida y calidad de vida de los pacientes.

## **E. Patogenia**

Aún cuando nos se conocen bien los mecanismos fisiopatológicos que conducen al desarrollo de LES, la susceptibilidad a padecer esta enfermedad es atribuida a una combinación de factores ambientales, hormonales y genéticos. La luz ultravioleta (UV) es uno de los factores ambientales asociados a LES más conocidos. Ésta genera una erupción cutánea fotosensible que puede desencadenar una exacerbación generalizada de la enfermedad (Mageed y cols., 2003). Por otro lado, existen cada vez más pruebas de que algunas infecciones como la asociada al virus de Epstein-Barr (VEB), podrían ser el desencadenante inicial de las respuestas autoinmunitarias específicas del lupus. De hecho, en los pacientes lúpicos (niños y adultos), se han descrito títulos altos de VEB (James y cols., 1997; Moon y cols., 2004). La presencia de altas concentraciones de VEB conlleva a la aparición de una

respuesta inmunológica anormal, ya que la infección viral incrementa la función de los linfocitos T cooperadores y como consecuencia un aumento de la actividad de los linfocitos B; por lo tanto la producción anómala de autoanticuerpos son los responsables directos o formando complejos inmunes, de la mayoría de los daños tisulares.

Para que un organismo tenga un sistema inmunológico altamente específico, pero no autorreaccione, debe ser capaz de tolerar sus propios antígenos. Esta enfermedad se ha descrito como una pérdida del control de las funciones inmunológicas y del "autoreconocimiento". En esta entidad se reconocen dos características claves: la función desregulada de los linfocitos (T y B) y el desarrollo de autoanticuerpos (Vyse y Todd, 1996, Eilat y cols., 1999), sin embargo también se han observado defectos en la eliminación de los complejos inmunes y en la tolerancia de las células B y células T. Otra característica central del LES es la tendencia a producir autoanticuerpos IgG con alta afinidad para DNA, los cuales son potencialmente patogénicos (Grammer y cols., 2001; Lypsky y cols., 2001).

### ***E.1 Alteraciones Inmunológicas***

El fenómeno de autoinmunidad se produce principalmente por anormalidades en la función de los linfocitos, estas alteraciones pueden ocurrir en linfocitos T, B o en ambos. La adquisición de tolerancia a la inmunidad en las células B se lleva a cabo por la supresión de clonas de estas mismas células las cuales producen anticuerpos autorreactivos; sin embargo por alguna razón no reaccionan contra sus propios antígenos, se sabe que en individuos sanos existen estas células autorreactivas, pero no hay respuesta autoantigénica (anergia clonal: falta de respuesta de las células B de autorreacción). La supresión de las células B puede comprender una alteración de los receptores IgM que se encuentran en la superficie de las células B autorreactivas de tal manera que no pueden reconocer a los antígenos; por otra parte la tolerancia de las células B puede ser mediada por las células T. El desarrollo de los clones de células B y de los T provienen de efectos solamente a nivel de células

T. Los principales medios de tolerancia de las células T incluyen la supresión selectiva de clones de células T en el timo. La pérdida de tolerancia, puede ser causada por la pérdida de tolerancia central o periférica; normalmente en la tolerancia central, el timo selecciona los linfocitos inmaduros que serán útiles en la respuesta inmune. La selección tímica es positiva y negativa, en la positiva se rescata a los linfocitos que interactúan con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) propios y la negativa elimina aquellos linfocitos que interactúan contra péptidos que son antígenos propios. La eliminación de linfocitos autorreactivos sucede por destrucción, (muerte celular por apoptosis) y anergia funcional (bloqueo o inactivación). Si hay una falla en este tipo de selección, se altera la tolerancia a lo propio y se desencadena un mecanismo autoinmune.

Cuando hay pérdida de tolerancia periférica, los linfocitos ya maduros podrían reaccionar contra antígenos, pero existen distintos mecanismos para evitar esto, a nivel periférico (fuera del timo). Si estos mecanismos se alteran habrá una respuesta autoinmune. Existen anticuerpos que bloquean los receptores de antígenos de los linfocitos y así impiden que estas células interactúen con autoantígenos y citocinas inmunosupresoras producidas por linfocitos T reguladores. Estos anticuerpos y citocinas pueden perder su función en determinadas condiciones. Los linfocitos T CD8 pueden ser citotóxicos o supresores. Los supresores bloquean la respuesta inmune a nivel periférico, pero en algunas enfermedades pierden esta propiedad.

Aunque se han descrito numerosas alteraciones en la función de los linfocitos T en LES, no se encuentran en forma constante en todos los pacientes. Existen evidencias de linfopenia, muchos estudios demuestran la reducción de los linfocitos T CD8+, mientras que otros describen una reducción en linfocitos T CD4+; también se describen defectos funcionales, como una disminución de la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ (Goto y cols., 1980), y una menor capacidad de controlar la producción de autoanticuerpos por los linfocitos B; otra evidencia, es la activación sostenida de linfocitos T CD8+ y producción anómala de citocinas (Mageed y cols., 2003).

Los linfocitos T de los pacientes con lupus muestran respuestas aberrantes a estímulos como por ejemplo una mayor producción de calcio y menor secreción de interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) e IL-2 (Kyttaris, 2004). Estos linfocitos también expresan marcadores de activación como los antígenos DR+ (Tsokos y cols., 2001) y son capaces de facilitar la producción de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B (Inghirami y cols., 1988). Se piensa que los linfocitos T lúpicos utilizan mecanismos diferentes de supervivencia ante la coestimulación comparado con los linfocitos T normales. Se ha descrito recientemente que los linfocitos T activados de pacientes con LES son más resistentes a la energía y la apoptosis debido a un aumento en la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), la cual, en cambio, aumenta c-FLIP (homólogo celular de la proteína inhibidora viral FLICE) y atenúa la señal de FAS, uno de los mediadores de apoptosis. Sin embargo parecen que únicamente ciertos inhibidores de COX-2 pueden inducir apoptosis de linfocitos T autorreactivos y suprimir la producción de autoanticuerpos anti-ADN patológicos en ratones propensos a padecer lupus (Xu y cols., 2004).

## ***E.2 Linfocitos B y autoanticuerpos***

Los linfocitos B desempeñan un papel importante en la patogenia de LES por ser responsables de la hipergammaglobulinemia y producción de anticuerpos contra antígenos nucleares y de superficie celular, una de las anomalías inmunológicas más prevalentes en el LES. El desarrollo de algunos de los autoanticuerpos, como los anti-DNA de doble cadena, se correlaciona estrechamente con el inicio de la enfermedad (Kyttaris y cols., 2004.) mientras que otros anticuerpos, como los AAF y anti-Ro, pueden ser detectados meses o años antes de la presentación de síntomas clínicos de LES (Arbuckle y cols., 2003).

Los pacientes con LES pediátrico sufren una intensa linfopenia B que afecta tanto a los linfocitos B nativos como a los de memoria, mientras que las células plasmáticas precursoras oligoclonales se encuentran muy expandidas en la sangre periférica (Arce y cols., 2001).

Estudios genéticos en individuos sanos han demostrado que los linfocitos B en la médula ósea y los recientemente emigrados en sangre periférica expresan anticuerpos autorreactivos. Sin embargo la mayoría de los linfocitos B autorreactivos son eliminados del repertorio de linfocitos B nativos maduros en dos estadios de su desarrollo (Wardemann y cols., 2003). Estos puntos de control son deficientes en los pacientes con LES, el 25-50% de los linfocitos B nativos de pacientes con LES producen anticuerpos autorreactivos aún antes de su participación en la respuesta inmunológica contra antígenos externos, comparado con sólo un 5-20% en la población control (Yurasov y cols., 2005).

Por otra parte, los individuos con LES, también muestran importantes alteraciones en la homeostasis de las células dendríticas. Se ha observado que estos pacientes producen un exceso de IFN- $\alpha$ , el cual induce la diferenciación de monocitos CD14+ de sangre periférica en células dendríticas maduras capaces de capturar células apoptóticas y presentar sus antígenos a linfocitos T y B autorreactivos, lo que da lugar a una alteración en la tolerancia hacia estos antígenos (Blanco y cols., 2001; Bennett y cols., 2003).

A pesar de que solamente una fracción de los pacientes con enfermedad activa presentan valores elevados de IFN- $\alpha$  circulante, recientes análisis sobre la expresión global de genes (microarrays) han demostrado la presencia de genes inducidos por el IFN- $\alpha$  en las células sanguíneas mononucleares de los pacientes con LES pediátrico (Bennett y cols., 2003). Estos estudios también demostraron que grandes dosis de glucocorticoides (Winoto y cols., 2002) revierten la expresión de los genes inducidos por IFN. Estudios preliminares parecen indicar que estos medicamentos inducen la apoptosis de las células productoras de IFN o células dendríticas plasmacitoides (Palucka y cols., 2006). Por tanto es posible que una de las acciones más importantes de los glucocorticoides en LES se produzcan a través de la inhibición de la secreción de IFN- $\alpha$ .

Una característica común de los autoantígenos del LES es que están expuestos en la superficie de las células apoptóticas (Casciola-Rosen y cols., 1994), donde pueden ser detectados por el sistema inmune. Hay pruebas recientes de que los cuerpos

apoptóticos pueden ser eliminados en condiciones normales por las células dendríticas inmaduras y presentados para inducir tolerancia en linfocitos T (Steinman y cols., 2003). La deficiente eliminación de células apoptóticas podría proporcionar una carga excesiva de antígenos nucleares a las células dendríticas maduras, extremadamente inmunógenas, y como consecuencia estos antígenos serían presentados a los linfocitos T, facilitando la pérdida de tolerancia y por consecuencia el desarrollo de LES.

Otros factores vinculados a la patogénesis del LES y que podrían ejercer un efecto sobre la apoptosis están representados por los estrógenos, los rayos ultravioleta (McMurray y cols., 2001), las infecciones (Rosen y cols., 1995) y los propios autoanticuerpos (Nakamura y cols., 1998).

## **F. Factores Genéticos**

La existencia del componente genético en LES se fundamenta principalmente con los resultados derivados de estudios epidemiológicos en familias y en gemelos. Tales estudios han mostrado que la agregación familiar en esta enfermedad va de un 10% hasta 16%, mientras que la concordancia es 10 veces mayor en gemelos monocigóticos que en los dicigotos (24-57% vs 2-5% respectivamente) (Deapen y cols., 1992; Arnett y cols., 1997a; Hochberg y cols., 1997). Aún más, la heredabilidad estimada para el LES (fracción de la enfermedad que puede ser atribuida a los genes) es del 66% (Tsao y cols., 2002) y el riesgo de los familiares a padecer la enfermedad (valor- $\lambda$ ), es relativamente más alto ( $\lambda=25$ ) que el de otras enfermedades autoinmunes, como la diabetes mellitus tipo-I ( $\lambda=15$ ) (Risch y cols., 1987; Vyse y Todd 1996).

Actualmente se encuentran disponibles una gran variedad de estrategias para identificar los factores genéticos involucrados en las enfermedades mendelianas y complejas. El análisis de ligamiento o "linkage" y los estudios de asociación, son dos métodos analíticos complementarios utilizados para detectar tanto regiones

genéticas específicas, como genes que están involucrados en el desarrollo de la enfermedad. La estrategia más eficaz para identificar los loci de susceptibilidad de las enfermedades multifactoriales como el LES se basa en estudios de asociación (Risch y Merikangas, 1996). Estos estudios comparan las frecuencias de un marcador entre casos no relacionados y controles no relacionados, e investiga su co-ocurrencia (presencia simultánea del marcador con la enfermedad) con la enfermedad a nivel de la población; el término asociación se entiende como la confirmación estadística que define la co-ocurrencia de alelos o fenotipos en la población general. Una asociación significativa del marcador con la enfermedad sugiere un gen candidato en la etiología de la misma (Baca y Orozco, 2004).

### ***F.1 Estudios de Asociación***

Los estudios de asociación en LES generalmente han incluido el análisis de genes localizados en las regiones cromosómicas que han mostrado ligamiento con esta entidad o en genes que juegan un papel importante en la respuesta inmune (genes candidato). Los estudios de casos y controles y los basados en familias utilizando la prueba de desequilibrio de transmisión (TDT), son los modelos más utilizados recientemente (Risch y Merikangas, 1996; Spielman y Ewans, 1996).

La disponibilidad de métodos de tipificación de alto rendimiento para polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) ha permitido a los investigadores explorar la asociación de varios genes candidato con LES. Los SNPs son la fuente más común de variación genética en el ser humano y se estima que en promedio existe un SNP por cada 1,000 a 2,000 nucleótidos (Collins y cols., 1998). La mayoría de estos marcadores son bialélicos, muy estables (tienen una baja tasa de mutación recurrente) (Xion y Jin, 1999) por lo que tienen un alto potencial en el mapeo genético de las enfermedades complejas.

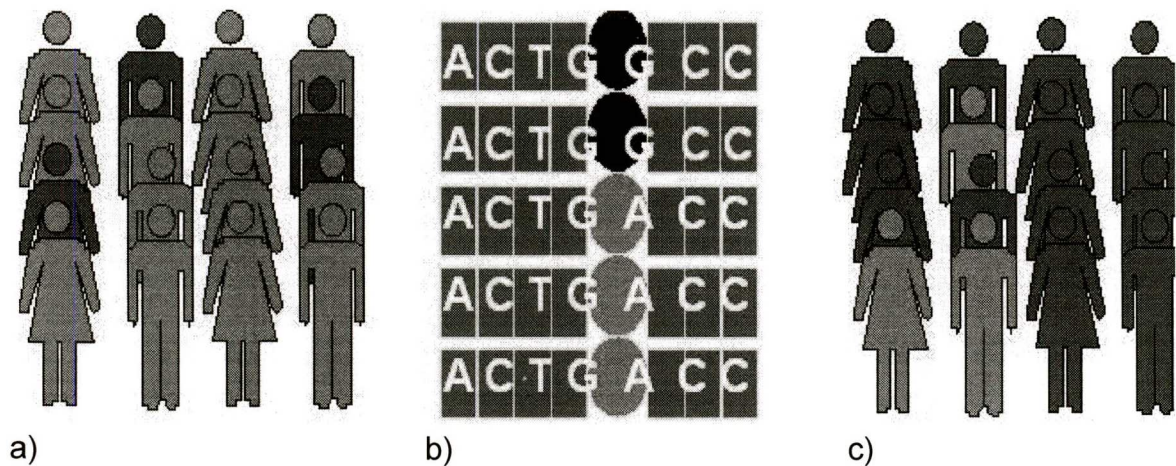
Los estudios de asociación incluyen la tipificación de SNPs en casos y controles pareados con base en su origen étnico y sexo. Un polimorfismo dado puede ser el locus de interés si el alelo ocurre con una frecuencia significativamente mayor entre

los casos, comparados con los controles (figura 3). Sin embargo, a pesar de las ventajas que presentan los estudios de asociación, este tipo de diseño presenta dos limitaciones importantes: Los datos pueden mostrar falsas asociaciones debidas a que el locus de interés puede estar en desequilibrio de ligamiento (LD) con el marcador verdaderamente asociado a la enfermedad y, 2) estratificación de la población. Las posibles causas de LD incluyen efecto fundador o mutaciones recientes, mientras que los sesgos de estratificación ocurren principalmente en poblaciones mezcladas como la mexicana.

Afortunadamente, estas desventajas pueden ser resueltas con estudios de asociación basados exclusivamente en las familias, es decir, en este caso no se requieren controles sanos sino que se compara la frecuencia con que se transmite un alelo de padres heterocigotos a los hijos afectados (prueba de desequilibrio de transmisión: TDT) (Spielman y Ewens, 1996). Estos estudios requieren la genotipificación del individuo afectado y sus padres (y/o hermanos) y están diseñados específicamente para evitar falsas negativas o positivas por la estratificación de las poblaciones o la mala selección de los controles. Esto puede ser medido como alelos individuales o como haplotipos (HRR: del inglés Haplotype Relative Risk). Una asociación significativa sugiere un gen candidato en la etiología de la enfermedad.

Sin embargo, en algunos de estos estudios de asociación genética en LES se han observado ciertas discrepancias entre poblaciones con diferente origen étnico inclusive entre aquellas con un origen étnico similar. De tal manera que las asociaciones observadas en una población determinada, no pueden ser extrapoladas a todas las poblaciones, así, es necesario determinar los factores genéticos involucrados en la enfermedad, para cada población particular.

Los estudios de asociación, generalmente han incluido el análisis de SNPs en genes localizados en las regiones cromosómicas que han mostrado ligamiento y cuyos productos juegan un papel importante en la respuesta inmune (genes candidato de susceptibilidad o protección) y en la respuesta a infecciones o al tratamiento (genes modificadores)



**Figura 3. Estudios de Asociación.** a) Población normal no relacionada; b) Marcador genético (SNP); c) Población de enfermos no relacionados. Compara las frecuencias de este marcador entre casos no relacionados y controles, e investiga su ocurrencia simultánea con la enfermedad a nivel de la población

## ***F.2 Genes candidatos más relevantes en la etiopatogenia del LES***

A través del análisis genético de pacientes con LES, en los últimos años se han identificado 60 loci potenciales implicados en la patogénesis de esta entidad: en los que se localizan genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), receptores de la región  $\gamma$  de la fracción cristalizable (Fc $\gamma$ ), componentes de la cascada del complemento, etc. (tabla 3) (Manderson y cols., 2004). Sin embargo en los estudios completos del genoma humano en familias con varios casos de LES; únicamente, 9 de estos loci han presentado un ligamiento significativo (LOD score de 3.3) en varios estudios independientes (1q23-24, 2q34, 2q37, 4p16, 6p21, 11p13, 12q24 y 16q13), ( Moser y cols., 1999; Shai y cols., 1999; Gaffney y cols., 2000;

Gray-McGuire y cols., 2000; Lindqvist y cols., 2000; Tsao y cols., 2001; Graham y cols., 2001; Johanneson y cols., 2002).

Así mismo, otros estudios han revelado una asociación entre algunos alelos de estos genes con la gravedad de LES, por ejemplo pacientes con deficiencia de uno de los componentes del complemento del complejo C1 o C4 muestran una enfermedad más grave, comparada con la que se observa en pacientes con deficiencia de C2 (Manderson y cols., 2004).

Dentro de los genes analizados que han mostrado asociación con LES, se encuentran los genes que codifican para los receptores de baja afinidad para la fracción Fc de la IgG (*Fc $\gamma$ RI*, *Fc $\gamma$ RII* y *Fc $\gamma$ RIII*) los cuales juegan un papel importante en la depuración de complejos inmunes, en la eliminación de las células apoptóticas y en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Salmon y Pricop, 2001; Karassa y cols., 2002; Selgiman y cols., 2001; Zuñiga y cols., 2001); genes del complemento, como *C1q*, *C1r*, *C1s*, *C2*, *C4* y el receptor del complemento (*CR1*) (Manderson y cols., 2004)]; genes que codifican para interleucinas como IL-10 (Lazarus y cols., 1997), IL-8 (Rovin y cols., 2002), IL-4 (Kanemitsu y cols., 1999) e IL-6 (Rovin y cols., 2002); el gen que codifica para el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ) (Lee y cols., 2006); el gen de muerte celular programada (*PDCD-1*) que codifica para un receptor que inhibe la respuesta inmune y juega un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia periférica (Prokunina y cols., 2002); el gen que codifica para la tirosin fosfatasa de linfocito (*PTPN22*) la cual inhibe la activación del linfocito T (Kyogoku y cols., 2004); genes que codifican para moléculas involucradas en la regulación de la expresión de la vía de interferón tipo I, como el factor 5 regulador de interferón (*IRF5*) y la tirosina cinasa 2 (*TYK2*) (Sigurdsson y cols., 2005); el gen *CTLA4* inhibe la activación de células T, por lo que *CTLA4* es una molécula que regula la respuesta inmune de antígenos propios y externos controlando la activación de células T antígeno-específica, contribuyendo a la tolerancia periférica (Thompson y cols., 1997) y el gen *MBL* que codifica para una proteína de fase aguda, es el principal componente que activa la cascada del complemento por la vía de lectinas, es un componente esencial del sistema inmune

innato, además modula la inflamación y promueve la eliminación de células apoptóticas. (Garred y cols., 2005).

### ***F.2.1 Complejo principal de histocompatibilidad: MHC***

La region HLA clase II es parte del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) se localiza en la región q11-22 del cromosoma 6. Las moléculas de HLA clase II se expresan en la superficie de células B, macrófagos, células dendríticas y células T activadas; están involucradas en el procesamiento y presentación de antígenos es altamente polimorfica, se piensa que esta region es crucial en el proceso de enfermedades autoinmunes. Diferentes alelos en genes DR y DQ están asociados con diferentes enfermedades autoinmunes. Dado su papel en el sistema inmune y su alto grado de variación genética, estos fueron de los primeros genes candidatos de susceptibilidad en ser analizados en pacientes con LES, los datos derivados del estudio de poblaciones tales como la africana, asiática, norteamericana, mexicana y algunas de centro y sudamerica, han mostrado asociaciones (principalmente DR2 y DR3) y LES (Harley y cols., 1998; Tsao y cols., 2002). El alelo HLA DR3-DQ2-D4AQ0, esta fuertemente asociado con LES en caucásicos (Truedsson y cols., 1995), los HLA-DRB1\*0301-DQA1\*0501-DQB1\*0201y DRB1\*1501 se han encontrado en pacientes mexicanos con LES, cabe aclarar que estos alelos HLA se han analizado en pacientes adultos con LES (Granados y cols., 2006).

### ***F.3 Gen antígeno-4 de linfocitos T citotóxicos: CTLA4***

El gen *CTLA4* es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas que se localiza en la región 2q33, contiene 4 exones que codifican para una proteína de 149 aminoácidos denominada, antígeno-4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA4) la cual tiene como función coestimular a las células T activadas. El primer exón codifica para una secuencia líder de 37 aminoácidos, el segundo para un dominio parecido a la región

variable (V) de inmunoglobulina (Ig), el tercero para una región transmembranal hidrofóbica y el cuarto para un dominio citoplasmático el cual contiene dos sitios potenciales de fosforilación. (Dariavach y cols., 1988; Harper y cols., 1991). La región 5' del gen presenta una región promotora que contiene una caja TATA típica, mientras que la región 3' no traducida (UTR) es de 1.1 Kb y consta de al menos 30 repetidos AT (Harper y cols., 1991). El mRNA de CTLA4 sufre splicing alternativo, generándose dos transcritos, uno de los cuales pierde el exón 3 que codifica para el dominio transmembranal (Magistrelli y cols., 1999). Al traducirse ambos transcritos generan por un lado, una proteína soluble con una peso molecular (PM) de 23 kDa y por el otro una proteína transmembranal con un PM de 45 kDa, ambas proteínas conservan los sitios de unión por las moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2. Sin embargo, en la isoforma soluble al perderse el exón 3 se genera un corrimiento en el marco de lectura, por lo que ésta sólo existe como un monómero, aunque conserva el dominio MUPPPY (crítico para la unión a B7), lo que le permite participar en la ruta de señalización de la regulación de células T, B7/CTLA4/CD28. La proteína CTLA4 es un homodímero unido por puentes disulfuro, CTLA4 se expresa exclusivamente en linfocitos T CD4+ y CD8+ (Magistrelli y cols., 1999). La proteína CTLA4 soluble puede ser expresada constitutivamente por células T no activadas (Oaks y Hallett, 2000).

La CTLA4 es estructuralmente homóloga a CD28, otra molécula coestimuladora, que se encuentra en las células T, ambas son expresadas tanto en células T en reposo como en células T activadas, las dos proteínas se pueden unir a B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) que se encuentran en las células presentadoras de antígenos (CPAs). Mientras que CD28 activa a las células T, CTLA4 inhibe dicha activación (Magistrelli y cols., 1999) (fig. 3). Por el papel primordial en la autotolerancia y dado que el gen *CTLA4* es un importante regulador negativo de las respuestas inmunitarias, la participación de este gen, se ha investigado en diferentes enfermedades autoinmunes, como diabetes mellitus insulino dependientes, enfermedad de Graves. Tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de celiaca, LES, entre otras.

En un estudio realizado por Torres B. y cols en 2004 en el que se investigó la asociación de cuatro SNPs del gen *CTLA4* (-1722T/C y -318C/T, 49A/G y CT60G/A),

y LES en una muestra de pacientes españoles, encontraron que el genotipo AA del SNP CT60G/A confiere protección a LES en la población española.

Por otro lado, el polimorfismo 49A/G del gen *CTLA4* también ha sido relacionado con la enfermedad de Graves y tiroiditis de Hashimoto en la población japonesa, en donde se observa que el genotipo homocigoto GG confiere riesgo a desarrollar dichas entidades (P=0.049) (Tsuyoshi y cols., 2000).

#### ***F.4 Genes del Complemento***

El sistema del complemento incluye un grupo de proteínas plasmáticas y de membrana que son activadas por los microorganismos y que favorecen su destrucción y la inflamación. El reconocimiento de los microorganismos por el complemento tiene lugar de tres formas, **1) la vía clásica**, denominada así porque se descubrió en primer lugar, usa una proteína plasmática llamada C1 que contiene tres diferentes proteínas (C1q, C1r y C1s), se une a la región Fc de las moléculas de anticuerpos IgM, IgG o IgG3 que han reaccionado con el antígeno, dicho enlace se lleva a cabo hasta que se forma el complejo antígeno-anticuerpo; **2) la vía alterna** descubierta posteriormente pero filogenéticamente más antigua que la clásica, se activa por el reconocimiento directo de ciertas estructuras de la superficie de los microorganismos y por ello forma parte de la inmunidad innata, se inicia con la activación de C3 y requiere de los Factores B y D y del catión  $Mg^{++}$  (todos presentes en el suero normal) y **3) la vía de lectinas**, que se activa por una proteína plasmática denominada lectina de unión a manosa (MBL), que reconoce los residuos de manosa terminales situados en las glucoproteínas y glucolípidos microbianos (fig. 4). El enlace de la lectina al patógeno produce la asociación de dos serinas proteasas, MASP-1 y MASP-2 (proteasas de serina asociadas a MBL). MASP-1 y MASP-2 son similares a C1r y C1s, respectivamente y MBL es similar a C1q. La formación del complejo trimolecular MBL/MASP-1/MASP-2 produce la activación de las MASPs y la subsecuente ruptura de C4 en C4a, que se libera al medio y C4b, que se enlaza a la membrana. Las MASPs activadas también rompen C2 en C2a,

que se enlaza a la membrana y C2b que se libera al medio. El complejo C4bC2a resultante es una convertasa 3 (C3), la cual rompe C3 en C3a y C3b, que se enlaza a la membrana en asociación con C4b y C2a. El complejo resultante C4bC2aC3b es una convertasa 5 (C5), con la generación de C5 concluye la vía de la lectina.

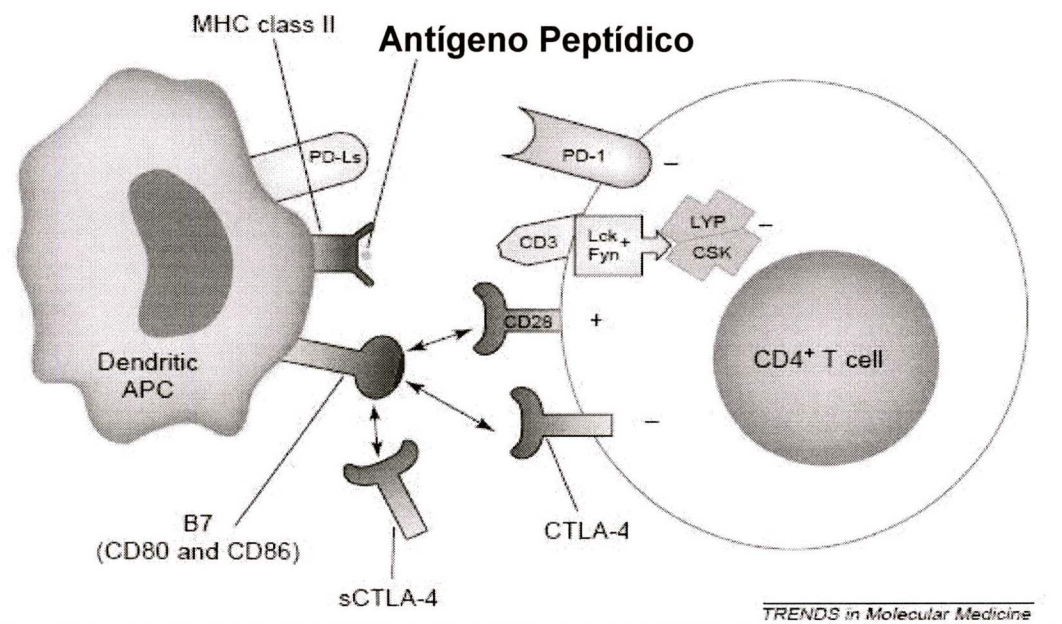
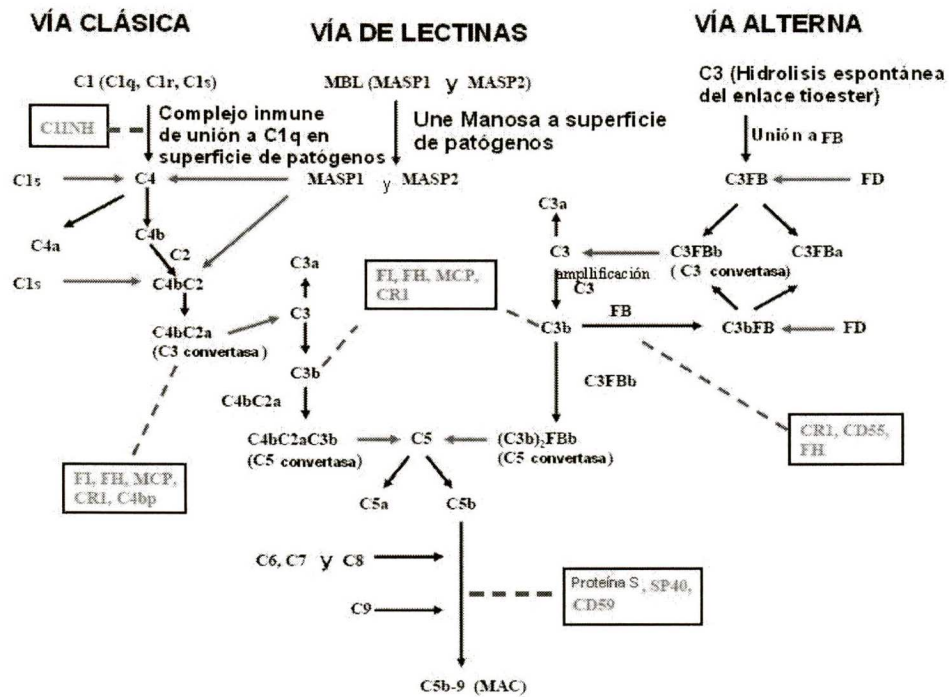


Figura 4. Interacción célula presentadora de antígeno (CPA)-células T, en la cual se observa el posible papel de varias moléculas en la autoinmunidad. La CPA presenta el antígeno peptídico unido al complejo principal de histocompatibilidad (MHC), este es reconocido por el receptor antígeno (complejo CD3) de la célula T; la cual envía la primer señal de activación a la células T, una segunda señal puede ser dada por la interacción de una molécula coestimuladora con la molécula B7 expresada en APC, CD28, es un costimulador positivo que genera la proliferación y activación de células T, y CTLA4 es una molécula coestimuladora inhibitoria que envía una segunda señal negativa que detiene a las células T o causa apoptosis. CTLA4 soluble (s) puede actuar como un inhibidor natural de CD28 comprometido por la unión a la molécula B7 de APC, y que tiene alta afinidad a CD28 deteniendo así la activación coestimuladora de las células T vía interacción CD28-B7

La proteína central del sistema del complemento más grande, C3b, se deposita en la superficie del microorganismo y la cascada del complemento se activa. C3b se une de forma covalente a los microorganismos y sirve de opsonina favoreciendo su fagocitosis, se libera un fragmento más pequeño C3a, que estimula la inflamación al

actuar como sustancia quimioattractante para los neutrófilos. C3b se une a otras proteínas del complemento para formar una proteasa que escinde una proteína llamada C5 generando los péptido C5a y C5b. Este último permanece unido a las membranas de los microorganismos, mientras que C5a se concentra en la zona de infección. El componente vascular de la inflamación aguda, C5b, se asocia rápidamente con C6 y C7 y se inserta a la membrana. Subsecuentemente C8 se enlaza, seguida de varias moléculas de C9. Las moléculas de c9 forman un poro en la membrana a través del cual el contenido celular se escapa y ocurre la lisis de la célula. La lisis no se da por un proceso enzimático, sino que se da a través de un daño físico a la membrana. Este complejo consiste de C5bC6C7C8C9 y es conocido como un complejo de ataque a la membrana (MAC). Las células expresan diversas proteínas reguladoras que bloquean la activación del complemento y así evitan lesiones a las células del huésped (Abbas, 2004).

En pacientes con LES se han observado algunas alteraciones en los niveles de expresión de las proteínas de la cascada del complemento, así como del receptor del complemento CR1, principalmente C2 y C4 (Tsao, 2002). La proteína C4 es codificado por los genes *C4A* y *C4B*, los cuales en algunos casos presentan alteraciones en su secuencia que derivan en la deficiencia completa de la proteína (alelos nulos). Aunque esta condición es rara, aproximadamente el 70% de los pacientes que la presentan, desarrollan una enfermedad similar a LES que se manifiesta en edad temprana, con afección renal y desarrollo de anticuerpos anti-Ro (Ratnoff, 1996). Por su parte, también los individuos deficientes de C1q muestran un mayor riesgo para desarrollar LES (cerca del 92% de estos presentan la enfermedad) (Topaloglu y cols., 2000). Por otro lado y en menor frecuencia, la deficiencia de C2 también se ha encontrado asociada con LES, pero los cuadros clínicos son más leves (Arnett y Reveille, 1992).



**Figura 5. Activación y regulación del Complemento.** El sistema del complemento se activa por tres diferentes vías: clásica, alterna y por vía de lectinas; las flechas negras indican la dirección de la vía de activación o la escisión de productos del complemento, las flechas rojas indican la reacción de escisión vía factores enzimáticos o proteasas, las palabras en rojo en los recuadros son las proteínas reguladoras del complemento que actúan sobre estados específicos de vías de activación e inhibición de la activación del complemento. C1INH, inhibidor C1; MCP, cofactor de proteína de membrana; CR, receptor del complemento; C4bp, proteína de unión a C4; FB (D, H, I), Factor B ((D, H, I).

### F.5 Gen Lectina de unión a manosa: MBL

Hay dos genes lectina de unión a manosa (*MBL*) en humanos, pero *MBL-1* es un pseudogen y sólo *MBL-2* codifica para la proteína funcional. El gen funcional *MBL-2*, se localiza en la posición 10q11.2-q2 y tiene cuatro exones. El exón 1 codifica un péptido señal, una región rica en cisteína y parte de una región de colágeno rica en glicina, el exón 2, codifica para la otra parte del dominio de colágeno, el exón 3 para una región enrollada  $\alpha$  helice conocida como región neck y el exón 4 codifica para un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) que adquiere una

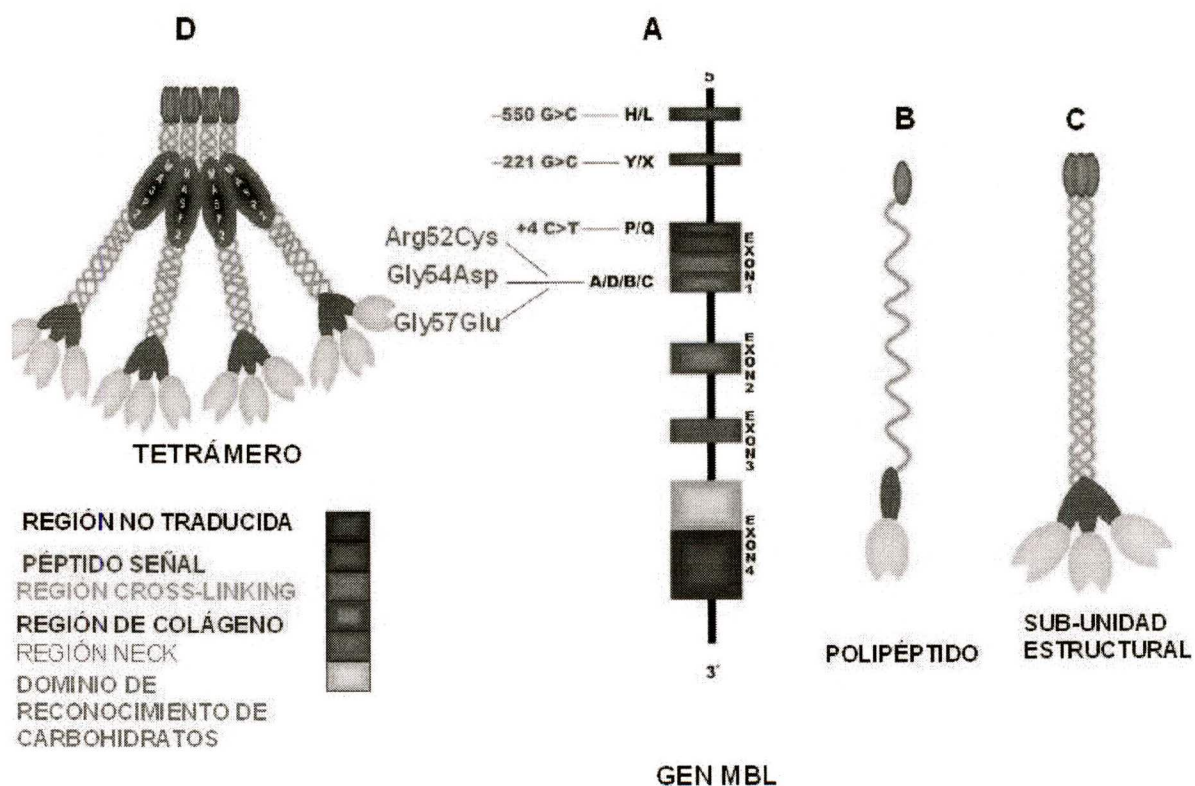
configuración globular. La región promotora del gen *MBL* contiene un gran número de elementos regulatorios que afectan la transcripción de la proteína (Dommett y cols., 2006). MBL pertenece a la familia de lectinas calcio dependientes conocida como colectinas, un grupo de proteínas que contienen un dominio C-terminal parecido a lectinas y un residuo de colágeno que forma trímeros, los cuales a su vez forman multímeros de trímeros y hacia arriba hexámeros de trímeros (Lu y cols., 2002; Holmskov y cols., 2003) (fig. 5). MBL es sintetizada en el hígado y se encuentra distribuida en el plasma, secreciones nasofaríngeas, fluido del oído medio, líquido sinovial de articulaciones inflamadas y líquido amniótico, entre otros. La proteína consiste de multímeros de una cadena polipeptídica idéntica de 32 KDa; cada cadena comprende cuatro distintas regiones codificadas por diferentes exones del gen *MBL-2*, en la región C-terminal, tiene un dominio de reconocimiento de carbohidratos dependiente de calcio (CRD), una pequeña región  $\alpha$  hélice, una región hidrofóbica (tallo), un residuo de colágeno que contiene 19 tripletes Gly-Xaa-Xaa y una región N-terminal rica en cisteínas. Tres cadenas polipeptídicas forman una triple hélice dentro de la región de colágeno, estabilizada por interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro dentro de la región N-terminal. MBL en suero consiste de oligómeros que van desde dímeros hasta hexámeros; estos oligómeros presentan una estructura parecida a un ramillete por la interrupción en la región de colágeno generándose una bisagra en forma de anillo, la habilidad de la proteína para unirse efectivamente a microorganismos y activar la cascada del complemento parece ser que depende de un alto número de oligómeros.

La proteína MBL es homologa en su función a la molécula C1q del complemento, ambas son componentes normales del sistema inmune innato, reconocen una gran variedad de microorganismos, permiten distinguir lo propio de lo no propio, pueden unirse a fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas no glicosiladas y pueden activar la ruta del complemento; MBL por la vía de lectinas y C1q por la vía clásica (Turner y cols., 1996; Neth y cols., 2000). MBL es una proteína de fase aguda que se produce en respuestas inflamatorias. Después de que esta molécula se une a la superficie de una célula o patógeno, otras proteínas asociadas como, MASP-1, MASP2 y MASP3 activan la ruta del complemento a través de C4 y C2. (Vorup y cols., 2000; Rossi y

cols., 2001; Ambrus y cols., 2003). MBL modula la inflamación y promueve la eliminación de células apoptóticas (Ogden y cols., 2001; Garred y cols., 2003).

En el gen *MBL* se han identificado tres mutaciones de sentido erróneo (missense) en el exón 1, la primera en el codón 52 (Arg→Cys), otra en el codón 54 (Gly→Asp) y la siguiente en el codón 57 (Gly→Glu), que afectan la capacidad de los monómeros para formar trímeros y la presencia de una o más mutaciones están asociadas con la funcionalidad de la proteína.

Además se han descrito polimorfismos en la región promotora, la sustitución de un nucleótido -550(G→C) y -221(G→C) que están involucrados directamente con los niveles de MBL en suero.



**Figura 6. Estructura del gen *MBL-2* y su proteína.** **A.** Se muestran los polimorfismos localizados en la región promotora y en el exón 1. **B.** Las diferentes regiones del polipéptido se codifican por diferentes exones del gen *MBL-2*. **C.** Tres formas polipeptídicas idénticas de 32 KDa forman la subunidad estructural basada en la triple hélice de colágeno. **D.** La oligomerización de la subunidad estructural pueden ser de diferentes tamaños pero la forma tetramérica es la más común de MBL.

## **F.6 Gen Factor H del complemento: CFH**

El sistema del complemento incluye un grupo de proteínas plasmáticas y de membrana cuya principal función es la eliminación y remoción de microorganismos, y es un componente clave en el sistema inmune innato. Este actúa en forma conjunta con el sistema humoral para promover dos funciones, que son la eliminación física de los patógenos y la eliminación no específica. La opsonización de membranas extrañas llevada a cabo con proteínas del complemento permite que componentes celulares específicos fagociten a los gérmenes. Los factores anafilotóxicos y quimiotácticos, derivan de las proteínas del complemento, contribuyendo a la inflamación no específica. Las anafilotóxicas inducen la liberación de histamina de los eosinófilos y de los mastocitos, promoviendo la entrada fácil de células inflamatorias de la circulación a los tejidos. Los factores quimiotácticos atraen células inflamatorias no específicas a los sitios de activación del complemento y forman parte del sistema de amplificación biológico (Walport y cols., 2001). La proteína Factor H del complemento (CFH) es una proteína regulatoria de la ruta alterna, esta inhibe la formación de la convertasa C3 alterna y acelera su eliminación, además sirve como un cofactor del Factor I, que es una enzima de rompimiento de C3b.

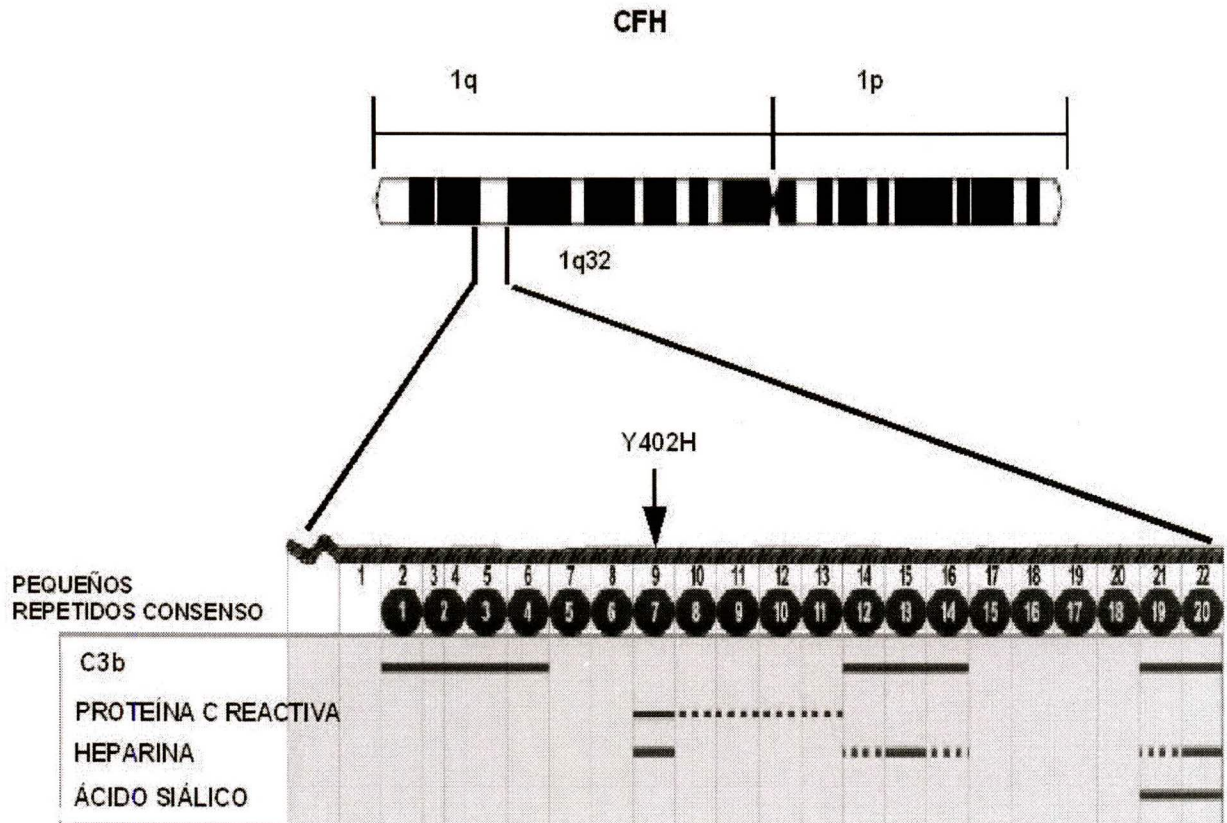
El gen de *CFH* se localiza en el brazo largo del cromosoma 1 (1q32), un locus llamado RCA (regulador de la activación del complemento) (Vorup-Jensen y cols., 2000; Dahl y cols., 2001) que contiene genes que codifican diferentes proteínas reguladoras de activación del complemento (Rossi y cols., 2001).

CFH es una glicoproteína sérica de cadena sencilla de 150 KDa con una estructura modular que consiste en una variedad de 20 unidades homologas en tandem de cerca de 60 residuos de aminoácidos (Ripoche y cols., 1988; DiScipio y cols., 1992), llamado pequeños repetidos consenso (SCR) o proteína control del complemento. Se han identificado tres sitios de unión C3, y dos en SCR 6-10 y SCR 16-20, que une fragmentos de C3c y C3d, respectivamente (Sharma y cols., 1996; Jokiranta y cols., 2000) y tres sitios de unión a heparina bien identificados 7, 13 y 20 (Pangburn y cols., 1991; Blackmore y cols., 1996; Blackmore y cols., 1998) (fig. 7).

Existen algunas evidencias de pacientes con enfermedades de riñón en los cuales se ha observado que se han originado por la activación desregulada de la vía alterna del complemento, y que posteriormente pueden desarrollar drusen (pequeños depósitos amarillos o blancos en la retina) en la mácula, esto es en pacientes diagnosticados con glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN) tipo II en los cuales se han identificado polimorfismos en el gen CFH, el principal inhibidor de la vía alterna del complemento. En dos estudios de cohortes independientes en los cuales analizan polimorfismos en el gen CFH los relacionados con degeneración macular (AMD) y (MPGN) tipo II (Zipfel y cols., 2001)

Algunos estudios muestran que deficiencias en CFH en pacientes homocigotos y heterocigotos fueron asociados con síndrome urémico hemolítico (HUS) tipo II y glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN) tipo III y otras enfermedades de riñón (Ault y cols., 2000)

Componentes de la vía clásica evitan el desarrollo de autoinmunidad, por otra parte aunque su papel en la eliminación de células apoptóticas contrasta a la vía alterna, juega un papel directo aumentando la lesión del glomérulo



**Figura 7. Representación del gen CFH.** El gen CFH se localiza en el brazo largo banda 32 del cromosoma 1, esta conformado por 22 exones. La proteína codificada, contiene 20 pequeños repetidos consenso los cuales contienen diferentes dominios de unión a diversas proteínas, entre ellas a convertasa 3b (C3b), proteína C reactiva (CRP), heparina, ácido siálico, etc., el SNP analizado Y402H se localiza en el exón 9, que codifica para un dominio de reconocimiento a CRP y a heparina (dominio 7); este dominio de unión a CRP es importante, ya que al unirse a diferentes proteínas de superficie celular puede inducir apoptosis mediante la activación de la cascada del complemento por la vía clásica, además aumenta la actividad fagocítica de los macrófagos y la producción del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ).

## II. JUSTIFICACIÓN

El Lupus Eritematoso Sistémico, es el prototipo de las enfermedades autoinmunes, donde las dificultades inherentes al diagnóstico, así como el desconocimiento de las tasas de prevalencia e incidencia y por tanto el impacto económico real que tiene el tratamiento de estos pacientes, hacen impostergable establecer estrategias que permitan establecer el diagnóstico preciso y tratamiento más adecuados para disminuir no sólo el impacto económico sino también el social de esta entidad en nuestro país.

En los últimos años se ha alcanzado un avance notable en el entendimiento de la patogenia de LES. Los estudios de adopción, en gemelos y en familias, han documentado que esta entidad tiene un fuerte componente genético y recientemente los estudios genómicos han demostrado que los factores genéticos desempeñan un papel preponderante en su etiología, por lo tanto la identificación de estos es sin duda una excelente alternativa para entender mejor la etiopatogénesis de esta entidad.

Actualmente los estudios de asociación son los más utilizados para la búsqueda de variaciones génicas involucradas en la susceptibilidad a desarrollar enfermedades comunes como LES. Por esta estrategia se ha logrado identificar un gran número de SNPs involucrados en la etiología de LES. Los resultados derivados de estos estudios apoyan la hipótesis de que en este padecimiento existe una gran heterogeneidad genética. Si embargo, se ha demostrado que el número y la importancia relativa de estos genes pueden variar entre los diferentes grupos étnicos y que estas diferencias genéticas, junto con el medio ambiente, pueden ser las determinantes en las variaciones de la severidad y prevalencia de la enfermedad observado entre los diferentes grupos.

En este proyecto se propone identificar polimorfismos asociados con la susceptibilidad a padecer LES en población mexicana, lo cual, sin duda contribuirá a incrementar el conocimiento de los factores genéticos involucrados en la etiopatogenia de esta enfermedad, con lo cual se sentarán las bases para estudios funcionales y farmacológicos que permitan dilucidar los mecanismos bioquímicos y

moleculares de esta entidad. Los conocimientos generados de este estudio podrán ser aplicados al diseño de mejores estrategias para establecer el diagnóstico oportuno y con certeza, al desarrollo de esquemas de tratamiento más individualizados, a la disminución de los efectos colaterales del tratamiento prolongado y el desarrollo de medidas preventivas dirigidas a disminuir la morbilidad de esta enfermedad, así como su elevado costo social y económico.

### III. OBJETIVOS

#### GENERAL

Determinar si polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en genes *CTLA4*, *MBL* y *CFH* se encuentran asociados a la susceptibilidad para desarrollar LES, en pacientes pediátricos mexicanos.

#### PARTICULARES

1. Identificar la frecuencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en genes candidatos, en una muestra de individuos sanos mexicanos y en pacientes mexicanos con LES.
2. Determinar si polimorfismos localizados en genes involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria se encuentran asociados a la susceptibilidad para desarrollar LES en una muestra de pacientes pediátricos.
3. Construir haplotipos para conocer su asociación con la susceptibilidad de desarrollar LES.

## **IV. HIPÓTESIS**

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en genes candidatos involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria, se encuentran asociados a la susceptibilidad para desarrollar LES en pacientes pediátricos mexicanos.

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **POBLACIÓN DE ESTUDIO**

En este estudio se incluyeron 250 pacientes mexicanos con diagnóstico de LES no relacionados, que manifestaron la enfermedad antes de los 16 años de edad y que cumplieron con al menos 4 de los 11 criterios de la clasificación establecida por la ACR (Tan y cols., 1982). Para el estudio basado en familias se incluyeron también a los padres de los pacientes. Cada paciente fue evaluado por un médico reumatólogo o inmunólogo quienes llenaron la hoja de captación de datos. En todos los casos se firmó la carta de consentimiento informado.

Como controles se incluyeron 355 individuos sanos, sin antecedentes de enfermedades autoinmunes pareados por sexo y origen étnico, obtenidos de un banco de sangre de la ciudad de México. Dado que el genotipo no es dependiente de la edad, se captaron controles mayores de 18 años para disminuir la probabilidad de seleccionar individuos con susceptibilidad a padecer LES y/o enfermedad autoinmune en la edad pediátrica. Todos los pacientes nacieron en México, al igual que sus padres, abuelos y bisabuelos (mexicanos-mestizos) y fueron reclutados de los hospitales Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital Infantil de México, Centro Médico La Raza y el Instituto Nacional de Pediatría. Para el cálculo de la muestra se tomó en consideración: 1) las frecuencias alélicas previamente reportadas de los SNPs, 2) el valor de la prevalencia de la enfermedad en la población ( $K_p$ ), debido a

que no existen datos de prevalencia de LES en la población mexicana, se tomó la reportada en la población brasileña que es del 0.01%, una de las más bajas a nivel mundial (Senna y cols., 2004), 3) el poder estadístico fue del 80% con un nivel de significancia de 0.05, con una hipótesis alternativa de 2-colas, 4) Se utilizó un rango de valores de riesgo relativo, que abarcó los descritos para los SNPs analizados (OR de 1.8 a 3.5), 5) se utilizó un intervalo de confianza del 95% (1-alfa= 95%), en el contexto de estimar un rango de valores (calculado en la muestra) en el cual se encuentra el verdadero valor del parámetro, con una probabilidad determinada. Para este estudio de casos-controles el tamaño de la muestra requerido fue de 192 pacientes y 192 controles.

Se excluyeron a todos los pacientes con cualquier otra enfermedad crónica concomitante.

## **CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

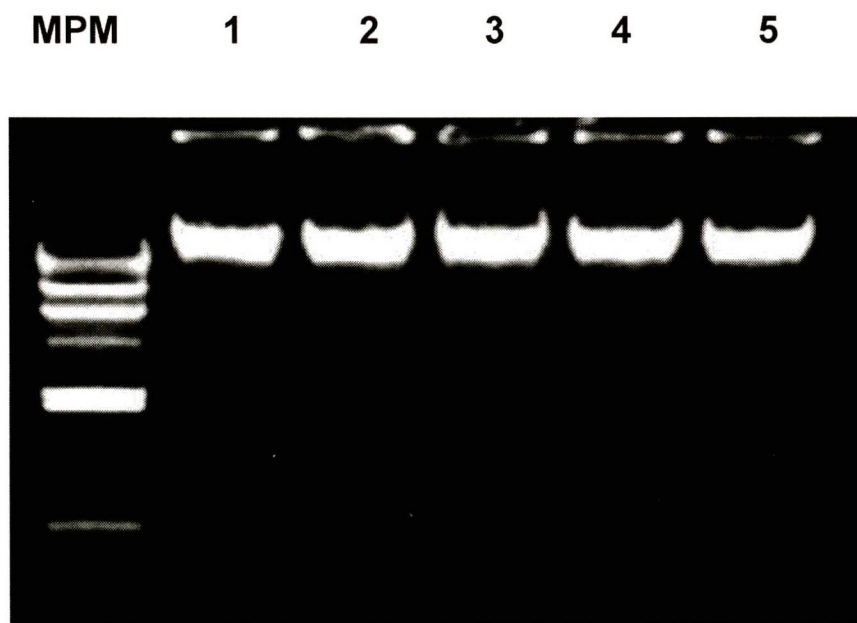
Estudio multicéntrico de casos y controles, transversal, prospectivo y comparativo.

## **EXTRACCIÓN DE DNA**

A todos los pacientes, a sus padres y a los controles se les extrajeron de 5-10 ml de sangre periférica usando EDTA como anticoagulante.

La extracción del DNA genómico se realizó a partir de leucocitos de sangre periférica utilizando la técnica convencional de fenol-cloroformo y precipitación con etanol (información suplementaria I) (Blin y Sttaford, 1976) (Anexo 1). Alternativamente la extracción del ADN se realizó utilizando los Kit PUREGENE (Gentra Systems, USA), y Maxi Kit (50) QIAamp DNA blood (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del proveedor. La integridad del DNA fue verificada en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (figura 8). El DNA obtenido se cuantificó por

espectrofotometría, utilizando un Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer, Accesolab.



**Figura 8. Integridad de DNA.** En el primer carril se encuentra el marcador de pesosos moleculares (MPM), en los carriles 2-6 las muestras de pacientes 1-5,

## GENOTIPIFICACIÓN DE SNPs EN GENES CANDIDATOS

Se analizaron SNPs localizados en genes que han mostrado asociación en otras poblaciones afectadas con LES o que participan en los mecanismos de respuesta inmune. Los SNPs analizados fueron: -318C/T, 49A/G y CT60G/A; del gen *CTLA4* y -550 G/C, 52C/T, 54G/A y 57A/G del gen *MBL* y Y402H del gen *CFH*.

Los SNP's fueron caracterizados por el método fluorescente de 5' exonucleasa (Taqman) (Holland y cols., 1991) en el sistema de detección de secuencias ABI

Prism 7900 HT usando el software SDS 2.2.2; analizados en forma independiente y como haplotipos contruidos con el programa HAPLOVIEW v3.2.

## Diseño de oligonucleótios y sondas específicas

Los oligonucleótidos y las sondas para cada uno de los SNPs fueron diseñadas obteniendo la secuencia de cada gen del “Gene Bank” y utilizando el software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems).

Las sondas fuerón diseñados de acuerdo a la base de datos NCBI de SNPs de la dirección electrónica <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>., (tabla 2).

Tabla 2. **Secuencias de Sondas**, usadas para el ensayo 5' exonucleasa

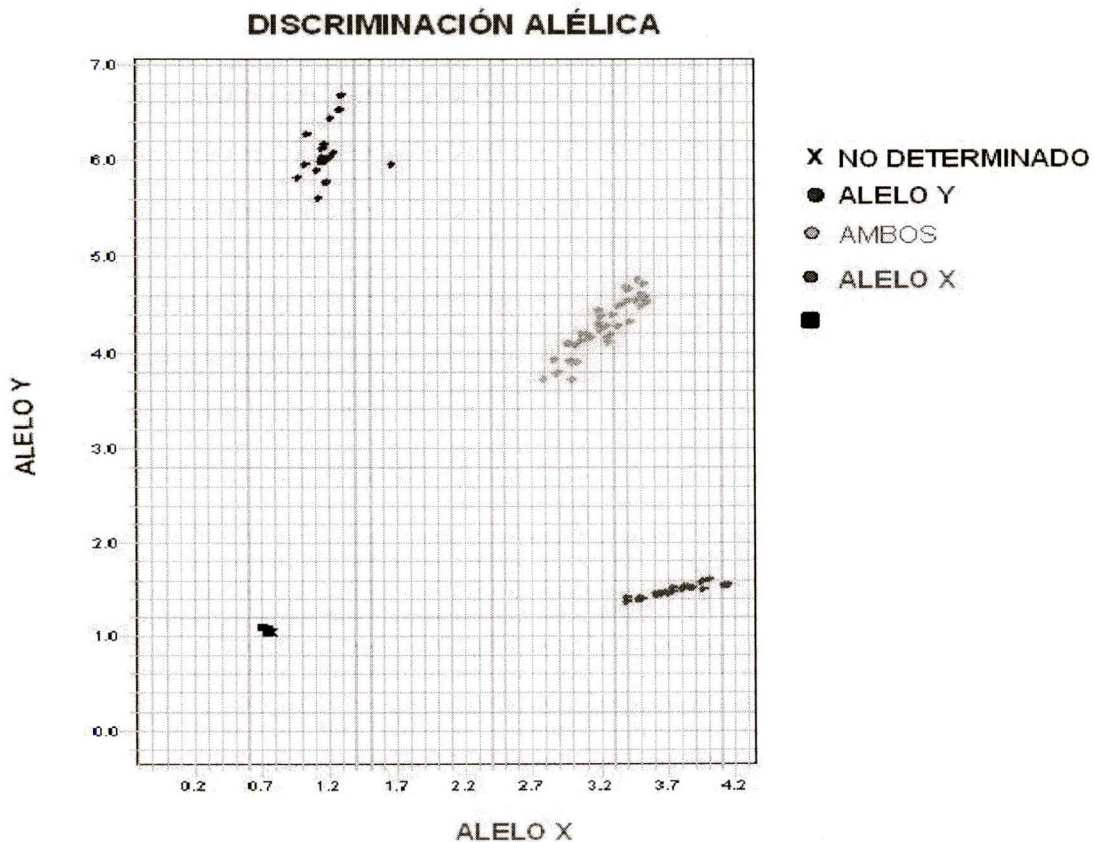
SNP		SECUENCIA
<b>-318C/T</b>	rs 5742909	AGGCGCCAGGGATAGAATGTTGCCCG/TGAGCCAG GAAGGAGAGCAGTGCCCA
<b>49A/G</b>	rs 231775	GCACAAGGCTCAGCTGAACCTGGCT[A/G]CCAGGA CCTGGCCCTGCACTCTCCT
<b>CT60G/A</b>	rs 3087243	TCTTCACCACTATTTGGGATATAAC[A/G]TGGGTTA ACACAGACATAGCAGTCC

diseñadas por AB de Mexico S. de R.L. de C.V

## Método fluorescente de 5' exonucleasa (TaqMan)

Para cada ensayo de discriminación alélica se diseñaron 2 sondas cada una de ellas conteniendo la secuencia específica para cada uno de los alelos en cuestión marcadas en el extremo 5' con fluorocromos diferentes, FAM para el alelo 1 y VIC para el alelo 2, además ambas sondas contenían en el extremo 3' un “quencher” (TAMRA) el cual mientras la sonda permanece intacta, inhibe la emisión de fluorescencia. Durante la reacción de PCR los primers hibridan con una secuencia específica del templado de DNA. Dependiendo de la secuencia polimórfica, la sonda

TaqMan específica hibrida con su secuencia homóloga. Durante la PCR, la AmpliTaq Gold, que tiene actividad tanto de DNA polimerasa como de exonucleasa 5'-3', es capaz de digerir la sonda durante la amplificación y liberar el colorante fluorescente de la acción del "quencher", de tal manera que dadas las condiciones de astringencia utilizadas durante la reacción, sólo la sonda específica para el polimorfismo presente es capaz de hibridar. Por lo tanto ésta metodología nos permite discriminar un alelo del otro con base en el tipo de fluorescencia emitida (fig. 9).



*Figura 9. Representación de la discriminación genotípica.* Se muestran los tres grupos de genotipos que se forman usando dos tipos de sondas Vic para el alelo X (grupo en color rojo), se forma con los individuos que son homocigotos para un alelo 1 y Fam para el alelo Y ( grupo en color azul), formado por los individuos que son homocigotos para el alelo 2, los individuos que son heterocigotos (alelos 1 2), se distinguen por la combinación de los dos fluorocromos (rojo y azul) observándose de color verde.

## **Análisis estadístico**

Las frecuencias genotípicas fueron comparadas entre casos y controles por medio de las pruebas de  $\chi^2$  que combina tablas de contingencia 3 X 2 y la exacta de Fisher. Se evaluó el equilibrio de la distribución de los genotipos mediante Hardy-Weinberg, usando la prueba de  $\chi^2$ . Para evaluar la significancia de las diferencias en las frecuencias alélicas entre casos y controles, el valor de  $\chi^2$  fué calculado de las tablas de contingencia 2 X 2. También las frecuencias alélicas de los casos y controles fueron usadas para calcular la razón de momios (OR) con un intervalo de confianza del 95% (95% IC) y fueron calculados de acuerdo al método de Woolf's. Se utilizó el software StatCalc (Epi Info 2005; Centers of Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA) y el programa FINETTI, <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. El análisis de haplotipos se realizó mediante el programa HAPLOVIEW v3.2. Los valores de  $P \leq 0.05$  fueron considerados significativos.

## **VI. RESULTADOS**

Se estudiaron un total de 250 pacientes no relacionados, con LES de inicio antes de los 16 años de edad, que cumplieron con al menos 4 de los 11 criterios establecidos por el Colegio Americano de Reumatología (ACR del inglés American College of Rheumatology) (Tan y cols., 1982). De estos 214 pacientes fueron femeninos (85.6%) y 36 fueron masculinos (14.4%), con una edad promedio y desviación estándar al inicio de la enfermedad de  $11.62 \pm 2.46$  años en el grupo total. La presencia de antecedentes familiares de LES se documentó sólo en 22 casos (casos familiares: 8.8%). Un total de 155 pacientes (62%) tuvieron nefritis de acuerdo con la biopsia y/o los criterios de la ACR (tabla 3).

En ésta tesis se realizó un estudio de asociación de casos y controles para 8 SNPs localizados en los genes **CTLA4** (-318C/T y 49A/G y CT60G/A), **MBL** (-550 G/C, 52C/T, 54 G/A y 57 G/A) y **CFH** (Y402H). El análisis se llevó al cabo tanto en la población total como en la población estratificada por género, analizando la muestra de pacientes femeninos, comparada con la de los controles femeninos.

**Tabla 3. Grupo de Estudio**

<b>PACIENTES</b>	<b>SEXO</b>	<b>DATOS CLÍNICOS</b>	<b>EDAD</b>
<b>250</b>	<b>214 Femenino (85.6%)</b>	<b>155 (62%) Nefritis</b>	<b>11.62 ± 2.46</b>
	<b>36 Masculinos (14.4%)</b>	<b>104 (67%) biopsia renal</b>	
		<b>Clase II 19 (17%)</b>	
		<b>Clase IV 74 (73%)</b>	
<b>*CONTROLES SANOS</b>	<b>264 Femeninos (84%)</b>		
	<b>50 Masculinos (16%)</b>		

\*Pacientes captados de los hospitales: Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital Infantil de México, Centro Médico La Raza y el Instituto Nacional de Pediatría,

\*Controles sanos mexicanos-mestizos sin antecedentes de enfermedades autoinmunes

### **Gen CTLA4**

Las distribución genotípica de los SNPs (-318C/T, 49A/G y CT60G/A) del gen **CTLA4**, se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg tanto en pacientes (**p=1.0, p=0.67 y p=0.82**) como en controles (**p=0.44, p=0.69 y p=0.79**). Al comparar la distribución de las frecuencias genotípicas del SNP -318C/T del gen **CTLA4**, entre los pacientes con LES y los controles observamos que el genotipo heterocigoto CT es menos frecuente en los casos, sin embargo no muestra diferencias estadísticamente significativas (8.98% vs 11.94%; **p=0.24**).

La frecuencia del alelo T, también fue menor en los pacientes que en los controles (4.9% vs 6.25) pero las diferencias no mostraron significancia estadística ( $p=0.3$ ) (tabla 4).

**Tabla 4. Distribución Genotípica y Alélica del SNP -318(C/T) del Gen *CTLA4***

GENOTIPO	PACIENTES n=245 (%)	CONTROLES n=360 (%)		P	OR 95%CI
CC	222 (90.61)	316 (87.78)	CC vs TT	<b>0.80</b>	1.42 (0.089-22.87)
CT	22 (8.98)	43 (11.94)	CC vs CT	<b>0.24</b>	0.728 (0.424-1.252)
TT	1 (0.41)	1 (0.28)	CC vs CT+TT	<b>0.27</b>	0.744 (0.437-1.268)
ALELOS	n=490 (%)	n=720 (%)			
C	466 (95.1)	675 (93.75)		<b>0.3</b>	1.294 (0.778-2.154)
T	24 (4.9)	45 (6.25)			

En este análisis el 85.6% de nuestra muestra correspondió al sexo femenino, por lo que se compararon los casos y los controles femeninos. Nuestros resultados mostraron que el genotipo heterocigoto CT del SNP -318C/T del gen *CTLA4*, se encuentra menos frecuente en los casos femeninos con LES, que en los controles femeninos (10% vs 12.58%), sin embargo no muestra diferencias significativas ( $p=0.3$ ), este mismo comportamiento, se observó en la distribución alélica (5.48% vs 6.29%;  $p=0.58$ ) así mismo no se encontraron diferencias significativas (tabla 5).

**Tabla 5 Distribución Genotípica y Alélica del SNP -318(C/T) del Gen *CTLA4***

en la población femenina					
GENOTIPO	PACIENTES n=210 (%)	CONTROLES n=310 (%)		P	OR 95%CI
CTLA-4 CC	188 (89.52)	271 (87.42)	CC vs TT	0.23	4.32 (0.175-106.6)
CTLA-4 CT	21 (10.0)	39 (12.58)	CC vs CT	0.37	0.776 (0.442-1.362)
CTLA-4 TT	1 (0.48)	0 (0)	CC vs CT+TT	0.46	0.81 (0.467-1.416)
ALELOS	n=420 (%)	n=620 (%)			
C	397 (94.52)	581 (93.71)		0.58	1.159
T	23 (5.48)	39 (6.29)			

Con respecto al SNP 49A/G, la comparación de las frecuencias del alelo A entre los pacientes con LES y los controles (56.97% vs 51.81%,  $p=0.07$ ) no mostraron diferencias significativas. Así mismo se observó una mayor frecuencia del genotipo AA en pacientes con LES que en controles (33.20% vs 26.11% respectivamente,  $p=0.09$ ) (tabla 6).

**Tabla 6. Distribución genotípica y alélica del SNP 49(A/G) del gen *CTLA4***

GENOTIPOS	PACIENTES n=244 (%)	CONTROLES n=360 (%)		P	95%CI
<b>AA</b>	81 (33.20)	94 (26.11)	GG vs AA	0.09	1.485 (0.932-2.367)
<b>AG</b>	116 (47.54)	185 (51.39)	AA vs AG	0.09	0.728 (0.499-1.061)
<b>GG</b>	47 (19.26)	81 (22.50)	AA vs AG+GG	<b>0.05</b>	0.711 (0.498-1.015)
ALELOS	n=488 (%)	n=720 (%)			
<b>A</b>	278 (56.97)	373 (51.81)		0.07	1.32 (0.977-1.552)
<b>G</b>	210 (43.03)	347 (48.19)			

El análisis del SNP 49A/G en la población femenina, mostró que el genotipo AA se encuentra más frecuente en los pacientes, que en los controles (33.01% vs 24.84%,  $p=0.06$ ), sin embargo no mostraron diferencias significativas; al realizar la comparación de la distribución del alelo A en ambos grupos, observamos que en pacientes femeninos con LES se encuentra en una frecuencia significativamente mayor, comparado con los controles (57.18% vs 51.13%,  $p=0.05$ ) por lo que sugiere que este alelo está participando en la susceptibilidad a desarrollar LES, de inició en la edad pediátrica (tabla 7).

**Tabla 7 . Distribución Genotípica y Alélica del SNP +49(A/G) del gen *CTLA4***

**en población femenina**

<b>GENOTIPOS</b>	<b>PACIENTES n=209 (%)</b>	<b>CONTROLES n=310 (%)</b>		<b>P</b>	<b>OR 95%CI</b>
<b>AA</b>	69 (33.01)	77 (24.84)	GG vs AA	<b>0.06</b>	1.61 (0.967-2.675)
<b>AG</b>	101 (48.33)	163 (52.58)	AA vs AG	<b>0.07</b>	0.691 (0.459-1.041)
<b>GG</b>	39 (18.66)	70 (22.58)	AA vs AG+GG	0.04	0.671 (0.456-0.987)
<b>ALELOS</b>	<b>n=418 (%)</b>	<b>n=620 (%)</b>			
<b>A</b>	239 (57.18)	317 (51.13)		<b>0.05</b>	1.276 0.994-1.638
<b>G</b>	179 (42.82)	303 (48.87)			

Cuando las frecuencias genotípicas del SNP CT60G/A fueron comparadas entre casos y controles, el genotipo homocigoto AA, fué más frecuente entre los pacientes con LES que en los controles (22.86% vs 16.94%; p=0.04); La frecuencia del alelo A fue mayor en pacientes con LES (47.35%) que en controles (41.67%), y el valor de p=0.05 (tabla 8), sugiriendo que este alelo confiere riesgo de susceptibilidad a LES en nuestra población de pacientes pediátricos mexicanos

**Tabla 8. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo CT60(G/A) del gen *CTLA4***

<b>GENOTIPOS</b>	<b>PACIENTES n=245 (%)</b>	<b>CONTROLES n=360 (%)</b>		<b>P</b>	<b>OR 95%CI</b>
CTLA-4 GG	69 (28.16)	121 (33.61)	GG vs AA	0.04	1.610 (1.01-2.571)
CTLA-4 GA	120 (48.98)	178 (49.45)	GG vs GA	0.38	1.182 (0.812-1.721)
CTLA-4 AA	56 (22.86)	61 (16.94)	GG vs GA+AA	0.15	1.291 (0.906-1.840)
<b>ALELOS</b>	<b>n=490 (%)</b>	<b>n=720 (%)</b>			
G	258 (52.65)	420 (58.33)		0.05	1.259 (0.999-1.586)
A	232 (47.35)	300 (41.67)			

Después de la estratificación de nuestra población por sexo, se compararon las frecuencias genotípicas, entre el homocigoto AA de los pacientes femeninos con los controles femeninos, de lo cual observamos que la frecuencia de este genotipo fue mayor en los casos comparada con los controles (21.91% vs 15.16%,  $p=0.03$ ). Así mismo, la frecuencia del alelo A fué más alto en pacientes femeninos con LES que en controles femeninos (46.67% vs 40.32%;  $p=0.04$ ), (tabla 9).

**Tabla 9. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo CT60(G/A) del gen *CTLA4* en la población Femenina**

GENOTIPOS	PACIENTES n=210 (%)	CONTROLES n=310 (%)		P	OR 95%CI
CTLA-4 GG	60 (28.57)	107 (34.52)	GG vs AA	<b>0.03</b>	1.745 1.043-2.921
CTLA-4 GA	104 (49.52)	156 (50.32)	GG vs GA	<b>0.39</b>	1.189 (0.795-1.777)
CTLA-4 AA	46 (21.91)	47 (15.16)	GG vs GA+AA	0.15	1.318 (0.901-1.927)
ALELOS	N=420 (%)	n=620 (%)			
G	224 (53.33)	370 (59.68)		<b>0.04</b>	1.295 (1.009-1.663)
A	196 (46.67)	250 (40.32)			

Para complementar este análisis se estimaron las frecuencias de los haplotipos en los casos y controles femeninos usando los tres SNPs del gen *CTLA4*. Se encontraron un total de cinco haplotipos, de los cuales solamente cuatro mostraron una frecuencia mayor al 1%. (tabla 10). De estos, sólo dos haplotipos (1 y 2) mostraron una tendencia o una débil asociación con LES, en nuestro grupo de estudio. El haplotipo (1) **CGG**, constituido por los alelos -318**C**, 49**G** y CT60 **G**, del gen *CTLA4*, se encontró en una frecuencia mas baja en los casos con LES que en los controles (42.34% vs 49%; p=0.03), lo anterior nos sugiere que este haplotipo está involucrado con protección a LES en nuestra población de pacientes pediátricos mexicanos (tabla 10), a diferencia del haplotipo (2) CAA, constituido por los alelos, -318**C**, 49A y CT60**A**, del gen *CTLA4* el cual se encontró en una frecuencia mayor en los pacientes, en comparación con los controles (45.93% vs 40.11%; p=0.06).

**Tabla 10. Análisis de los Haplotipos en el Gen *CTLA4***

Haplotipo	SNPs -318C/T; 49A/G; CT60G/A	Controles %	Pacientes %	p	OR 95% IC
1	C G G	49.0	42.34	0.03	0.73 (0.59-0.99)
2	C A A	40.11	45.93	0.06	1.27 (0.98-1.64)
3	T G A	6.31	5.5	0.59	0.86 (0.49-1.51)
4	C G A	4.5	5.7	0.38	1.28 (0.71-2.32)

n= 209 pacientes y n= 309 controles

### Gen *MBL*

La distribución de los SNPs **-550 G/C**, **52C/T**, **54 G/A** y **57 G/A** del gen *MBL*, se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg tanto en pacientes ( $p=0.49$ ,  $p=1.0$ ,  $p=0.20$  y  $p=1.0$ ) y en controles ( $p=0.35$ ,  $p=1.0$ ,  $p=0.81$  y  $p=1.0$ ). La comparación de las frecuencias genotípicas entre los casos con LES y los controles mostró que el genotipo CC del SNP **-550 G/C**, se encuentra en una frecuencia mayor en los casos comparado con los controles (17.94% vs 15.29%, respectivamente), sin embargo no muestran diferencias significativas ( $p=0.36$ ). Del mismo modo cuando realizamos la comparación de las frecuencias alélicas entre los casos y los controles, el alelo C, se encontró con una frecuencia mayor en los pacientes que en los controles (43.95% vs 41.12%), sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0.38$ ) (tabla 11).

**Tabla 11. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo -550(G/C) del gen *MBL***

<b>GENOTIPO</b>	<b>PACIENTES n=223 (%)</b>		<b>CONTROLES n=242 (%)</b>			<b>p</b>	<b>OR (95% IC)</b>
GG	67	(30.04)	80	(33.06)	GG vs CC	0.36	1.291 (0.743-2.243)
GC	116	(52.02)	125	(51.65)	GG vs GC	0.62	1.108 (0.734-1.672)
CC	40	(17.94)	37	(15.29)	GG vs GC+CC	0.48	1.15 (0.777-1.702)
<b>ALELOS</b>	<b>n=446 (%)</b>		<b>n=484 (%)</b>				
G	250	(56.05)	285	(58.88)		0.38	1.123 (0.866-1.457)
C	196	(43.95)	199	(41.12)			

Para el análisis de este gen también se estratificó la población de estudio, considerando únicamente la población femenina. Con respecto al SNP -550G/C, se observó que el genotipo CC se encuentra más frecuente en los pacientes con LES, que en los controles (16.76% vs 13.99%), sin embargo las diferencias estadísticamente significativas al hacer la comparación de la distribución del alelo C en ambos grupos, mostró que en pacientes femeninos con LES, este alelo presenta una frecuencia mayor que los controles (44.24% vs 41.19%), aunque no hay diferencias significativas entre ambos grupos (tabla 12).

**Tabla 12. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo -550(G/C) del gen *MBL* en la población femenina**

<b>GENOTIPOS</b>	<b>PACIENTES n=191 (%)</b>		<b>CONTROLES n=193 (%)</b>			<b>p</b>	<b>OR (95% IC)</b>
GG	54	(28.27)	61	(31.61)	GG vs CC	0.36	1.339 (0.713-2.513)
GC	105	(54.97)	105	(54.4)	GG vs CG	0.59	1.130 (0.716-1.781)
CC	32	(16.76)	27	(13.99)	GG vs CG+CC	0.47	1.172 (0.757-1.816)
<b>ALELOS</b>	<b>n=382 (%)</b>		<b>n=386 (%)</b>				
G	213	(55.76)	227	(58.81)		0.39	1.133 (0.851-1.508)
C	169	(44.24)	159	(41.19)			

En el análisis del SNP **52C/T** no se observaron diferencias significativas en la distribución de los genotipos entre casos y controles ( $p=0.52$ ) (tabla 14).

El análisis comparativo de las frecuencias alélicas en este mismo SNP **52C/T**, mostró una mayor frecuencia del alelo T en pacientes que en controles (3.35% vs 2.58%), sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.53$ ) (tabla 13).

**Tabla 13. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo 52(C/T) del gen *MBL***

<b>GENOTIPO</b>	<b>PACIENTES n=223 (%)</b>	<b>CONTROLES n=243 (%)</b>		<b>p</b>	<b>OR (95% IC)</b>
CC	209 (93.72)	231 (95.06)	CC vs TT	1.0	1.105 (0.022-55.93)
CT	14 (6.28)	12 (4.94)	CC vs CT	0.52	1.289 (0.583-2.851)
TT	0 (0)	0 (0)	CC vs CT+TT	0.52	1.289 (0.583-2.851)
<b>ALELOS</b>	<b>n=446 (%)</b>	<b>n=486 (%)</b>			
C	432 (96.86)	474 (97.53)		0.53	1.280 (0.586-2.798)
T	14 (3.14)	12 (2.47)			

El análisis en la población femenina del SNP 52(C/T), no mostró diferencias significativa en las frecuencias genotípicas (6.28% vs 5.15%,  $p= 0.63$ ) y alélicas (3.35% vs 2.58%,  $p=0.53$ ) entre casos y controles (tabla 14).

**Tabla 14. Distribución Genotípica y Alélica del SNP 52(C/T)del gen *MBL* en población Femeninos**

GENOTIPO	PACIENTES n=191 (%)	CONTROLES n=194 (%)		p	OR (95% IC)
CC	179 (93.72)	184 (94.85)	CC vs TT	1.0	1.028 (0.020-52.0)
CT	12 (6.28)	10 (5.15)	CC vs CT	0.63	1.234 (0.52-2.927)
TT	0 (0)	0 (0)	CC vs CT+TT	0.63	1.234 (0.52-2.927)
ALELOS	n=382 (%)	n=388 (%)			
C	370 (96.65)	378 (97.42)		0.63	1.226 (0.523-2.872)
T	12 (3.35)	10 (2.58)			

Otro de los SNPs, que analizamos es el **54G/A**, observamos que las frecuencias genotípicas entre los casos con LES y los controles, en el genotipo GA, se presenta en un porcentaje menor en los casos comparado con los controles (24.22% vs 26.64%) respectivamente, sin embargo no muestran diferencias significativas ( $p=0.57$ ) (tabla 15). Al igual que para los otros SNPs, cuando se compararon las frecuencias alélicas en este mismo SNP **54G/A**, entre los casos con LES y los controles, encontramos que el alelo A, se encuentra menos en los pacientes con LES, que en los controles (15.70% vs 16.19%), no mostrando diferencias significativas ( $p=0.83$ ), (tabla 15).

**Tabla 15. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo 54G/A del gen MBL**

<b>GENOTIPO</b>	<b>PACIENTES n=223 (%)</b>	<b>CONTROLES n=244 (%)</b>		<b>p</b>	<b>OR (95% IC)</b>
GG	161 (72.20)	172 (70.49)	GG vs AA	0.70	1.221 (0.433-3.444)
GA	54 (24.22)	65 (26.64)	GG vs GA	0.57	0.888 (0.583-1.351)
AA	8 (3.58)	7 (2.87)	GG vs GA+AA	0.68	0.92 (0.615-1.375)
<b>ALELOS</b>	<b>n=446 (%)</b>	<b>n=486 (%)</b>			
G	376 (84.30)	409 (83.81)		0.83	0.964 (0.679-1.369)
A	70 (15.70)	79 (16.19)			

Estratificando nuestra población de estudio, para considerar únicamente la población femenina, en el SNP 54G/A, observamos que el genotipo GA se encuentra menos frecuente en los pacientes con LES, que en los controles (23.04% vs 27.18%), y el valor de  $p=0.39$  nos dice que no muestra diferencias significativas. Posteriormente cuando comparamos la distribución del alelo A en ambos grupos, observamos que en pacientes femeninos con LES se encuentra en un porcentaje menor, comparado con los controles (15.18% vs 15.64%) y el valor de  $p=0.86$ , por lo que podemos observar que no hay diferencias significativas entre ambos grupos (tabla 16).

**Tabla 16. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo 54(G/A) del gen *MBL* en población femenina**

<b>GENOTIPO</b>	<b>PACIENTES n=191 (%)</b>	<b>CONTROLES n=195 (%)</b>		<b>p</b>	<b>OR (95% IC)</b>
GG	140 (73.3)	138 (70.77)	GG vs AA	0.38	1.725 (0.494-6.025)
GA	44 (23.04)	53 (27.18)	GG vs GA	0.39	0.818 (0.515-1.301)
AA	7 (3.66)	4 (2.05)	GG vs GA+AA	0.58	0.882 (0.565-1.376)
<b>ALELOS</b>	<b>n=382 (%)</b>	<b>n=390 (%)</b>			
G	324 (84.82)	329 (84.36)		0.86	0.965 (0.653-1.427)
A	58 (15.18)	61 (15.64)			

El siguiente y último de los SNPs que se analizó del gen *MBL* fue es el 57G/A en este observamos que las frecuencias genotípicas entre los casos con LES y los controles no muestran diferencias significativas ( $p=1.0$ ) (tabla 17). Lo mismo ocurrió con el análisis de las frecuencias alélicas ( $p=1.0$ ) (tabla 17).

**Tabla 17. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo 57G/A del gen MBL**

GENOTIPO	PACIENTES n=223 (%)	CONTROLES n=243 (%)		p	OR (95% IC)
GG	220 (98.65)	240 (98.77)	GG vs AA	1.0	1.091 (0.022-53.20)
GA	3 (1.35)	3 (1.23)	GG vs GA	0.91	1.091 (0.218-5.462)
AA	0 (0)	0 (0)	GG vs GA+AA	0.91	1.091 (0.218-5.462)
<b>ALELOS</b>	<b>n=446 (%)</b>	<b>N=486 (%)</b>			
G	443 (99.33)	483 (99.38)		1.0	1.090 (0.219-5.430)
A	3 (0.67)	3 (0.62)			

En el análisis de la población femenina para el SNP 57(G/A), observamos que el genotipo GG se encuentra en un porcentaje muy parecido en ambos grupos (98.43% vs 98.45%), así mismo el genotipo GA se encuentra ligeramente más frecuente en los pacientes femeninos con LES, que en los controles (1.57% vs 1.55%), aunque el valor de  $p=0.98$  nos dice que no muestran diferencias significativas. Posteriormente cuando comparamos la distribución del alelo A en ambos grupos, observamos que la frecuencia es muy similar, en pacientes femeninos con LES, comparado con los controles (0.79% vs 0.77%) y el valor de  $p=1.0$ , por lo que podemos observar que no hay diferencias significativas entre ambos grupos (tabla 18).

**Tabla 18. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo 57G/A del gen *MBL* en población femenina**

GENOTIPO	PACIENTES n=191 (%)	CONTROLES n=194 (%)		p	OR (95% IC)
GG	188 (98.43)	191 (98.45)	GG vs AA	1.0	1.016 (0.020-51.46)
GA	3 (1.57)	3 (1.55)	GG vs GA	0.98	1.016 (0.202-5.098)
AA	0 (0)	0 (0)	GG vs GA+AA	0.98	1.016 (0.202-5.098)
<b>ALELOS</b>	<b>N=382 (%)</b>	<b>n=388 (%)</b>			
G	379 (99.21)	385 (99.23)		1.0	1.016 (0.204-5.065)
A	3 (0.79)	3 (0.77)			

La construcción de haplotipos en casos y controles femeninos con los cuatro SNPs analizados en el gen *MBL* (-550G/C, 57G/A, 54G/A y 52C/T), evidenció la presencia de ocho haplotipos, de los cuales solamente tres mostraron una frecuencia mayor al 10%. (tabla 19). El haplotipo **GGGC**, fué el más frecuente en la población (55%) de la población en general, mientras que el menos frecuente fue el haplotipo **CGAC**; sin embargo, ninguno de los dos muestra diferencias estadísticamente significativas entre los casos y los controles.

**Tabla 19. Análisis de los Haplotipos de los SNPs del Gen *MBL***

Haplotipo	SNPs <i>MBL</i> -550G/C, 57G/A, 54G/A y 52C/T	Controles n=309 (%)	Pacientes n=209 (%)	p	OR 95% IC
1	G G G C	54	56	0.4	0.89 (0.68-1.17)
2	C G G C	27	24	0.32	1.16 (0.85-1.59)
3	C G A C	15	16	0.68	0.93 (0.64-1.35)

### Gen *CFH*

Este es el primer reporte donde se investiga la asociación del gen que codifica para el factor H (*CFH*) involucrado en la regulación del complemento por la vía alterna, con la susceptibilidad a desarrollar LES. El análisis de la distribución genotípica y alélica del polimorfismo Y402H (T/C, rs1061170) en nuestros pacientes con LES mostró una frecuencia mucho mayor del genotipo heterocigoto TC en casos que en controles (24.4 vs 17.5% respectivamente) mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.017$ ).

Así mismo, encontramos que la frecuencia del alelo C fue mayor en los casos con LES que en los controles (15.2% vs 8.8%) mostrando una asociación significativa del alelo C con la susceptibilidad para desarrollar LES ( $P = 0.0040$ ; OR = 1.595, 95% IC: 1.158-2.198) en nuestra población de estudio (Tabla 20).

**Tabla 20. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo 402T/C del gen (*CFH*)**

GENOTIPO	PACIENTES n=223 (%)	CONTROLES n=243 (%)		p	OR (95% IC)
TT	213 (73.2)	375 (81.2)	TT vs TC	0.017	1.543 (1.076-2.21)
TC	71 (24.4)	81 (17.5)	TT vs CC	0.06	3.521 (0.872-14.22)
CC	6 (2.)	3 (0.6)	TT vs TC+CC	0.0074	1.614 (1.14-2.29)
ALELOS	n=486 (%)	n=648 (%)			
T	412 (84.8)	591 (91.2)		0.0040	1.595 (1.16-2.19)
C	74 (15.2)	45 (8.8)			

## **VII. DISCUSIÓN**

El avance en los estudios genéticos de LES con análisis del genoma completo, mapeo fino y estudios de gen candidato ha conducido a la identificación de varios genes de susceptibilidad. Por otro lado, la heterogeneidad genética y étnica contribuye enormemente a la complejidad en su presentación clínica.

Las bases de la etiopatogenia del LES aún no están bien esclarecidas y aunque existen varias evidencias de la participación de los factores genéticos en diversos estudios de asociación, la mayoría de estos involucran sólo pacientes con LES en la etapa adulta. La genética del LES ha sido estudiada desde los 70s cuando la primera asociación alelica del complejo principal de Histocompatibilidad-HLA, con Lupus fue observada.

Por otro lado, los estudios de asociación muestran ciertas discrepancias inter e intrapoblacionales. Estas inconsistencias son probablemente debidas a la heterogeneidad genética, a falsas asociaciones derivadas de la estratificación de la población o de tamaños de muestras insuficientes, por lo que el análisis de nuestra población es fundamental para identificar a los factores genéticos asociados al desarrollo de LES. Recientemente se han reportado los primeros estudios en LES pediátrico en dos poblaciones asiáticas, donde se encuentra asociación con SNPs localizados en el gen *RANTES* y en el receptor alfa de estrógenos, aunque en ambos estudios, el tamaño de la muestra es muy pequeño (46 y 41 pacientes, respectivamente) (Lee y cols., 2004; Liao y cols. 2004). Nuestro análisis incluye una de las muestras de pacientes pediátricos más grandes analizadas hasta el momento (Baca y cols. 2006; Velázquez-Cruz y cols. 2007).

El diseño de este estudio fue de casos y controles en el cual se analizan SNPs localizados en los genes *CTLA4* y *MBL*, los cuales han mostrado evidencias de asociación con LES en adultos en diferentes poblaciones (españoles, asiáticos, japoneses, entre otros).

Los genes *CTLA4* y *MBL*, codifican para moléculas con un papel importante en las respuestas inmune e inflamatoria, así como en la regulación de la activación de células T. En un primer paso se eligieron estos genes que habían mostrado asociación con LES en otras poblaciones; En una segunda etapa se incluyó el análisis del gen *CFH* como un nuevo gen candidato, por encontrarse en la región 1q25-32, una región que ha mostrado ligamiento con LES y que además codifica para el factor H, el principal inhibidor de la vía alterna del complemento (Johanneson y cols. 2002).

### **Gen *CTLA4***

La activación de células T requiere de dos señales, una derivada del receptor de células T y la otra cuando el receptor coestimulador interactúa con su ligando, CD28 es la principal molécula coestimuladora, se une a CD80/CD86 en células presentadoras de antígeno y envía una potente señal coestimuladora a células T (Lenschow y cols., 1996); *CTLA4*, es un receptor relacionado a CD28, también se une a CD80/CD86 en células presentadoras de antígenos pero *CTLA4* inhibe la activación de células T, por lo que *CTLA4* es una molécula que regula la respuesta inmune de antígenos propios y externos controlando la activación de células T antígeno-específica.

Dado su papel en la activación de las células T y en la tolerancia inmune, el gen *CTLA4* ha sido implicado en el desarrollo del LES en los pacientes adultos, en varias poblaciones analizadas, por lo anterior surge la importancia de analizarlo en pacientes pediátricos. En este estudio se analizaron tres SNPs localizados en el gen de *CTLA4*: el SNP -318C/T, SNP49A/G y el SNP CT60G/A; que en estudios previos se ha observado que tienen un papel potencial en influir directamente en los niveles del *CTLA4* funcional y por tanto probablemente jugar un papel importante en la modulación de la respuesta inmune en esta enfermedad.

Los resultados de este estudio muestran que los SNPs -318C/T y el SNP49A/G no muestran evidencia de asociación con la susceptibilidad al desarrollo del LES en

nuestra población de pacientes pediátricos. Los resultados observados en este estudio en comparación con lo reportado en otras poblaciones, son controversiales. En un estudio en el que analizan una muestra de 113 pacientes y 200 controles realizado en la población japonesa, este SNP mostró asociación con la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad ( $p=0.0008$ ) (Ahmed y cols., 2001) ; en otro estudio en el que observan una asociación con la población coreana analizada ( $p=0.04$ ), (Lee y cols., 2001), pero en este el tamaño de muestra es mas pequeño (80 pacientes y 86 controles). Sin embargo, en un meta-analisis realizado por Lee y cols., 2005, analizando 7 poblaciones de ancestro europeo principalmente, no encontraron evidencia de asociacion con LES, lo cual apoya los resultados observados en este trabajo.

Por otro lado, el SNP 49A/G, en un estudio realizado por Aguilar y cols., 2003, muestra asociación con la población analizada ( $p=0.026$ ) y en un meta-analisis lo encontraron asociado principalmente con poblaciones de origen asiático (Lee y cols., 2005) al igual que en otro estudio realizado en la población japonesa ( $p=0.003$ ) (Ahmed y cols., 2001) Sin embargo, en nuestra población pediátrica analizada, no muestra asociación ( $p=0.07$ ). La discrepancia entre nuestros resultados y lo reportado en la literatura podria deberse a factores tales como heterogeneidad genetica o las influencia étnica.

Por otro lado, el LES en el adultos afecta principalmente al género femenino con una relación hasta de 9:1, lo anterior también lo observamos en nuestra población estudiada, en la cual tenemos un total de 250 pacientes pediátricos no relacionados, con LES de inicio antes de los 16 años de edad; de los cuales 214 pacientes fueron femeninos (85.6%) y 36 fueron masculinos (14.4%), cuando estratificamos por sexo para evaluar si el sexo podría tener una participación en la susceptibilidad a la enfermedad, observamos que el valor de p disminuye ( $p=0.05$ ), mostrando una débil asociación con el desarrollo de la enfermedad, por lo que nos lleva a sugerir que al menos el SNP 49A/G podria tener una asociación con el LES pediátrico en los pacientes femeninos, confirmando lo previamente reportado en la literatura.

Cuando analizamos el SNP CT60G/A localizado en la región 3' UTR del gen *CTLA4*,

nuestros resultados mostraron asociación del alelo CT60A con LES pediátrico, ( $p=0.04$ ) (tabla 8.); cuando estratificamos nuestra muestra de casos con LES, analizando únicamente a pacientes y controles femeninos, observamos que dicha diferencia sigue siendo estadísticamente significativa, esta diferencia que existe en las frecuencias genóticas muestra mayor asociación ( $p=0.03$ ) (tabla 9). Una observación importante que no ha sido reportado en estudios anteriores, es el efecto de dosis génica. Nuestros resultados describen un efecto de dosis génica debido a que observamos una asociación significativa cuando comparamos los pacientes homocigotos GG vs AA, ( $p=0.04$ , OR=1.61; 95% CI=1.01-2.57), pero interesantemente no observamos esta asociación cuando comparamos GG vs GA ( $p=0.38$ ) (tabla8)

Sin embargo a diferencia de lo reportado en la población española (Torres y cols., 2004), en el cual muestran los primeros resultados del SNP recientemente descrito relacionado con la susceptibilidad a desarrollar LES, encuentran que el genotipo AA se encuentra en una frecuencia menor en pacientes, comparada con los controles (18.7% vs 28.3%;  $p=0.009$ , respectivamente) y la frecuencia del alelo G es mayor en los pacientes con LES que en los controles (81.2% vs 71.7%;  $p=0.006$ ; respectivamente). Estos resultados son controversiales, debido a que ellos observan que el alelo G confiere riesgo en su población española analizada, mientras que para nuestra población pediátrica mexicana con LES el alelo A, es el que confiere riesgo.

Por otro lado, en otro estudio en el que analizan CT60G/A para varias enfermedades autoinmunes en el que no involucran LES; encuentran asociado el alelo G con la susceptibilidad en varias enfermedades autoinmunes analizadas (Ueda y cols., 2003).

La discrepancia entre nuestros resultados y lo reportado en la literatura podría explicarse por la naturaleza y el tamaño de las muestras analizadas (y de este modo el poder estadístico), aunado a la variabilidad genética que existe en cada población. Además, la interpretación de los resultados observados en este trabajo y los reportados en la literatura puede ser complicado por la posibilidad de la existencia

de otro gen patogénico, que podría encontrarse adyacente al gen *CTLA4*, afectando el desarrollo del LES, en los pacientes pediátricos.

Un hecho que respalda lo observado en nuestra población, es que nuestros datos son muy semejantes a los depositados en el HAPMAP (en cuanto al porcentaje en las frecuencias alélicas, datos no mostrados), al componente europeo ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi)).

Se construyeron haplotipos utilizando los SNPs anteriormente descritos. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia del haplotipo CGG entre controles y casos (49% vs 42.34, respectivamente,  $P=0.03$ ) (tabla 10). El haplotipo CAA que porta el alelo de riesgo del SNP CT60G/A no mostro asociación con el desarrollo de la enfermedad ( $p=0.06$ ). Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman las asociaciones descritas en estudios realizados en pacientes adultos y es de los primeros descritos en población pediátrica, estos datos confirman el papel del alelo CT60A como un marcador de riesgo genético para LES.

## **Gen MBL**

Otros de los genes que se han descritos involucrados en LES es el gen *MBL*, que codifica para una proteína de fase aguda (es miembro de la familia de colectinas), es el principal componente que activa la cascada del complemento por la vía de lectinas y es un componente esencial del sistema inmune innato, la producción de MBL por hepatocitos se aumenta por estímulos inflamatorios; *MBL* es homólogo a C1q y se une a residuos de manosa que se encuentran en la superficie celular de los microorganismos (facilitando su opsonización y fagocitosis), así como a inmunoglobulinas y complejos inmunes, además modula la inflamación y promueve la eliminación de células apoptóticas. (Garred y cols., 2005). En varios estudios que se han realizado, como en la población europea (Garred y cols., 2003) encuentran que polimorfismos en el exón 1 (SNPs 52, 54 y 57) del gen *MBL*, están relacionados con la deficiente producción de la proteína, y subsecuentemente con el desarrollo de

LES. Otros estudios muestran que polimorfismos en los codones 54 y 57 pueden ser factores de riesgo que confieren susceptibilidad a LES en diferentes poblaciones (Davies y cols., 1995; Lau y cols., 1996; Sullivan y cols., 1996; Davies y cols., 1997).

A diferencia de lo reportado en varias poblaciones, el análisis del gen MBL no mostró diferencias significativas en ninguno de los cuatro SNPs evaluados (-550 G/C, 52C/T, 54 G/A y 57 A/G) en nuestra población de pacientes pediátricos, lo cual sugiere que estos SNPs no están asociados al desarrollo de LES; sin embargo con estos resultados, no podemos descartar la participación del gen MBL como modificador de la misma.

No podemos descartar que otros polimorfismos localizados en estos genes, se encuentren asociados con el riesgo al desarrollo de la enfermedad, así como tampoco podemos descartar la posibilidad que alguno de estos polimorfismos, se encuentren asociados con alguna de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Otra explicación alternativa, por la que no se observó asociación de estos SNPs en nuestro grupo de pacientes pediátricos, es que la influencia de estos SNPs involucren el fondo genético, sabemos que la población mexicana es el resultado de varias mezclas.

### **Gen *CFH***

Por otra parte, el sistema del complemento consta de proteínas séricas que participan tanto en opsonización, como en lisis de células, en presencia de anticuerpos; su principal función es la eliminación de microbios, eliminación de complejos inmunes y aumenta la respuesta inmune humoral; así como también puede reconocer estructuras no propias en ausencia de anticuerpos.

Notablemente, el presente estudio es el primer trabajo donde se analiza la asociación del gen *CFH* con LES. Este gen codifica para el factor H, el principal inhibidor de la vía alterna del complemento y se ha asociado a maculopatía

degenerativa relacionada con la edad y glomerulonefritis membranoproliferativa tipo II (Hageman y cols., 2005). Nuestros resultados muestran una clara asociación del alelo 402H con la susceptibilidad para desarrollar LES en la edad pediátrica. El factor H contiene importantes dominios funcionales que consisten de 20 repetidos consenso cortos (SCR) y este polimorfismo se encuentra localizado dentro del dominio SCR 7 el cual se une a la proteína C reactiva y a la heparina, sin embargo, hasta el momento no se sabe con certeza de que manera afecta la función de la proteína, pero dado que el SNP (Y402H) analizado se localiza en el exón 9 el cual codifica para un dominio de unión a proteína C reactiva (CRP) y a heparina podríamos inferir que el cambio de una tirosina (Y) por una Histidina (H) modifica de manera importante los dominios de interacción con estas proteínas; CRP reconoce residuos celulares. La activación del complemento es común en los pacientes con LES lo que se traduce en hipocomplementemia y depósito de sus productos en los tejidos, contribuyendo al daño tisular. Sin embargo, paradójicamente la deficiencia de los componentes tempranos de la vía clásica del complemento en el humano, constituye uno de los factores genéticos que confieren susceptibilidad para desarrollar LES (Manderson y cols., 2004). Se ha postulado que los componentes de la vía clásica del complemento protegen del desarrollo de la enfermedad mediante la depuración de células apoptóticas. En contraste, la activación de la vía alterna del complemento favorece el daño tisular. El sistema del complemento se encuentra fuertemente regulado por factores unidos a membranas celulares y factores circulantes que actúan a diversos niveles en la cascada del complemento, lo que previene el daño tisular.

El hallazgo observado en nuestra población de pacientes pediátricos, podría sugerir que el LES pediátrico es una enfermedad distinta o un subtipo del LES del adulto, si así fuera es probable que en LES pediátrico estén operando un diverso grupo de genes que se comparten con el adulto, pero que en el LES de edad pediátrica funcionan en menor o mayor grado de magnitud, dependiendo del grado de la exposición a diversos factores ambientales que aun no se conocen. Tal suposición se ve respaldada por los hallazgos inmunológicos y las manifestaciones clínicas observados en los pacientes pediátricos, en donde se ve que la enfermedad cuando

comienza en la infancia tiende a ser mas grave desde su inicio y tiene un curso clínico mas agresivo, por lo que estos pacientes mueren generalmente durante la fase aguda de la enfermedad.

Los estudios de replicación en diferentes poblaciones son importantes debido a que fortalecen la evidencia de la asociacion estudiada. Una ausencia de replicacion entre los diferentes subgrupos étnicos o entre diferentes escenarios ambientales pude representar observaciones validas reflejando diferentes fondos genéticos y diferentes interacciones gen-ambiente.

## **VIII. CONCLUSIONES**

1. Nuestros resultados muestran que algunos de los factores genéticos involucrados en el desarrollo de LES son diferentes a lo reportado en otras poblaciones.
2. Dos polimorfismos analizados en el gen *CTLA4* y cuatro del gen *MBL* no confieren riesgo para padecer LES en nuestra población de pacientes pediátricos.
3. Sin embargo podemos sugerir que el alelo A del SNP CT60G/A del gen *CTLA4* y el alelo C del SNP Y402H (T/C) del gen *CFH*, incrementan el riesgo a padecer la enfermedad.
4. En este trabajo se aporta el conocimiento de nuevos factores genéticos involucrados en la etiopatogenia de la enfermedad al identificar por primera vez la asociación del gen *CFH* con la susceptibilidad para desarrollar LES.
5. La identificación de los factores genéticos involucrados en la etiopatogenia del LES tiene aplicación potencial en el diagnóstico, prevención y tratamiento de la enfermedad.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- 1 Ambrus GP, Gal M, Kojima K, Szilagyi J, Balczer J, Antal L, Graf A, Laich BE, Moffatt W, Schwaeble RB, Sim and Zavodszky P. Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and 2: a study on recombinant catalytic fragments. *J Immunol* 2003;170:1374.
- 2 Arnet FC Jr. The genetics of human lupus. In Dubois' Lupus Erythematosus, Ed 5. Edited by Wallace DJ, Hahn BH; Baltimore: Williams and Wilkins, 1997<sup>a</sup>:77-117.
- 3 Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC *et al.* A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004; 75:330-337.
- 4 Ambrus GP, Gal M, Kojima K, Szilagyi J, Balczer J, Antal L, Graf A, Laich BE, Moffatt W, Schwaeble RB, Sim and Zavodszky P. Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and 2: a study on recombinant catalytic fragments. *J Immunol* 2003;170:1374.
- 5 Arnet FC Jr. The genetics of human lupus. In Dubois' Lupus Erythematosus, Ed 5. Edited by Wallace DJ, Hahn BH; Baltimore: Williams and Wilkins, 1997<sup>a</sup>:77-117.
- 6 Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC *et al.* A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004; 75:330-337. Ambrus GP, Gal M, Kojima K, Szilagyi J, Balczer J, Antal L, Graf A, Laich BE, Moffatt W, Schwaeble RB, Sim and Zavodszky P. Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and 2: a study on recombinant catalytic fragments. *J Immunol* 2003;170:1374.
- 7 Arnet FC Jr. The genetics of human lupus. In Dubois' Lupus Erythematosus, Ed 5. Edited by Wallace DJ, Hahn BH; Baltimore: Williams and Wilkins, 1997<sup>a</sup>:77-117.
- 8 Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC *et al.* A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004; 75:330-337.
- 9 Ambrus GP, Gal M, Kojima K, Szilagyi J, Balczer J, Antal L, Graf A, Laich BE, Moffatt W, Schwaeble RB, Sim and Zavodszky P. Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and 2: a study on recombinant catalytic fragments. *J Immunol* 2003;170:1374.

- 10 Arnet FC Jr. The genetics of human lupus. In Dubois' Lupus Erythematosus, Ed 5. Edited by Wallace DJ, Hahn BH; Baltimore: Williams and Wilkins, 1997<sup>a</sup>:77-117.
- 11 Baca V, Velazquez-Cruz R, Salas-Martinez G, Espinosa-Rosales F, Saldana-Alvarez Y, Orozco L. Association analysis of the PTPN22 gene in childhood-onset systemic lupus erythematosus in Mexican population. *Genes Immun* 2006, 7(8):693-5.
- 12 Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC *et al*. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004; 75:330-337.
- 13 Blackmore T, Hellwage J, Sadlon T, Higgs N, Zipfel P, Ward H, Gordon D. Identification of the second heparin-binding domain in human complement factor H. *J Immunol* 1998; 160:3342-3348.
- 14 Blackmore T, Sadlon T, Ward H, Lublin D, Gordon D: Identification of a heparin-binding domain in the seventh short consensus repeat of complement factor H. *J Immunol* 1996; 157: 5422-5427.
- 15 Blin N, Sttaford D. A general method for isolation of high molecular weigh DNA from eukaryotes. *Nucleic Acid Res* 1976; 3:2303-2308.
- 16 Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M *et al*. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 2004; 36: 337-338.
- 17 Brunner HI, Feldman BM, Bombardier C, Silverman ED. Sensitivity of the systemic lupus erythematosus disease activity index, British Isles Lupus Assessment Group Index, and Systemic Lupus Activity Measure in the evaluation of clinical change in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1354-1360.
- 18 Bunce M, Procter J, Welsh K I. A DNA based detection and screening system for identifying HLA class I expression variants by sequence-specific primers. *Tissue Antigens* 1999; 53: 498-506.
- 19 Dahl MRS, Thiel M, Matsushita T, Fujita AC, Willis T, Christensen T, Vorup-Jensen, and Jensenius JC. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity* 2001;15:127.
- 20 Dariavach P, Mattei MG, Golstein P, Lefranc MP. Humman Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunol* 1988;18: 1901-1905.
- 21 Davies EJ, Teh LS, Ordi-Ros J, *et al*. A dysfunctional allele of the mannose binding protein gene associates with systemic lupus erythematosus in a Spanish population. *J Rheumatol* 1997; 24: 485-488.

- 22 Deapen D, Escalante A, Weinrib L, et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 457-464.
- 23 DiScipio R. The ultrastructures of complement components H. *J Immunol* 1992; 49: 2592-2599.
- 24 Eilat D, Naparstek Y. Anti-DNA autoantibodies: a puzzle of autoimmune phenomena. *Mol Med Today* 1999; 20: 339-342.
- 25 Fearon DT, Daha MR, Weiler JM, Austen KF: The natural modulation of the amplification phase of complement activation. *Transplant Rev* 1976; 32: 12-25.
- 26 Ferreiros-Vidal I, Gomez-Reino JJ, Barros F, Carracedo A, Carreira P, Gonzalez-Escribano F, et al. Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus: evidence of population-specific effects. *Arthritis Rheum* 2004; 50:2590–2597.
- 27 Gafney PM, Ortmann WA, Selby SA, Shark KB, et al. Genome screening in human systemic lupus erythematosus: results from a second Minnesota cohort and combined analysis of 187 sib-pair families. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 547-556.
- 28 Gomez LM, Anaya JM, Gonzalez CI, Pineda-Tamayo R, Otero W, Arango A et al. PTPN22 C1858T polymorphism in Colombian patients with autoimmune disease. *Genes Immun* 2005; 6:628631.
- 29 Gonzalo A, Matesanz R, Teruel JL, Ortuno J. Incidence of membranoproliferative glomerulonephritis in a Spanish population. *Clin Nephrol* 1986; 26:161.
- 30 Graham RR, Kozyrev S, Baechler S, Reddy MV, Plenge RM, Bauer JW et al. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2006;10:1038-1782.
- 31 Graham RR, Langefeld CD, Gaffney PM, Ortmann WA, et al. Genetic linkage and transmission disequilibrium of marker haplotypes at chromosome 1q41 in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res* 2001; 3:299-305.
- 32 Grammer AC, Dorner T, Lipsky PE. *Mol Pathol Autoimmune Dis* 2001; 2:282-318.
- 33 Gray-McGuire C, Moser KL, Gaffney PM, et al. Genome scan of human systemic lupus erythematosus by regression modeling: evidence of linkage and epistasis at 4p16-15.2. *Am J Hum Genet* 2000; 67:1460-1469.
- 34 Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI, et al. A common haplotype in the complement regulatory

- gene factor H (HF1/CFH) predisposes individual to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:7227-7232.
- 35 Hochberg MC. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. 1997 In Dubois' Lupus Erythematosus, DJ Wallace and BH Hahn, eds, (Baltimore: Williams and Wilkins).
  - 36 Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:7276-7280.
  - 37 Holmskov US, Thiel, and Jensenius J C. Collectins and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immuno* 2003; 21:547.
  - 38 Johanneson BO, Lima G, von Salomé J, Alarcón Segovia, et al. A major susceptibility locus for systemic lupus erythematosus maps to chromosome 1q31. *Am J Hum Genet* 2002; 71:1060-1071.
  - 39 Johansson M, Arlesting L, Moller B, Rantapaa-Dahlqvist S. Association of a PDCD1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52:1665-1669.
  - 40 Jokiranta TS, Hellwage J, Koistinen V, Zipfel PF, Meri S: Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b. *J Biol Chem* 2000; 275: 27657-27662.
  - 41 Kanemitsu S, Takabayashi A, Sasaki Y, et al. Association of interleukin-4 receptor and interleukin-4 promoter gene polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1298-300.
  - 42 Karassa FB, Trikalinos Ta, Ioannidis JP. FcγRIIa-SLE Meta-Analysis Investigators. Role of the FcγRIIa polymorphisms in susceptibility to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:1563-1571.
  - 43 Kaufman KM, Kelly JA, Herring BJ, Adler AJ, Glen SB, Namjou B *et al.* Evaluation of the genetic association of the PTPN22 R620W polymorphism in familial and sporadic systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2533-2540.
  - 44 Klein-Gitelman M, Reiff A, Silverman. Systemic lupus erythematosus in childhood. *Rheum Dis Clin North Am* 2002; 28: 561-577.
  - 45 Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VE, et al. Genetic association of the R620W C/T polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet* 2004; 75:504-507.
  - 46 Lang BA, Silverman ED. A Clinical Overview of Systemic Lupus Erythematosus in Childhood. *Pediatrics in Review* 1993; 14:194-201.

- 47 Lazarus M, Hajeer AH, Turner D, et al. Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1997; 24:2314-2317.
- 48 Lee YH, Harley JB, Nath SK. Meta-analysis of TNF- $\alpha$  promoter -308 A/G polymorphism and SLE susceptibility. *Eu J Hum Genet* 2006; 14:364-371.
- 49 Lee YJ, Shin KS, Kang SW, Lee CK, Yoo B, Cha HS, E M Koh, et al. Association of the oestrogen receptor  $\alpha$  gene polymorphisms with disease onset in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1244-1249.
- 50 Liao CH, Yao TC, Chung HT, See LC, HUo ML, Huang JL. Polymorphisms in the promoter region of RANTES and the Regulatory Region of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Among Chinese Children with Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol* 2004; 10:2062-2067.
- 51 Lindqvist AK, Steinsson K, Johanneson B, et al. A susceptibility locus for human systemic lupus erythematosus (Hsle1) on chromosome 2q. *J Autoimmun* 2000; 14:169-178.
- 52 Lipsky PE. Systemic Lupus Erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nature Immunology* 2001; 2:764-766.
- 53 Lu JC, Teh U, Kishore KB. Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochim Biophys Acta* 2002;1572: 387.
- 54 Luna Arias JP, Orozco E, La Frontera Genética Molecular de la Enfermedad Tomol, Instituto Politecnico Nacional. 2004
- 55 Manderson AP, Botto M, Walport MJ. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:431-456.
- 56 Matsushita M and Fujita T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J. Exp Med* 1992;176:1497.
- 57 Moreno Rodríguez J. Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad. Ed. Limusa. Noriega de México 1996.
- 58 Moser KL, Gray-MCGuire C, Kelly J, et al. Confirmation of genetic linkage between human systemic lupus erythematosus and chromosome 1q41. *Arthritis Rheum.* 1999; 42:1902-907.
- 59 Neth ODL, Jack AW, Dodds H, Holzel NJ, Klein, Turner MW. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect Immun* 2000; 68:688.
- 60 Orozco G, Sanchez E, Gonzalez-Gay MA, Lopez-Nevot MA, Torres B, Caliz R, et al. Association of a functional single-nucleotide

- polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2192-224.
- 61 Palucka AK, Ueno H, Connolly J, Kerneis-Norvell F, Blanck JP, Johnston DA, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell Immunity. *J Immunother* 2006; 29: 545-557.
  - 62 Pangburn M, Atkinson M, Meri S; Localization of the heparin-binding site domains on complement factor H. *J Biol Chem* 1991;266:16847-16853.
  - 63 Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nature Genet* 2002; 32:666-669.
  - 64 Prokunina L, Gunnarsson I, Sturfelt G, Truedsson L, Seligman VA, Olson JL, et al. The systemic lupus erythematosus-associated PDCD1 polymorphism PD1.3A in lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50:327-328.
  - 65 Reddy MV, JohanM, Sturfelt G, Jonsen A, Gunnarsson I, Svenungsson E, et al. The R620W C/T polymorphism of the gene PTPN22 is associated with SLE independently of the association of PDCD1. *Genes Immun* 2005; 6:658-662.
  - 66 Ripoché J, Day A, Harris J, Sim R. The complete amino acid sequence of human complement factor H. *Biochem J* 1988;249: 593-602.
  - 67 Risch N, Merikangas K. The future of genetic Studies of Complex Human Diseases. *Science* 1996; 273:1516-1517.
  - 68 Risch N. Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. *Am J Hum Genet* 1987; 40:1-14.
  - 69 Rönnblom L, Alm GV. Systemic lupus erythematosus and the type I interferon system. *Arthritis Res Ther* 2003; 5:68-75.
  - 70 Rossi VS, Cseh I, Bally NM, Thielens JC, Jensenius, Arlaud GJ. Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. *J Biol Chem* 2001; 276: 40880.
  - 71 Rovin BH, Lu L, Zhang X. A novel interleukin-8 polymorphisms is associated with severe systemic lupus erythematosus nephritis. *Kidney Int* 2002; 62:261-5.
  - 72 Salmon JE, Pricop L. Human receptors for immunoglobulin G: key elements in the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 2001; 44:739-750.

- 73 Sanger FR, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:5463-5467
- 74 Sastry K, Herman GA, Day L, et al. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and its localitation to chromosome 10. *J Exp Med* 1989; 170:1175-89.
- 75 Selgiman VA, Suarez C, Lum R, Inda SE, et al. The Fc $\gamma$ IIIa -158F allele is a major risk factor for the development of lupus nephritis among Caucasians but not non-Caucasians. *Arthritis Rheum* 2001; 44:618-625.
- 76 Senna ER, de Barros ALP, Silva EO, Costa IF, Pereira LVB, Ciconelli RM, et al. Prevalence of rheumatic disease in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol* 2004; 31:594-597.
- 77 Shai R, Quismorio FP, Junior JR, Li L, Kwon OJ, et al. Genome-wide screen for systemic lupus erythematosus susceptibility genes in multiplex families. *Hum Mol Genet* 1999; 8:639-644.
- 78 Sharma A, Pangburn M. Identification of three physically and functionally distinct binding sites for C3b in human complement factor H by deletion mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:10996-11001.
- 79 Sigurdsson S, Nordmark G, Görin HHH, Lindroos K, Wiman AC, Sturfelt G, et al. Polymorphisms in the tyrosine cinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 528-537.
- 80 Spielman RS, Ewens WJ. The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 983-989.
- 81 Sullivan KE, Kim NA, Goldman D, Petri MA. C4A deficiency due to a 2 bp insertion is increased in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1999; 26:2144-2147.
- 82 Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthrit Rheum*1982; 25:1271-1277.
- 83 Thiel ST, Vorup-Jensen CM, Stover W, Schwaeble SB, Laursen K, Poulsen AC, Willis P, Eggleton S, Hansen U, Holmskov KBM, Reid JC. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature* 1997; 386: 506.
- 84 Tsao BP, Grossman JM, Kim SK, Wallas DJ, et al. Linkage and interaction of loci on 1q23 and IBD1 may contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus (SLE). *Am J Hum Genet Suppl* 2001; 69:2024.

- 85 Tsao BP. The genetics of human lupus. In Duboi's Lupus erythematosus. Edited by Wallace DJ, Hahn BH. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins 2002:97-120.
- 86 Turner MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immuno Today* 1996; 17:532.
- 87 Velaga MR, Wilson V, Jennings CE, Owen CJ, Herington S, Donaldson PT et al. The codon 620 thryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5862-5865
- 88 Velázquez-Cruz R, Lorena Orozco, Francisco Espinosa Rosales, Norma D López Lara, Gerardo Jimenez-Sanchez, Vicente Baca Ruiz. Association of PDCD1 polymorphisms with childhood-onset systemic Lupus Erythematosus. *Eur J Hum Genet* 2007,15(3):336-41.
- 89 Viken MK, Amundsen SS, Kvien TK, Boberg KM, Gilboe IM, Lilleby V. et al. Association analysis of the 1858C> T polymorphism in the PTPN22 gene in juvenile idiopathic arthritis and other autoimmune diseases. *Genes Immun* 2005; 6: 271-273.
- 90 Vorup-Jensen TSV, Petersen A, Hansen K, Poulsen W, Schwaeble RB, Sim KBM, Reid SJ, Davis S, JenseniusJC. Distinct pathways of mannan binding lectin (MBL)- and C1-complex autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL-associated serine protease-2. *J Immunol* 2000; 165:2093.
- 91 Vyse T.J. Todd J.A. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* 1996; 85: 311-318
- 92 Vyse TJ, Todd JA. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* 1996; 85:311-318.
- 93 Wakeland EK, Liu K, Graham RR, Behrens TW. Delineating the Genetic Basis of Systemic Lupus Eryhematosus. *Immunity* 2001; 15:397-408.
- 94 Walport MJ. Complement-first of two parts. *New Engl J Med* 2001; 344:1058-1066.
- 95 Walport MJ. Complement-second of two parts. *New Engl J Med* 2001; 344: 1140-1144.
- 96 Zuñiga R, Ng S, Peterson MGE, Reveille JD, et al. Low-binding alleles of Fc $\gamma$  receptor types IIA and IIIA are inherited independently and are associated with systemic lupus erythematosus in Hispanic patients. *Arthritis Rheum* 2001; 44:361-367.

## Anexo 1

### I. EXTRACCIÓN DE DNA. Técnica convencional

1. Las muestras de sangre periférica se colectaron en tubos vacutainer con EDTA
2. Centrifugar a 2,500 rpm durante 20 minutos (separando eritrocitos leucocitos y plasma)
3. Separar el paquete de células blancas (leucocitos) que se encuentran entre el plasma y los eritrocitos, con la ayuda de una pipeta Pasteur, "levántandola completamente"
4. Vaciar a un tubo estéril previamente etiquetado y resuspender en 6 ml de buffer RCLB, agitando con vortex, (lavado para eliminar eritrocitos que hayan quedado en la muestra)
5. Centrifugar a 2,500 rpm durante 10 minutos, (Para separar los leucocitos de otros componentes)
6. Descartar el líquido y resuspender el botón del fondo en 6 ml de buffer RCBL, agitar el tubo
7. Centrifugar a 2,500 rpm durante 10 minutos
8. Descartar nuevamente el líquido y resuspender el botón en 2 ml. de buffer WCLB agitando con el vortex (éste buffre rompe las membranas de las células blancas y de los organelos dejando que se libere el ADN, tapando el tubo con parafilm)
9. Añadir proteínasa K, e incubar a 42°C en baño María durante toda la noche, (para que la proteínasa K degrade la proteínas)
10. Agregar 2 ml de fenol (pH>7.6) amortiguado con buffer (tris 1M) a cada tubo (evitando tocar el tubo con la pipeta para que el reactivo no se contamine). Tapar con tapones de goma y agitar con vortex durante 20 segundos, posteriormente agitar suavemente durante 10 minutos.
11. Centrifugar a 2,500 rpm durante 10 minutos (quitar el tapón, evitando desperdiciar ADN)
12. Pasar la fase acuosa (transparente) a un tubo etiquetado y estéril evitando remover la fase intermedia (proteíca) con ayuda de una pipeta Pasteur, "sí esta fase se pone viscosa y blanca ponerla a baño María para que se caliente y sea más fácil remover"
13. Agregar a cada tubo 1 ml de fenol (pH>7.6) amortiguado con Tris 1M y 1 ml de cloroformo,"tapar el tubo usando un tapón de goma evitando desperdiciar la muestra"
14. Centrifugar a 2,500 rpm durante 10 minutos

15. Extraer la fase acuosa procurando no remover la interfase (proteinasas K) y ponerla en un tubo estéril y etiquetado
16. Agregar 2 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo y agitarse suavemente durante 10 minutos, "tapando los tubos con tapon de goma"
17. Centrifugar a 2,500 rpm durante 10 minutos
18. Extraer la fase acuosa con una pipeta Pasteur sin remover la fase intermedia y vaciar en un tubo estéril etiquetado
19. agregar 60  $\mu$ l de NaCl 1M y 6 ml de etanol, agitar suavemente (se ve la formación de hebras de ADN, no agitar demasiado para evitar que el ADN se enrede o compacte demasiado)
20. Tomar el ADN con una pipeta Pasteur, la cual tendrá la punta como gancho, (previamente etiquetada), una para cada muestra, dejar secar el ADN
21. Lavar la muestra en 1 ml de etanol al 70% (solo metiendo y sacando el gancho, aproximadamente 5 veces), dejar secar para que el etanol se evapore, entre mas se evapore "mejor"
22. Colocar la muestra en un tubo eppendorf con 200 ml de TE, desenredando la muestra con cuidado
23. Cuantificar la muestra de ADN, para realizar las diluciones correspondientes a las concentraciones necesarias.



**Kopias Bond**

TESIS

IMPRESIONES B/N Y COLOR, ENCUADERNADO,  
INTERNET, COPIAS

Odontología No. 80-A, Col. Copilco Universidad  
C.P.04360, México, D.F.

Tel. 55 54 56 23

E-mail [kopiasbond@yahoo.com.mx](mailto:kopiasbond@yahoo.com.mx)