



POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

***"IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES DE
RESPUESTA INMUNE E INFLAMATORIA Y SU ASOCIACIÓN
CON ARTRITIS REUMATOIDE JUVENIL"***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

p R E S E N T A

Biol. Exp. Julian Ramírez Bello

TUTOR

DRA. LORENA OROZCO OROZCO

CO-TUTOR

DR. VICENTE BACA RUÍZ

ASESOR

DR. HUMBERTO NICOLINI

México, D.F.

Febrero 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 ©

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.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genómica de Enfermedades Multifactoriales del Instituto Nacional de Medicina Genómica, SS., 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 general de la Dra. Lorena Orozco Orozco Investigadora del INMEGEN y el Dr. Vicente Baca Ruíz Jefe del Departamento de Reumatología e Inmunología del CMNSXXI, además de la asesoría del Dr. Humberto Nicolini Profesor de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM).

Mención especial merece todo el apoyo académico que mis profesores me otorgaron, así como el apoyo económico que me otorgó la UACM durante mis estudios de maestría. No hay otras palabras más que decir ¡Gracias!

DEDICADO A:

Mi esposa Tania Nallely García Morales.

Porque gracias a su paciencia y apoyo me he podido superar en todos los proyectos de mi vida, además de los académicos que me he propuesto. Por amarme con todas sus fuerzas y por dejarme ser lo que quiero en la vida. Por estar en los buenos y malos momentos de la vida a mi lado.

A mi adorada hija Estéfany Eurídice.

Porque no hay ser más maravilloso en este mundo que inspire en la vida que un hijo y que gracias a sus sonrisas que me regala día a día he podido superarme en todos los aspectos de mi vida. Pues DIOS la puso en mi vida como el mejor motor, gracias a esa inspiración que ella me provoca he buscado un futuro mejor.

A mi madre.

Porque en cada momento y cada palabra me <lió y sigue dando lo mejor de sí, y porque gracias a ella tengo vida. Gracias le doy porque siempre me oriento y aconsejó seguir adelante.

A mi padre.

Por ser un excelente amigo y porque siempre recibí el mejor de los consejos y ejemplos. Porque en cada palabra es para apoyarme y darme ánimos en la vida.

A mis pacientes.

Porque desafortunadamente han sido mi razón para ser un profesional

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lorena

Por creer en mí como persona y como investigador, por compartir con ella su espacio y amplia experiencia junto con sus conocimientos. Porque me ha dejado crecer al lado de ella y por permitirme conseguir cada uno de mis sueños. Por ser una excelente maestra.

Al Dr. Vicente Baca

Por aceptarme como su estudiante y porque gracias a sus enseñanzas y consejos he podido superarme en el aspecto personal y académico. Gracias por permitirme ser su colaborador en este trabajo y por confiar en mí a sus pacientitos.

Al Dr. Humberto Nicolini

Porque me acepto como su estudiante. Por su apoyo, ya que cada vez que le pedí un consejo nunca lo negó, por compartir parte de su tiempo conmigo.

A la Dra. Esther Orozco

Por ser una excelente persona y porque siempre está dispuesta a escuchar y ayudar a quien se lo pida, porque nunca se cansa en impulsar a los estudiantes e investigadores.

A la Dra. Rosa María del Carmen

Porque siempre me ha orientado en esta difícil carrera de la ciencia, porque en todo momento estuvo dispuesta a escucharme y a darme consejos para mi superación académica.

A mis amigos de laboratorio

A mis amigas Yolanda, Silvia, Guadalupe y amigos Rafael, Emilio porque a pesar de todo me siguen aguantando en todas mis locuras y chistes, por su gran apoyo recibido siempre y en cualquier momento. Y por el gran apoyo académico que he recibido de cada uno de ellos. Por ser un pilar importante en mi formación profesional.

A mis profesores de la universidad

Porque por medio de cada uno de ellos he obtenido diversas enseñanzas y consejos y gracias a ellos también he alcanzado una de mis metas principales en el aspecto académico.

A mis compañeros de generación de maestría

Porque me soportaron durante mucho tiempo, por cruzarse un tiempo en mi camino: Mauro, Jorge, Lupita.

A los estudiantes

A Erika por confiar en mí como profesor y asesor de Tesina y Servicio Social, porque siempre estuvo dispuesta a colaborar conmigo en el trabajo de investigación.

INDICE	PÁGINA
Dedicatoria -----	iii
Agradecimientos -----	iv
Abreviaturas -----	viii
Lista de Figuras -----	x
Lista de tablas -----	x n
Resumen -----	1
I Introducción -----	3
I.2.1 Artritis reumatoide juvenil -----	3
I.2.2 Prevalencia e incidencia de la ARJ -----	3
I.2.3 Clasificación de la ARJ -----	4
I.2.4 El Colegio americano de reumatología -----	5
I.2.5 Subtipos de la ARJ de acuerdo a los criterios de la CAR -	5
I.2.6 Etiología y patofisiología de la ARJ -----	8
I.2.7 La AR como enfermedad autoinmune -----	9
I.2.8 AR y autoinmunidad -----	10
I.2.9 La ARJ como ejemplo de enfermedad compleja -----	16
I.3.0 El componente genético en la ARJ -----	18
I.3.1 Evidencias de participación de factores genéticos en ARJ --	18
I.3.2 Estrategias para identificar factores genéticos -----	19
I.3.3 Estudios de ligamiento -----	19
I.3.4 Estudios de asociación -----	23
I.3.5 Causas de asociación -----	25
I.3.6 El genoma humano y los estudios de asociación -----	27
I.3.7 La importancia de los estudios genéticos con SNPs -----	27
I.3.8 Los SNPs en los estudios de ligamiento y asociación -----	28
I.3.9 Antecedentes de los genes estudiados -----	30
II. Justificación -----	44

III. Objetivos	
II.1 Objetivo general	45
II.2 Objetivos particulares	45
IV. Material y método	46
IV.1.1 Estrategia general	46
IV.1.2 Población de estudio	46
IV.1.3 Extracción de DNA de sangre periférica	46
IV.1.4 Repurificación de DNA de pacientes e individuos sanos	48
IV.1.5 Cuantificación del DNA	49
IV.1.6 Diluciones y producción de placas para Taqman	49
IV.1.7 PCR y discriminación alélica	50
IV.1.8 QUANTO: software para calcular el tamaño de muestra	53
IV.1.9 FINETTI: software que analiza el equilibrio de H - W	53
IV.2.0 Epi-Info e Epidat para estudios de casos y controles	54
V. Resultados	57
V.1.1 Estudio clínico	57
V.1.2 Número de pacientes analizados	58
V.1.3 Geles de agarosa para observar la integridad del DNA	60
V.1.4 SNPs analizados	62
V.1.6 Análisis de Equilibrio de Hardy - Weinberg	63
V.1.7 Análisis de los SNPs - 28, -109 y - 403 de <i>CCL5</i>	63
V.1.8 Análisis del SNP - 889 de <i>IL-1a</i>	69
V.1.9 Análisis del SNP - 62 de <i>IKBL</i>	71
V.2.0 Análisis del SNP 260 de <i>TAPBP</i>	73
VI. Discusión	75
VII. Conclusiones	83
VIII. Perspectivas	85
IX. Bibliografía	86
X. Apéndice de reactivos	101

ABREVIATURAS

a.a	Aminoácido
ANA	Anticuerpos antinucleares
Arg	Arginina
ARJ	Artritis reumatoide juvenil
CAR	Colegio Americano de Reumatología
CCLS	Lingando 5 con dos residuos de Cisteína
CCRS	Receptor 5 de CCLS
CPA	Célula presentadora de antígenos
CPH	Complejo principal de histocompatibilidad
CTLA4	Antígeno 4 de los linfocitos T citotóxico
DNA	Ácido desóxirribonucleico
EDTA	Ácido etilen - diaminotetracético
EULAR	Liga europea contra el reumatismo
Fe	Fracción cristizable de un anticuerpo
FR	Factor reumatoide
HLA	Antígeno leucocitario humano
IgM	Inmunoglobulina subtipo M
IL	Interleucina
ILAR	Liga internacional contra el reumatismo
IKBL	Proteína parecida al inhibidor kappa beta
IKBs	Inhibidores KP
IKKs	Cinasas de IKBs
IRF3	Factor regulador 3 del interferon
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INMEGEN	Instituto Nacional de Medicina Genómica
INFy	Interferon gama

INP	Instituto Nacional de Pediatría
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
NF- κ p	Factor nuclear kappa beta
RCB	Receptores de células B
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTPN22	Tirosin - fosfatasa 22
TAP	Proteína transportadora asociada al procesamiento de antígenos
TAPBP	Proteína de unión a TAP
TDI	Prueba de desequilibrio de transmisión
TE	Tris-EDTA
TGF-P	Factor de crecimiento transformante beta
Thr	treonina
TNF - α	Factor de necrosis tumoral alfa
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
STRs	Repeticiones cortas en tandem
UTR	Región no traducidas
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VNTRs	Repeticiones en tandem de número variable
AS	riesgo de recurrencia en hermanos

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1. Un paciente que muestra el subtipo pauciarticular -----	6
Figura 2. Un paciente que muestra al subtipo poliarticular -----	7
Figura 3. En unas gemelas, una de ellas presenta el subtipo sistémico ----	7
Figura 4. Modelo de auto-perpetuación de los linfocitos B autoreactivos --	11
Figura 5. Hipótesis de los linfocitos T autoreactivos en autoinmunidad -----	12
Figura 6. Las células NK en la regulación de los linfocitos T autoreactivos ---	13
Figura 7. Síntesis de moléculas pro e inflamatorias en la membrana sinovial -	15
Figura 8. Análisis de ligamiento en familias -----	23
Figura 9. Prueba de desequilibrio de transmisión -----	25
Figura 10. Análisis de ligamiento y asociación con SNPs o STRs ---	26
Figura 11. Los SNPs en el genoma humano --- -----	28
Figura 12. Estructura y función de la IL-1a en la señalización celular ---	31
Figura 13. Composición genética y ubicación genómica de la IL-1a -----	32
Figura 14. Funciones de las quimiocinas en el sistema inmune ----	34
Figura 15. Cambio morfológico de neutrófilos por acción quimiotáctico -	34
Figura 16. El RNAm y la proteína CCLS se expresa en pacientes con ARJ-	35
Figura 17. Representación de una secuencia del promotor de <i>CCLS</i> -----	36
Figura 18. Análisis funcional de los SNPs- 28 C/G y-403 G/A de <i>CCLS</i> -	37

Figura 19. Regulación de la actividad de NF - κ - - - - -	39
Figura 20. Procesamiento de antígenos en CPAs y función de TAPBP ----	42
Figura 21. Distribución de genotipos en el plot de PCR en tiempo real ---	52
Figura 22. Imagen que muestra el logotipo de Epi-Info - - - - -	55
Figura 23. Imagen que muestra el logotipo de Epidat -----	55
Figura 24. Representación esquemática de la estrategia experimental - - -	56
Figura 25. Gráfica del número de individuos afectados con ARJ - - -	58
Figura 26. Gráfica que representación el número de controles -----	58
Figura 27. Gráfica que representa la toma de pacientes por Institución -	59
Figura 28. Integridad del DNA diluido de 4 pacientes - - - - -	60
Figura 29. Integridad del DNA de pacientes colectados en 1999 - - -	60
Figura 30. Integridad del DNA repurificado de muestras de 1999 - - -	61
Figura 31. Integridad del DNA de 4 pacientes colectados en 2006 - - -	61
Figura 32. Gráfica de haplotipos de susceptibilidad a ARJ - - - - -	69

LISTA DE TABLAS

PÁGINA

Tabla 1. Incidencias y prevalencias de la ARJ en diferentes poblaciones - - -	3
Tabla 2. Sistemas de clasificación para las artritis crónicas en niños -----	4
Tabla 3. Características clínicas de los subtipos de artritis de acuerdo al CAR -----	8
Tabla 4. Moléculas efectoras liberadas por fibroblastos de la membrana sinovial - -	16
Tabla 5. Características de enfermedades multifactoriales - - - - - - - - -	17
Tabla 6. Tabla de contingencia de 2 X 2 en los estudios de asociación -----	24
Tabla 7. Ejemplo de análisis de equilibrio de Hardy- Weinberg por FINETII--	54
Tabla 8. SNPs analizados en el presente estudio - - - - - - - - -	62
Tabla 9. Análisis alélico y de genotipos del SNP - 28 C/G de CCLS -----	64
Tabla 10. Análisis alélico y de genotipos del SNP- 403 G/ A de CCLS -----	65
Tabla 11. Análisis alélico y de genotipos del SNP-109 T/C de CCLS -----	67
Tabla 12. Identificación de haplotipos de CCLS -----	68
Tabla 13. Análisis alélico y de genotipos del SNP - 889 T/ C de IL-1a -----	70
Tabla 14. Análisis alélica y genotípica del SNP - 889 T/C de IL-1a en mujeres -	70
Tabla 15. Análisis alélica y genotípica del SNP - 889 T/ C de IL-1a en hombres -	71
Tabla 16. Análisis alélica y genotípica del SNP - 62 T/ A de ILKBL - - - -	72
Tabla 17. Análisis alélica y genotípica del SNP - 62 T/ A de ILKBL en hombres -	73
Tabla 18. Análisis alélica y genotípica del SNP 260 C/G de TAPBP - - - -	74

RESUMEN

La artritis reumatoide juvenil (ARJ) es la artropatía crónica más frecuente en niños, se caracteriza por inflamación, dolor, hinchazón y rigidez de las articulaciones sinoviales provocando a la larga discapacidad para realizar movimientos. La ARJ es una enfermedad autoinmune en donde el sistema inmune del individuo se encuentra anormalmente regulado, en muchos casos la participación anormal de pequeñas proteínas y solubles denominadas citocinas producen la destrucción del cartílago articular del hueso de los pacientes que tienen ARJ. Esta enfermedad representa aproximadamente el 0.1 % de todas las enfermedades en población general. En esta patología con etiología multifactorial se han identificado varios factores genéticos que representan riesgo a desarrollar ARJ en diversas poblaciones. En este estudio analizamos la participación de algunos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en genes candidatos involucrados en la susceptibilidad a desarrollar ARJ en población mexicana que previamente habían sido reportados como de susceptibilidad en otras poblaciones. Entre los SNPs analizados en este estudio estuvieron el - 889 T/ C del gert de *IL-1a*, - 28 C/G, -109 G/ A y - 403 G/ A de *Rantes* o *CCL5*, - 62 T/ A de *IKBL* y el 260 C/G de del gen *TAPBP*. Nuestros resultados sugieren que los tres SNPs analizados de *RANTES* no tienen relevancia en la susceptibilidad a la ARJ, sin embargo encontramos una co-ocurrencia entre la enfermedad y el SNP - 889 T/ C del gen *IL-1a* (OR: 0.47, IC 95% 0.22 - 0.99, X^2 : 4.00, $p = 0.045$) así como también con el SNP - 62 T/ A del gen *IKBL* (OR: 0.70, IC 95% 0.52-0.93, X^2 : 5.89, $p = 0.015$) sin embargo en nuestra población estos SNPs mostraron protección y no susceptibilidad como previamente habían sido reportados, de hecho cuando se corrigió en valor de p obtenido de la distribución del genotipo C/C vs C/T entre casos con ARJ y los controles se perdió la asociación con el SNP - 889 T/ C del gen *IL-1a*, este resultado

es por demás interesante, ya que esto quiere decir que la distribución alélica de este y otros polimorfismos es diferente a las poblaciones que han asociado este polimorfismo a susceptibilidad, finalmente el SNP no sinónimo 260 C/G, donde hay un cambio de aminoácido treonina por arginina ubicado en la región codificante (exon 4) del gen *TAPBP* mostró diferencias estadísticamente significativas entre casos con ARJ y controles (OR: 1.42, IC 9% 1.06-1.89, X^2 : 5.71, $p = 0.016$). Actualmente no se conoce como afecta el cambio de aminoácido a la función de la proteína TAPBP, sin embargo es probable que altere algunos procesos de la respuesta inmune, de hecho los autores que encontraron asociado este SNP con la enfermedad sugieren que este polimorfismo se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el verdadero SNPs que causa la enfermedad a artritis. Podemos entonces decir que estos SNPs asociados con ARJ son importantes en la etiopatología de la artritis reumatoide juvenil de la población pediátrica mexicana.

Introducción

La artritis reumatoide juvenil (ARJ) representa a la artropatía autoinmune más común de la infancia, se caracteriza por inflamación articular persistente de las membranas sinoviales, dolor, rigidez y en muchas ocasiones incapacidad para realizar movimientos ¹. Durante el transcurso de esta patología se van destruyendo progresivamente las articulaciones debido a procesos inflamatorios desregulados, sin embargo la enfermedad se puede presentar con una expresividad muy variable, es decir puede ir desde formas muy leves hasta muy graves ². El diagnóstico clínico se realiza en niños menores de 16 años de edad que presentan inflamación de las articulaciones por lo menos durante seis semanas. La incidencia de la enfermedad varía mucho de una población a otra, pero en general se presenta entre 10 a 23 por cada 100,000 niños (tabla 1), mientras que su prevalencia es de 8 a 150 por cada 100,000 niños ³. Aunque no existen muchos estudios sobre la prevalencia de la enfermedad, en población Finlandesa se ha estimado ser de aproximadamente el 0.1 % ⁴.

Tabla 1. Incidencias y prevalencias de la ARJ en diferentes poblaciones ³

Autores	País	Incidencia No./100,000	Prevalencia no./100,000
Fujikawa y Okuni, 1997	Japón	0.83	* NR
Kaipianen Seppanen, 1995	Finlandia	195	* NR
Moe y Rygg, 1998	Noruega	226	148.1
Ozen, 1998	Turkía	* NR	64
Kiessling, et al. 1988	Alemania	3.5	20
Manners and Diapevven 1998	Australia	* NR	400
Arguedas, 1998	Costa Rica	68	34.9
Peterson, et al, 1993	USA	11.7	86.1

NR. No Reportado

Clasificación de la artritis reumatoide juvenil

Actualmente existen tres escuelas o asociaciones que se emplean para clasificar a niños menores a 16 años con artritis reumatoide crónica: el Colegio Americano de Reumatología (ACR por sus siglas en inglés) ⁵, la Asociación Europea Contra el Reumatismo (EULAR) ⁶ y la Asociación Internacional Contra el Reumatismo (ILAR) ⁷ (tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de los tres sistemas para las artritis crónicas en niños ⁶

ACR (1997) JRA	EULAR (1978) JCA	ILAR (1997) JIA
Sistémica	Sistémica	Sistémica
Poliarticular	Poliarticular	Poliarticular RF-negativo
Pauciarticular	JRA	Poliarticular RF-positivo
	Pauciarticular	Pauciarticular: persistente
	Artritis con	extendida
	psoriasis	Artritis relacionada con psoriasis
		Artritis relacionada con entesitis
		Otras

Según diferentes consensos sobre la clasificación de la artritis crónica juvenil es posible emplear cualquiera de las tres formas de clasificación de la artritis infantil crónica.

El Colegio Americano de Reumatología

La propuesta del ACR es un excelente criterio de clasificación de la ARJ, ésta la define como artritis juvenil persistente en una o más articulaciones con una evolución no menor a seis semanas, los subtipos de la enfermedad son definidos por los síntomas clínicos que se presentan en los primeros seis meses de evolución. El curso clínico de la ARJ es definido por lo que pasa después de los primeros seis meses de enfermedad ⁵

Subtipos de artritis reumatoide juvenil de acuerdo a los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología.

Los tres principales subtipos de la ARJ están basados en los síntomas clínicos de la enfermedad y se dividen en a) pauciarticular u oligoarticular, b) poliarticular y c) sistémica. Al_{gun}os investigadores frecuentemente dividen a los subtipos pauciarticular y poliarticular en dos subgrupos cada una (tabla 3) ⁸

La base de datos de 800 enfermedades reumáticas en niños que se encuentra en la Universidad de UTA sugiere que el subtipo más común es el oligoarticular o pauciarticular con aproximadamente el 55% de todos los casos, este subtipo es diagnosticado en pacientes que tienen menos de cinco articulaciones inflamadas durante los primeros seis meses de evolución (figura 1). Los individuos afectados con este subtipo generalmente presentan inflamación de las articulaciones grandes de las extremidades inferiores como las rodillas y tobillos, un porcentaje importante de estos individuos con ARJ pauciarticular sintetizan anticuerpos antinucleares (ANA) y la mayoría de ellos desarrollan uveitis, la cual es el principal problema clínico serio. El segundo subtipo es el poliarticular y representa aproximadamente el 32% de todos los casos, este subtipo se caracteriza por inflamación en más de cinco articulaciones dentro los primeros seis meses de evolución de la enfermedad (figura 2). Este subtipo incluye a pacientes con factor reumatoide (FR) positivo y negativo, ambas formas afectan principalmente a niñas.

Los pacientes seropositivos al FR frecuentemente desarrollan poliartritis tempranamente, mientras que los pacientes con FR negativo generalmente desarrollan la artritis tardíamente en la niñez y la adolescencia, los pacientes seronegativos al FR tienen un pronóstico variable. Este subtipo no tiene una gran asociación con el complejo principal de histocompatibilidad (CPH) o antígeno leucocitario humano (HLA en humanos). El tercer subtipo es el sistémico, este representa aproximadamente el 13% de los casos, además se ha reportado que no está asociado con la edad, género o HLA, entre las características clínicas que caracterizan a este subtipo se encuentran las manifestaciones extraarticulares como los picos altos de fiebre, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, serositis (figura 3)⁹¹⁰.

Se ha encontrado que los porcentajes en los tres subtipos de la ARJ son muy similares en niños de E.U.A., Canadá y Reino Unido¹¹. En nuestro país no se conoce la prevalencia de cada subtipo de la ARJ.



Figura 1. **Imagen que muestra el subtipo oligoarticular.** Este subtipo presenta inflamación de una articulación grande de la mano izquierda en una paciente con ARJ.



Figura 2. Imagen de un paciente con ARJ subtipo poliarticular. Este subtipo presenta inflamación de varias articulaciones, algunas veces la inflamación se presenta de forma simétrica.



Figura 3. Imagen que representa al subtipo sistémico. Este subtipo se caracteriza por manifestaciones extraarticulares.

Tabla 3. Características clínicas de los subtipos de artritis de acuerdo a los criterios del ACR

Subtipo	Sintomas clínicos	Subtipos	Características asociadas
Pauciarticular	afectación de 5 articulaciones o menos durante los primeros seis meses de la enfermedad	edad temprana	usualmente niñas, alta incidencia de uveítis crónica, anticuerpos antinuclear (ANA) positivos
		edad tardía	usualmente niños mayores a los 8 años, alta incidencia de sacrolitis HLA-B27 positivos
Poliarticular	afectación de 5 articulaciones o más durante los primeros seis meses de la enfermedad	factor reumatoide (-)	se presenta en las últimas etapas de la niñez
		factor reumatoide (+)	se presenta en las últimas etapas de la niñez, se parece a la AR de adultos
Sistémica	picos de fiebre alta manifestaciones extraarticulares	no aplicable	

Etiología y patofisiología de la ARJ

La etiología de esta enfermedad no está clara, aunque existen varias evidencias de un origen multifactorial o complejo, es decir, en esta patología se sugiere la participación de múltiples genes que tienen un pequeño efecto pero que de forma aditiva y junto con los factores de riesgo que se encuentran en el medio ambiente hacen que se desarrolle la ARJ ^{10,12}. Entre los genes que se han asociado en esta patología se encuentran varios involucrados en los mecanismos de inmunidad e inflamación. Existen algunos reportes que sugieren que los niveles hormonales anormales, trauma articular, infecciones virales o bacterianas, etc., están involucrados en la etiopatología. Varios estudios han implicado a la infección por el virus de la rubéola como un agente causal de la ARJ, debido a que este virus puede persistir en los linfocitos del tejido conectivo, se puede establecer un foco de infección en la membrana sinovial que da como resultado una inflamación crónica

13, sin embargo, estos resultados no se han podido reproducir en laboratorios de investigación 14.

La artritis reumatoide como enfermedad autoinmune

La ARJ es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por inflamación de la membrana sinovial de las articulaciones diartrosicas. En esta patología tanto las células del sistema inmune innato como adaptativo reacciona contra tejidos propios del individuo debido a una falla en la clonalidad de los linfocitos B y T, produciendo daño celular. En ARJ se han identificado clones de linfocitos autoreactivos que actúan contra las células de la membrana sinovial de las articulaciones ^{15,16}.

En condiciones normales las células presentadoras de antígenos profesionales (CPAs) como las células dendríticas pueden capturar a antígenos, procesarlos y presentarlos en su superficie, la células dendríticas tienen la capacidad de presentar antígenos tanto a las células T como a las B, esto es porque tienen en su superficie moléculas de HLA clase I y II. Cuando la célula dendrítica presenta el péptido que va unido al HLA clase I puede activar, diferenciar y proliferar a los linfocitos T CD 8⁺ citotóxicos los cuales van a destruir a las células infectadas con virus o donde se estén sintetizando proteínas virales, proteínas bacterianas intracelulares, etc. Por otra parte las células dendríticas sintetizan compuestos que actúan como coestimuladoras que sirven también para estimular la activación, maduración, diferenciación y proliferación de los linfocitos T CD 8⁺. De esta manera los linfocitos T van a sintetizar varias moléculas como las interleucinas (ILs), quimiocinas, etc., que están involucradas en procesos inflamatorios e inmunes.

Desde hace algún tiempo se conoce que anomalías genéticas en ciertas moléculas que codifican para el HLA están asociadas al desarrollo de la ARJ.

Moléculas de clase I como el HLA-A2 están asociadas a la aparición temprana del subtipo oligoarticular en niñas ¹⁷. El HLA-DRB1 *08 y *11, DQA1*04 Y *05, y DQB1 *04 están asociadas con el subtipo oligoarticular persistente, el HLA-DRB1 *08 confiere riesgo al subtipo poliarticular FR negativo, y el HLA-DRB1 *11 confiere riesgo al subtipo sistémico ¹⁸. A pesar de que el HLA se ha encontrado asociado a la ARJ se ha calculado en pares de hermanos afectados que los genes que codifican a moléculas del HLA sólo representan alrededor del 17 % de todos los genes que pueden estar involucrados en esta patología ¹⁸. Esto sugiere que otros loci que se encuentran fuera de la región de HLA están involucrados en el desarrollo de la ARJ. Estos genes que se encuentran fuera de la región del HLA tienen un papel importante en la respuesta inmune y autoinmunidad ¹⁹.

Artritis reumatoide y autoinmunidad

En el caso de la artritis reumatoide se han propuesto algunas hipótesis que tratan de explicar el origen de esta enfermedad autoinmune. Una de ellas propone que los linfocitos B autoreactivos pueden proporcionar señales para activar, estimular y perpetuar la activación de los linfocitos T CD4+, una molécula importante en esta hipótesis es la IgM que representa al FR, cuando el FR se une a un antígeno X (desconocido) hay una interacción antígeno-anticuerpo. La fracción cristalizable (Fc) del FR que es la región conservada del anticuerpo se puede unir a un receptor específico para la fracción cristalizable que se encuentra en las células B, esta interacción media la endocitosis del antígeno desconocido en el citoplasma de la célula B, entonces el antígeno es degradado y es presentado por el linfocito B mediante el CPH clase II, además junto con moléculas coestimuladoras producidas por los linfocitos B pueden disparar el proceso de activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos T CD4+, los cuales una vez activados sintetizan una gran cantidad de citocinas y quimiocinas que ayudan a perpetuar la activación de los linfocitos B autoreactivos (figura 4). Otra hipótesis propone que el FR puede

interaccionar con proteínas del complemento como la C3d, una vez que interacciona el FR/C3d, C3d puede unirse al receptor 2 del complemento y estimular a los linfocitos B autoreactivos a que produzcan moléculas coestimuladoras para la activación de los linfocitos T (figura 4) ²⁰.

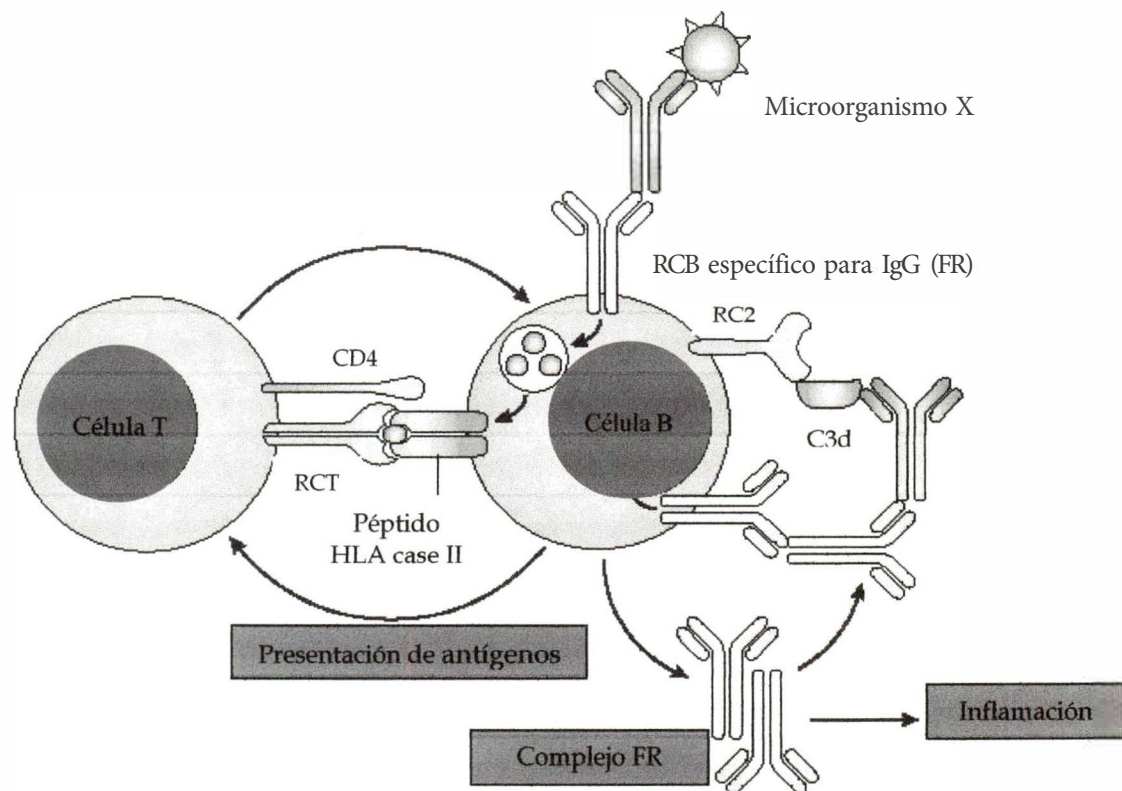


Figura 4. **Modelo de auto-perpetuación de los linfocitos B autoreactivos.** Posible papel de autoanticuerpos (FR) mediada por células B autoreactivas en la génesis de la AR.

Por otro lado, Fu-Dong Shi, y cols., plantearon otra hipótesis, en la cual los linfocitos T asesinos naturales (Natural Killer) y las células T autoreactivas tienen un papel fundamental en el desarrollo de enfermedades autoinmunes ²¹. Dicha hipótesis propone varios mecanismos por los cuales los linfocitos T NK pueden modular a los linfocitos T autoreactivos tanto para estimular su activación como su

inhibición. Entre las propuestas que implican a las células NK como parte fundamental en el desarrollo de la autoinmunidad, son las siguientes:

La primera: propone que las células NK pueden producir proteínas como citocinas y quimiocinas que determinan la diferenciación de las células T CD4⁺ vírgenes a células tipo T_{H1} o T_{H2} y de esta manera puede influir en el desarrollo de la respuesta autoinmune. Por ejemplo, el IFN γ y otras citocinas pueden regular a los linfocitos T CD4⁺ y diferenciarlos a células del tipo T_{H1}. Aquí se propone que las células T autoreactivas ya existen, la segunda: las células NK y las células presentadoras de antígenos (por ejemplo, las células dendríticas) pueden sinergizar con la ayuda de moléculas coestimuladoras sintetizadas por los linfocitos T NK y ayudar a la generación de linfocitos T autoreactivos, y la tercera) los linfocitos NK pueden promover directamente la generación de linfocitos T autoreactivos a través de moléculas coestimuladoras como OX40 o 2B4 (figura 5).

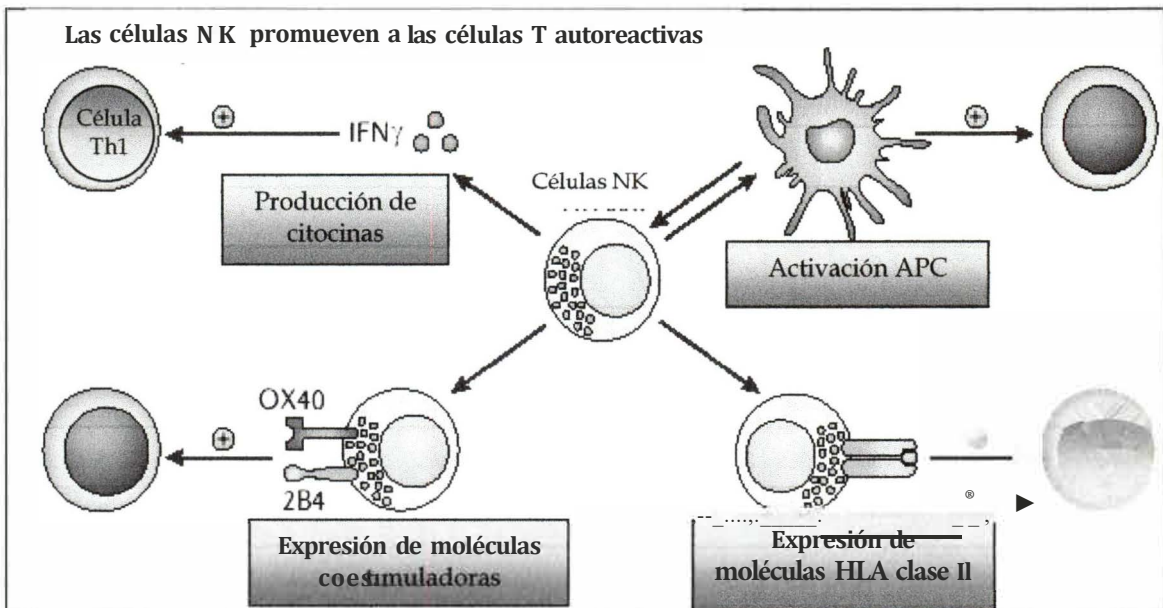


Figura 5. **Papel de los linfocitos T autoreactivos en la génesis de autoinmunidad.** Hipótesis que proponen que los linfocitos T autoreactivos en interacción con los linfocitos NK pueden desencadenar una respuesta autoinmune.

Se ha propuesto también que los linfocitos T NK pueden inhibir a los linfocitos T autoreactivos, los modelos experimentales han proporcionado cierta evidencia en donde los linfocitos T NK tienen un papel supresor en varias enfermedades autoinmunes, a pesar de existir estas evidencias, los mecanismos que regulan estos eventos son poco claros, aunque existen algunas evidencias que proponen lo siguiente; 1) los linfocitos T NK pueden lisar a las células dendríticas autólogas; 2) los linfocitos T NK pueden lisar a las células T autólogas; 3) las células NK pueden apagar la respuesta inmune mediada por células T mediante la síntesis de TGF-P y; 4) existen evidencias de que los linfocitos T en estado proliferativo se pueden unir a un gen supresor de tumor p21 e inhibir su activación (figura 6) ²⁰

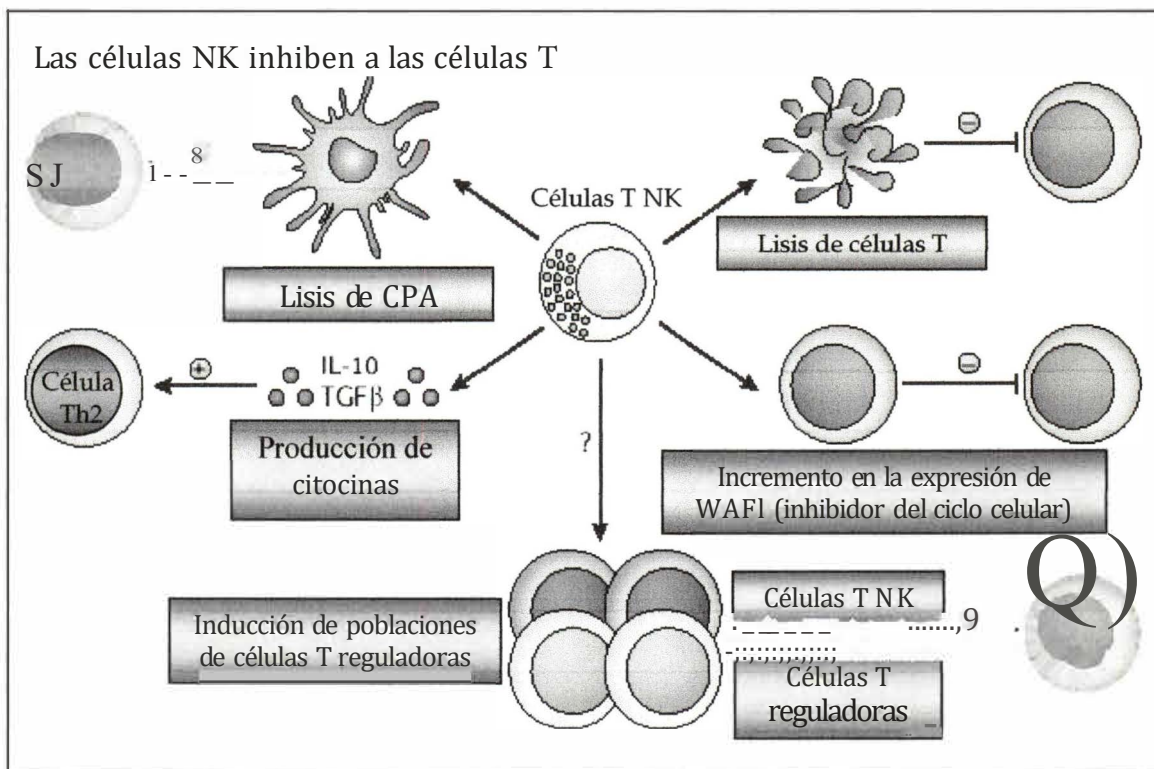


Figura 6. **Papel regulador de los linfocitos T NK en autoinmunidad.** Mecanismos propuestos por los cuales las células T NK pueden inhibir la activación de los linfocitos T autoreactivos.

Actualmente se conoce bien acerca de las moléculas sintetizadas por las células de la membrana sinovial inflamada que se encuentran en el líquido sinovial de individuos con artritis reumatoide juvenil (ver figura 7) ²². La membrana sinovial está compuesta por tejido conectivo y como cualquier tejido conectivo está formado por diferentes tipos de células como linfocitos B y T, macrófagos, adipocitos, fibroblastos, etc. Varias evidencias experimentales han sugerido que los fibroblastos juegan un papel fundamental en la producción de diferentes proteínas implicadas en la inflamación y destrucción del cartílago y el hueso.

Existen también evidencias de infiltración de linfocitos T, monocitos y fibroblastos a la membrana sinovial, sin embargo su papel en la sinovitis es controversial. Se ha observado que los fibroblastos en cultivo presentan propiedades muy interesantes como una alta velocidad de proliferación, pérdida de inhibición por contacto, expresión constitutiva de mRNA y proteínas, esas observaciones cambian la visión de que los fibroblastos sólo mediaban la reparación del tejido mediante señales suministradas por monocitos y linfocitos (tabla 4) ²³.

Por otro lado, se ha encontrado que también los linfocitos B juegan un papel importante en el desarrollo de la artritis, ya que cuando se inyecta un anticuerpo monoclonal dirigido contra una molécula de los linfocitos B (CD20) se reduce la síntesis de IL-1 β , INF γ , esto sugiere que las células B afectan la función de los linfocitos T y macrófagos los cuales pueden generar una respuesta inflamatoria en las articulaciones ²⁴.

Además de las células implicadas en el desarrollo de la autoinmunidad, algunas moléculas solubles como el TNF- α , IL-6, IL-1 β , proteína C reactiva juegan un papel clave en la destrucción de las articulaciones. Por ejemplo, el TNF- α y la IL-1 β

inducen la activación de enzimas que degradan la matriz extracelular, tales como las metaloproteasas ²².

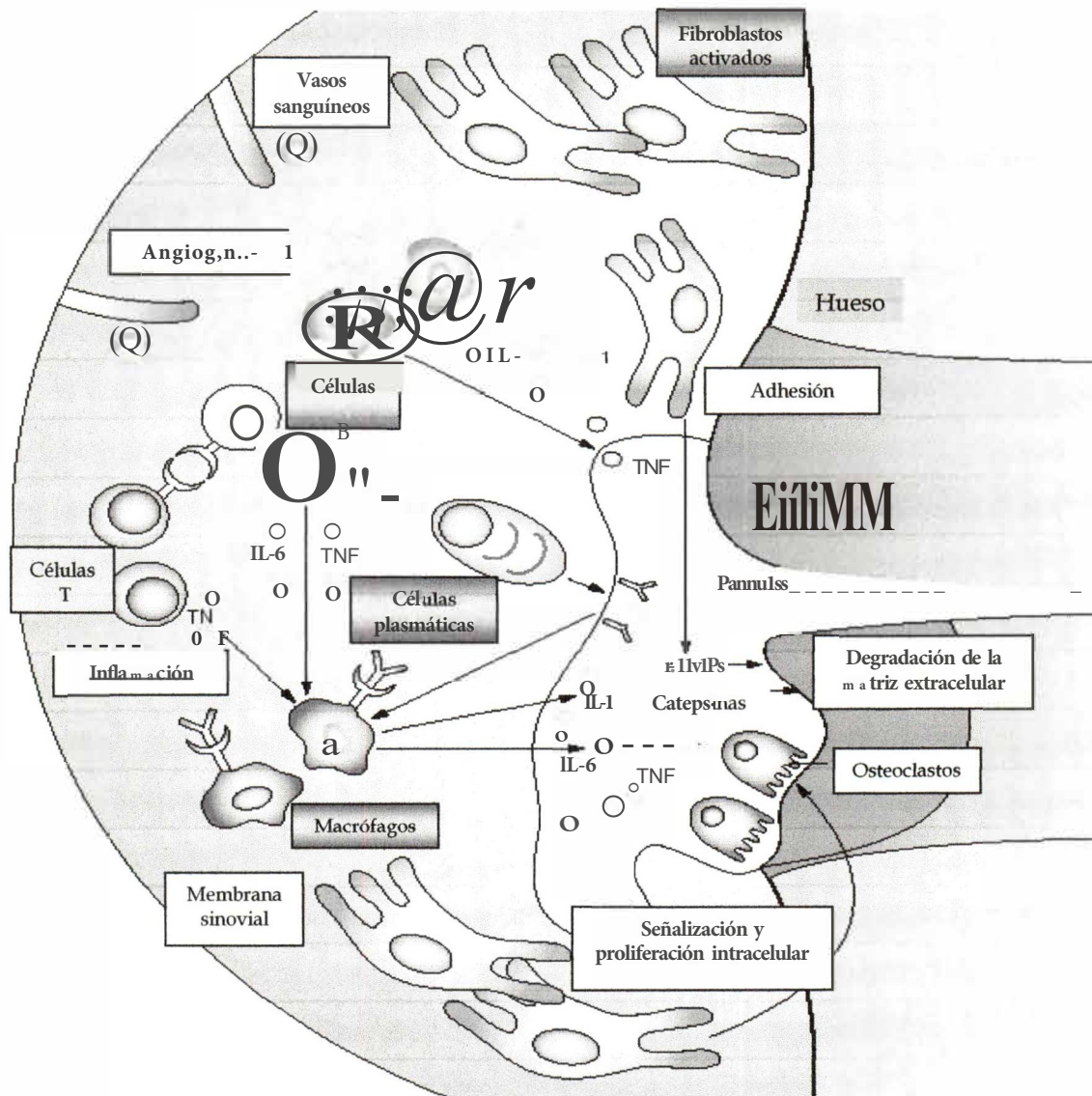


Figura 7. **Medio ambiente donde interactúan células y moléculas del sistema inmune.** Las células de la membrana sinovial tienen un papel fundamental en la génesis de moléculas proinflamatorias, angiogénesis y degradación de la matriz extracelular.

Tabla 4. Moléculas efectoras liberadas por fibroblastos de la membrana sinovial.

Moléculas efectoras	función
> IL-8, TGF- β , PDGF, GM-CSF, G-CSF, FGF, VEGF, EGF.	Angiogénesis
> IL-8, IL-16, MCP-1, MIP-1, MCP-1a	Quimiocinas
> IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-15, UF, PDGF, MIF, GM-CSF, TRX	Citocinas pro-inflamatorias
> p55 TNFR, p75 TNFR, IL-10	Citocinas anti-inflamatorias
> PGEi, colagenasa, estromelisina, gelatinasa De 92 kDa, catepsina B, L y K	Degradación de la matriz
> TIMP, TGF-B, IL-11	Inhibición de la degradación de la matriz
> RANKL, VEGF	Osteoclastogénesis
> TGF-B, BMP-2	Formación del hueso

La ARJ como ejemplo de enfermedad compleja o multifactorial.

La ARJ es una enfermedad compleja y de etiología multifactorial donde intervienen tanto los factores genéticos como ambientales para su desarrollo. Las enfermedades complejas a diferencia de las monogénicas o mendelianas no dependen de un solo gen para que desarrolle la enfermedad sino de varios genes (poligénica) que de forma aditiva interactúan y pueden producir ARJ, sólo que en estas enfermedades la contribución de cada alelo es frecuentemente pequeño y difícil de detectar.

Frecuentemente, los genes específicos involucrados en la patología pueden variar entre dos personas que sufren fenotipos similares, fenómeno denominado heterogeneidad del locus. Un factor adicional de confusión en el estudio de las enfermedades complejas es la expresividad variable. La expresividad variable se refiere a diferencias en la gravedad de la enfermedad en diferentes individuos con el mismo genotipo. Por otro lado los factores ambientales son muy importantes para que desarrolle la enfermedad, de hecho en algunos casos pueden causar fenocopias de una enfermedad. En el caso de las enfermedades complejas los genes involucrados en la enfermedad se denominan genes de susceptibilidad más que genes causales de enfermedad (tabla 5) ^{25,26},

Tabla 5. Características de enfermedades multifactoriales

Características	Descripción
Influencia multifactorial	Contribución genética y ambiental para el desarrollo de la enfermedad
Poligénica	El efecto de muchos genes contribuyen a la enfermedad
Heterogeneidad genética	Diferentes genes y diferentes alelos del mismo gen pueden contribuir al desarrollo de un mismo fenotipo
Heterogeneidad fenotípica	Gran variedad de fenotipos clínicos
Variabilidad de la enfermedad	La gravedad y por lo tanto el subtipo de la enfermedad puede variar entre los individuos

El componente genético en la ARJ

En 1897 Sir George Frederic Still's reconoció la heterogeneidad en la expresión clínica de la artritis, el la denominó como "una enfermedad crónica de las articulaciones que se presentaba en niños" ²⁷. Hasta ese momento no se conocía nada acerca del componente genético en la enfermedad. Al_{g_u} nos estudios más recientes han aportado evidencias de que los factores genéticos juegan un papel muy importante en el desarrollo de esta patología.

Estudios que evidencian la participación de los factores genéticos en la ARJ

Los estudios en gemelos y en familias han sido muy importantes para determinar el componente genético en la artritis reumatoide juvenil. Se ha demostrado una alta concordancia de la enfermedad en los gemelos monocigotos (MC) comparado con los gemelos dicigóticos (DC), estos datos dan evidencias de una base genética en la enfermedad ⁹. Se ha propuesto por diversos estudios que la concordancia en gemelos MC es del 30 - 40% ^{28,29}, y se ha estimado que el riesgo que tiene un gemelo MC es de 250 - 400 veces más de probabilidad de desarrollar ARJ que cualquier individuo de la población general. Dichos estudios en gemelos han proporcionado evidencias fuertes de que los factores genéticos contribuyen a la susceptibilidad a desarrollar ARJ.

En Estados Unidos se ha estimado que existen aproximadamente 300 familias que tienen más de un hijo afectado con ARJ ³⁰. Se ha observado que la ARJ en pares de hermanos afectados tiene una contribución genética muy importante que influye en su desarrollo. En la base de datos de Estados Unidos se reporta en los pares de hermanos afectados una alta concordancia en el sexo, subtipo y curso de la enfermedad ³¹.

Aunque los gemelos y los pares de hermanos con ARJ se han descrito frecuentemente, familias con múltiples hijos afectados con ARJ sólo rara vez han sido reportadas. Se ha calculado que el riesgo de recurrencia de un individuo que tiene hermanos afectados es de 30 veces mayor que el de la población general ^{32, 33}.

Aunque no hay reportes de cálculos de heredabilidad en niños con ARJ, en adultos se sabe que la heredabilidad es de aproximadamente el 60 %, en otras palabras es mayor el papel que juegan los factores genéticos en el desarrollo de la AR que el que juega el medio ambiente ³⁴.

Estrategias para la identificación de los factores genéticos en la ARJ

Actualmente se conocen varias estrategias que se emplean como herramientas moleculares para la búsqueda de genes en enfermedades como la ARJ. Sin embargo, dos de las estrategias más ampliamente usadas para la identificación de los genes involucrados en dichas patologías son los estudios de ligamiento genético y los de asociación alélica. Ambas estrategias son muy importantes para identificar genes involucrados en distintas patologías mendelianas y complejas incluyendo la ARJ ³⁴.

Estudios de ligamiento

Son un recurso valioso para identificar genes que tienen una asociación causal con el fenotipo o enfermedad de interés. El ligamiento se refiere a las posiciones de los loci en el mismo cromosoma y se habla de ligamiento cuando los alelos de dos loci son transmitidos juntos en la siguiente generación debido a su estrecha proximidad. Los genes que están en el mismo cromosoma presentan un cierto grado de ligamiento que puede ser desde muy importante hasta nulo. El ligamiento depende de la distancia con la que se encuentren los genes, secuencias de DNA, marcadores genéticos, etc., mientras más cerca se encuentren tendrán más posibilidades que pasen de una generación a otra ya que el carácter variable

del ligamiento se debe a la recombinación meiótica de los cromosomas y la recombinación de dos loci es inversamente proporcional a su proximidad. Así, los estudios de ligamiento permiten determinar si un marcador genético y el gen que predispone a la enfermedad se encuentran físicamente ligados mediante el análisis de cosegregación del marcador y el fenotipo de la enfermedad.

Estos estudios se realizan en pedigris extensos o en individuos relacionados (*sib pair analysis*) (figura 8). Por lo tanto, en los estudios de ligamiento los alelos en los dos loci aledaños generalmente se transmitan juntos a la siguiente generación, por lo tanto un ligamiento positivo sugiere la cercanía de un locus de un marcador genético (conocido) con el locus del fenotipo o enfermedad de interés (desconocido), esto finalmente le permite al investigador determinar la ubicación cromosómica del locus que produce el fenotipo o enfermedad. Un aspecto importante de los estudios de ligamiento es que se requieren de pedigris extensos ya que la cosegregación de un alelo específico del marcador con el locus de la enfermedad solo se observa dentro de una misma familia, aunque puede variar en familias no relacionadas, ya que otros alelos del marcador pueden cosegregar con la enfermedad. Por lo tanto, los estudios de ligamiento crean asociaciones dentro de la familia pero no necesariamente entre familias (figura 8 y 9)^{35, 36}. Si se estudia un número grande de familias y no se observa una asociación preferencial entre el gen de la enfermedad y un alelo específico de un locus marcador, se dice que ambos loci se encuentran en equilibrio de ligamiento. Por ejemplo, si existen dos loci estrechamente ligados con dos alelos cada uno (A, a en el locus 1 y B, b en el locus 2), entonces existen 4 posibles haplotipos (combinaciones de 2 o más marcadores en un mismo cromosoma) que tienden a pasar juntos a la siguiente generación: AB, Ab, aB, ab. Estos se transmitirán al azar dentro de las familias, sin embargo, a veces se observa que la cosegregación de estos haplotipos es mayor a la esperada por simple azar y entonces se dice que se encuentran en desequilibrio

de ligamiento. El desequilibrio de ligamiento se mantiene en pequeñas regiones genómicas de aproximadamente 5000 - 50 000 pares de bases ³⁷.

Los estudio de ligamiento emplean aproximadamente 350 marcadores altamente polimórficos distribuidos en todo el genoma, cada uno separado por aproximadamente 10 millones de pb, con esta estrategia es posible rastrear a un marcador que se encuentra estrechamente cercano al locus que produce la enfermedad, de manera que uno de sus alelos pudiera estar ligado a él, a esta estrategia se le denomina análisis amplios o extensos del genoma (*genome-wide screen*) ³⁵.

El empleo de marcadores moleculares como los VNTR (repeticiones en tandem de número variable) y STRs (repeticiones cortas en tandem) en los estudios de ligamiento incrementaron drásticamente el descubrimiento de genes involucrados en diversas enfermedades ³⁵. El ligamiento se suele reportar como logaritmo de *odds* (LOD) *score* que mide la probabilidad de dos loci se encuentren ligados entre la probabilidad de que no lo estén, valores positivos de LOD son evidencia de ligamiento (cosegregación) y valores negativos de que no están ligados. LOD score de 3 o más son sugestivas de ligamiento ³⁸.

Debido a que la ARJ es una enfermedad compleja y multifactorial donde múltiples genes proporcionan efecto aditivo en su etiología, los estudios de ligamiento han contribuido muy poco en la identificación de los factores genéticos involucrados en su etiopatogénesis, a diferencia de las enfermedades monogénicas, donde han sido muy exitosos en el mapeo de genes como el de la fibrosis quística, esclerosis lateral amiotrópica, etc.

Otro ejemplo en los cuales los estudios de ligamiento poco han podido hacer lo muestran los estudios basados en familias en donde un tamaño limitado de pedigrís puede afectar los resultados. De hecho muchos estudios de ligamiento no han podido ser replicados debido a que carecen de poder estadístico (por el tamaño de muestra), aunque también puede ser que diferentes genes de susceptibilidad operan en diferentes poblaciones^{37,39}. Cuando el ligamiento ha sido confirmado, entonces se buscan genes potenciales que se encuentran en la región genómica que dio positivo al ligamiento, en las enfermedades complejas el ligamiento generalmente es grande, a veces hay que buscar un gen (es) en una región de 20 - 30 millones de pares de bases, la cual puede contener dependiendo del cromosoma entre 500 - 1000 genes³⁷, de hecho actualmente hay marcadores genéticos más abundantes que los VNTRs y STRs, los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) que se emplean para realizar estudios más detallados en la región que dio ligamiento (figura 10).

Por ejemplo, se ha encontrado ligamiento entre ARJ y la región de HLA ubicada en el brazo corto del cromosoma 6 con un LOD score de 2.26; también se han identificado otras regiones cromosómicas dentro del genoma humano como la 1p36, 19p13, 20q13. En particular para el subtipo poliarticular que se presenta tempranamente en individuos con ARJ, se encontró al locus 7q11 como región de susceptibilidad. Sin embargo, a pesar de estas evidencias experimentales ¿cómo podemos buscar cual es o cuales son los genes involucrados en la susceptibilidad a desarrollar ARJ o cualquier otra enfermedad compleja a través de miles de pares de bases?⁴⁰.

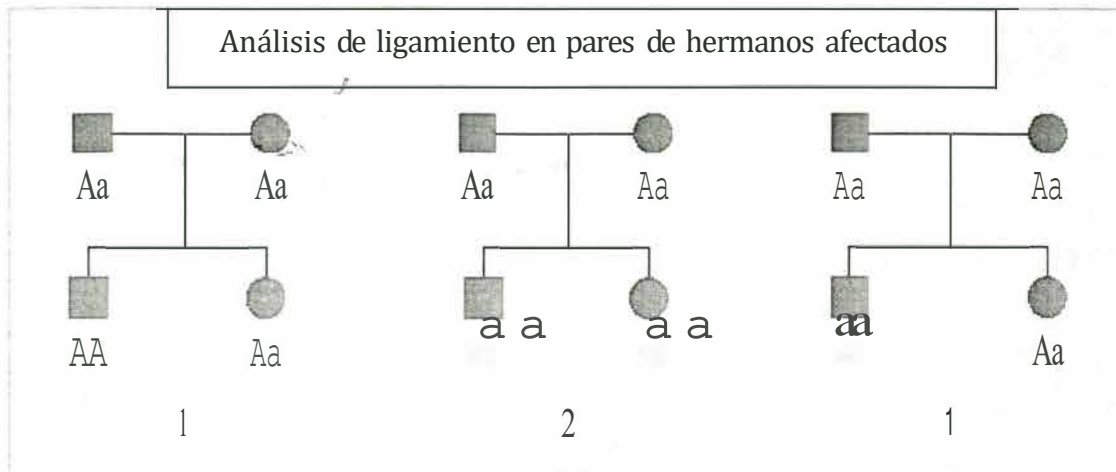


Figura 8 **Los análisis de ligamiento en familias.** Estos estudios son un recurso valioso para identificar genes que tienen una asociación causal con el fenotipo o enfermedad de interés, estos análisis se realizan en familias extensas o en pares de hermanos afectados.

Los estudios de asociación alélica

A diferencia de los análisis de ligamiento, los cuales escanean todo el genoma o una región grande del genoma, los estudios de asociación se emplean para estudiar pequeñas regiones γ o segmento del genoma. Este tipo de estudios han resultado excelentes para identificar genes ubicados en las regiones genómicas que han dado ligamiento en diversas enfermedades, con estos estudios se pueden identificar regiones cromosómicas pequeñas, además de genes de pequeño efecto en la enfermedad. Este tipo de diseño se puede realizar en a) casos y controles y, b) basados en familias; padres e hijo afectado o pares de hermanos afectados. En el primer caso se analizan enfermos (casos) e individuos sanos (controles) no relacionados y se compara la frecuencia de marcadores polimórficos en ambos individuos, si la frecuencia del alelo específico del marcador se encuentra en mayor frecuencia en los casos que los controles, con un poder estadístico mayor a 0.8 entonces decimos que marcador está asociado a la enfermedad (tabla 6).

I

Análisis de asociación		
	Casos	Controles
A	55	75
A	45	25

Tabla 6. **Ejemplo de tabla de contingencia de dos por dos de los datos obtenidos de casos y controles.** Estas tablas comparan las frecuencias alélicas y genotípicas de los casos y los controles.

La segunda estrategia en los estudios de asociación está basada en familias, a diferencia de los estudios caso-control aquí se evitan o se rechazan las asociaciones debido a estratificación poblacional (subgrupos en las poblaciones que pueden tener un marcador más frecuente de lo que esperamos dando falsas asociaciones). Un método ampliamente utilizado en este tipo de estudios es la prueba de desequilibrio de transmisión (TDT por siglas en inglés), esta prueba compara la frecuencia con la cual los padres heterocigotos transmiten un alelo específico de un marcador bialélico o su forma alterna a su hijo afectado. Si el marcador bialélico se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el locus de la enfermedad o este tiene un efecto directo en la susceptibilidad en la misma, se observará una significativa desviación de la frecuencia de transmisión esperada en cualquiera de los dos alelos (figura 9).

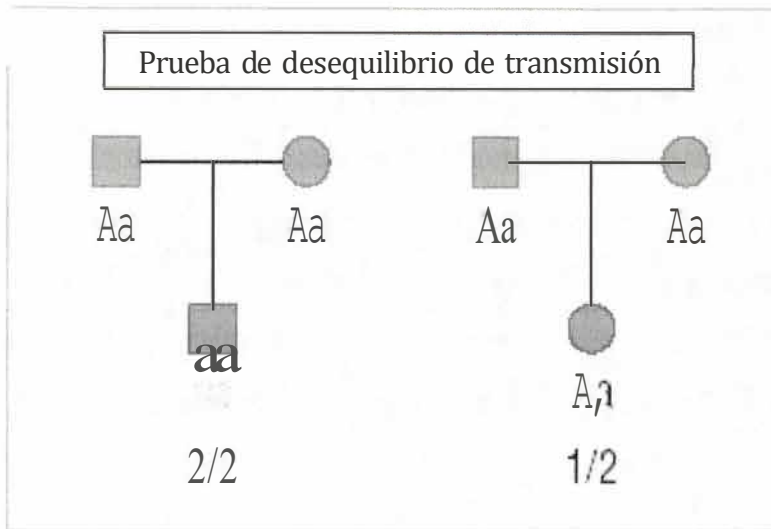


Figura 9. **Prueba de desequilibrio de transmisión (TDT)**. Este es un estudio de asociación basado en familias que se realiza para evitar problemas de estratificación poblacional, los requisitos son: padres e hijo afectado.

Causas de asociación

Se conoce que la asociación se puede deber por a) efecto directo del marcador, b) desequilibrio de ligamiento y c) estratificación de la población.

a) Efecto directo del marcador alélico en estudio. En algunas ocasiones el polimorfismo estudiado en ciertas enfermedades es la causa directa de asociación por estar involucrado en la susceptibilidad a la enfermedad.

b) Desequilibrio de ligamiento. La asociación puede ser debida no al polimorfismo que se está estudiando sino a otro polimorfismo que este cercano a él y sea el verdadero causante de la susceptibilidad.

c) Estratificación poblacional. Muchas poblaciones presentan subgrupos que no se mezclan, esto puede condicionar a que tanto la enfermedad como algunos marcadores alélicos podrían ser más comunes entre los individuos de los

subgrupos. Cuando se presenta este fenómeno los estudios pueden dar falsos positivos o falsos negativos ³⁵.

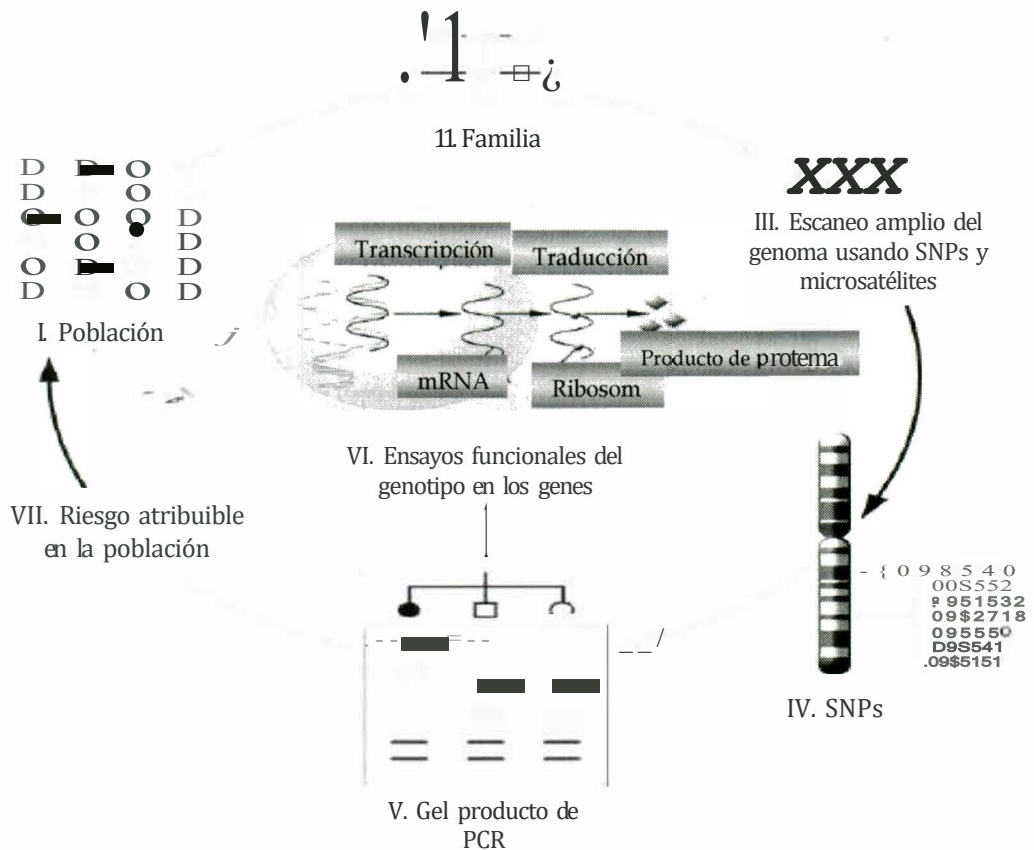


Figura 10. **Uso de polimorfismos en la identificación de genes asociados con enfermedad.** En los estudios de ligamiento y asociación se emplean STRs y SNPs para identificar marcadores genéticos asociados a una enfermedad. Estas estrategias se puede realizar tanto en familias como en población general, estos estudios nos proporcionan evidencia de los genes o variantes génicas que pueden estar involucrados en enfermedades monogénicas o complejas.

El genoma humano y los estudios de asociación

Gracias a la secuenciación completa del genoma humano se pudo conocer la distribución exacta de los genes en los cromosomas ⁴¹, también se conocieron cuales eran las variantes más comunes en el genoma. Las dos variantes más comunes son los STRs y los polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs. De hecho, dos individuos cualquiera comparten el 99.9 % de su genoma, el resto (0.1 %) representa la variabilidad de cada individuo. Los SNPs son los principales marcadores genéticos que representan la variabilidad entre individuos y son cambios en un solo nucleótido en la misma posición de un cromosoma en diferentes individuos ⁴², de hecho en Julio del 2005, el número de SNPs que se conocían en el genoma humano excedía a los 10 millones. Aunque muchos SNPs individuales llevan información limitada, la facilidad para estudiarlos los ha llevado a ser el blanco de muchos estudios de epidemiología genética ⁴³.

Los SNPs se han encontrado distribuidos a través de todo el genoma humano, esto ha resultado en grandes avances en la determinación de marcadores polimórficos en las enfermedades comunes, de hecho actualmente los SNPs son los marcadores más comúnmente empleados en los análisis de asociación. Se estima que se encuentran aproximadamente cada 300 - 500 bases o menos lo cual lleva a la posibilidad de que existan entre 10 y 20 millones de ellos distribuidos a través de todo el genoma ^{44 -47}.

La importancia de los estudios genéticos con SNPs se debe a lo siguiente:

- a) Los SNPs son heredados de forma mendeliana de una generación a otra, de esta manera se puede estudiar la evolución de las especies, además de las poblaciones ⁴⁵

- b) Los SNPs pueden ser los responsables de causar susceptibilidad a padecer enfermedades comunes ya que pueden alterar la secuencia de DNA en una región

codificante o reguladora, la función de la proteína, su estabilidad, los sitios de splicing, etc. ^{45, 48}

e) Finalmente, los SNPs se pueden emplear para los estudios de ligamiento y asociación ³⁶. Estos marcadores presentan algunas características importantes como por ejemplo la mayoría de ellos son bialélicos, son muy abundantes en el genoma, tienen baja tasa de mutación, son fáciles de genotipar con medios automatizados y no se requiere de una gran cantidad de DNA para su análisis (figura 11) ⁴⁹.



Figura 11. SNPs. Los SNPs en el genoma humano representan la principal variación entre individuos, estos SNPs se están empleando actualmente como marcadores de susceptibilidad en diferentes enfermedades complejas incluyendo ARJ.

Los SNPs en los estudios de ligamiento y asociación

Actualmente tanto en los estudios de ligamiento como en los de asociación se emplean los SNPs para buscar genes y variantes alélicas involucradas en la susceptibilidad o protección de ciertas enfermedades, incluyendo a la ARJ ^{25, 43}. Por ejemplo, Amos y cols., publicaron un estudio de ligamiento escaneando el genoma completo con 5 700 SNPs, este estudio estuvo basado en pares de hermanos afectados con artritis reumatoide de 642 familias ⁴⁹. Los resultados mostraron

evidencia de ligamiento en los cromosomas 2q33 y 11p12 con un LOD *score* de 3.52 y 3.09, respectivamente. Además otra región cromosómica que mostró evidencia de ligamiento fue la del HLA (LOD 16), lo cual corrobora nuevamente que está es un región de ligamiento importante en la AR. Otros cromosomas encontrados ligados a la enfermedad en este estudio se ubicaron en el cromosoma 5 y 10 con un LOD de 2.5 ⁴⁹.

Aunque se ha encontrado ligamiento y asociación con la región del HLA que se ubica en el brazo corto del cromosoma 6, en esta región se encuentran aproximadamente 200 genes, muchos de los cuales tienen un papel importante en los procesos inmunes incluyendo a los genes que codifican a proteínas del HLA ¹⁰, las evidencias experimentales indican que esta región genómica sólo contribuye con el 17 % en el desarrollo de la ARJ ¹⁸. Por lo que regiones no HLA representan el resto de factores genéticos asociados a la susceptibilidad a desarrollar ARJ ¹⁹.

Otros estudios han identificado varios SNPs en genes que codifican proteínas del sistema inmune del tipo Th1 y que están involucrados con los procesos pro-inflamatorios como IL1a ⁵⁰, el gen que codifica al factor inhibidor de la migración de los macrófagos (MIF) ⁵¹, *CCL5* que codifica a una citocina quimioatrayente ⁵², la *IL-6*, la cual se ha encontrado asociado al subtipo sistémico ⁵³, el gen *CTLA-4* que codifica a una proteína de superficie celular importante en el mantenimiento de la tolerancia periférica ¹², *PTPN22* que codifica una fosfatasa intracelular ⁵⁴, *TNF alfa* que codifica a una de las principales proteínas proinflamatorias ⁵⁵, etc. Es importante considerar que la asociación de estos SNPs a la artritis no ha sido reproducible en todas las poblaciones.

Antecedentes de los genes estudiados y sus SNPs: *IL-1a*, *CCL5*, *IKBL*, *TAPBP*.

IL-1a

I. Función.

Las interleucinas (ILs) son un grupo de pequeñas proteínas producidas por diversos tipos celulares que depende de ciertos agentes estimulantes ⁵⁶. Existen tres miembros de la familia de IL: IL-1a, IL-1p y el antagonista del receptor de IL-1. La interleucina 1 (IL-1) es una citocina con un potente efecto proinflamatorio e inmunoregulador (figura 12a), que es secretada por linfocitos B, T y NK, monocitos/macrófagos, macrófagos alveolares activados, neutrófilos ⁵⁶⁻⁵⁸.

La proteína IL-1a tiene un peso molecular de 30.6 kDa y está compuesta por 271 aminoácidos (figura 12 b). Se ha demostrado que la IL-1a está sobreexpresada en el plasma, en el líquido y la membrana sinovial de pacientes con artritis y en piel de pacientes con artritis psoriásica. La IL-1a se ha implicado en la destrucción de las articulaciones, en un estudio con ratones transgénicos, el gen de la *IL-1a* de humano provocó destrucción del cartílago y hueso de las articulaciones, por otro lado, se ha sugerido un papel importante de la IL-1a en la autoinmunidad ⁵⁹. Además, la IL-1a induce la expresión de varios genes que codifican para citocinas proinflamatorias y citocinas quimiotácticas (quimiocinas), factores de crecimiento hematopoyético, etc. ⁵⁶

11. Gen y SNPs en el gen de *IL-1a* asociados a artritis reumatoide

El gen de la IL1a se encuentra ubicado en el brazo largo y en la banda 12-21 del cromosoma 2 (2p12) ⁶², está compuesto de 7 exones y contiene 10.4 kb. El RNAm comprende 2943 bases ⁶². En este gen se han identificado 89 SNPs, uno de los cuales se localizó en la región 5' en la posición - 889 (- 889 C/T) asociado a AR ⁶³. Se ha observado que este SNP influye en la expresión de la IL-1a (figura 13) ⁶⁴. Un estudio realizado en pacientes con AR mostró que ciertos alelos de la IL-1a pueden

contribuir a la erosión del hueso, sin embargo, no existe ningún estudio de ligamiento que proporcione evidencia de que este locus este involucrado en esta patología ⁶⁵.

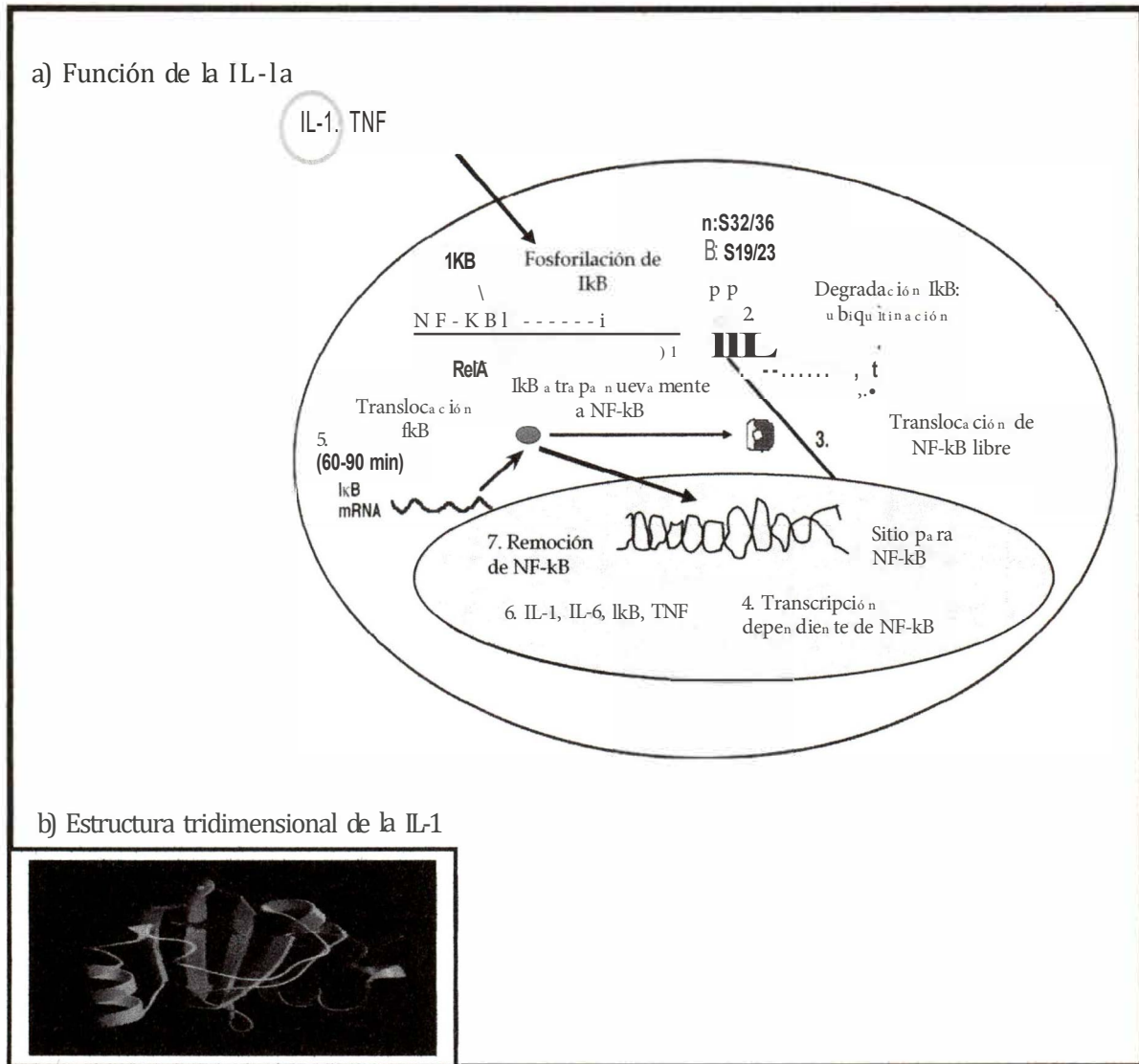


Figura 12. Estructura y función de la IL-1. La IL-1 es una pequeña proteína que tiene como función expresar genes involucrados con la inflamación .

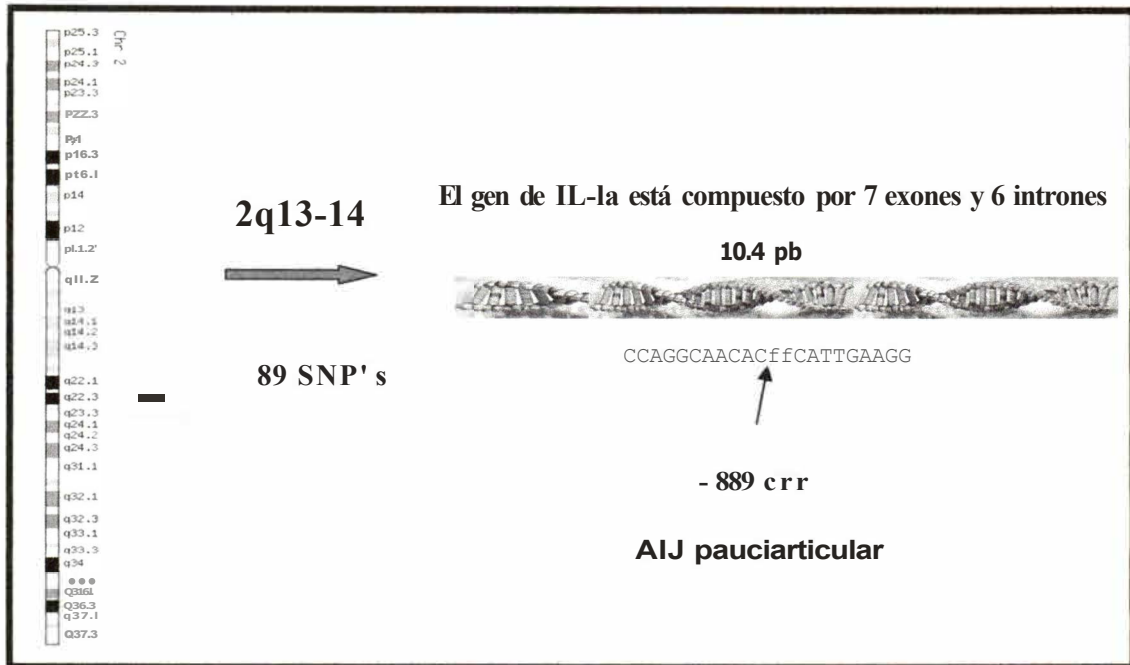


Figura 13. Ubicación genómica y constitución genética de la *IL-1a*. A lo largo del gen de IL-1a hay 89 SNPs, uno de ellos reencuentra en la posición - 889 C/T.

III. Epidemiología molecular del gen de IL-1a

Existen varios estudios de casos y controles que han identificado al SNP - 889 C/T como alelo de riesgo a AR, estos reportes han sido publicados por diferentes grupos Ingleses ^{66- 67}. En uno de los estudios la variante T estuvo asociado al subgrupo pauciarticular de inicio temprano, el OR fue de 2.1 ⁶⁶, sin embargo en otro estudio la variante C fue la asociada con artritis psoriásica ⁵⁸. Por otro lado, otros investigadores de otras poblaciones usando otras cortes de pacientes con ARJ no han podido replicar la asociación con este SNP ⁶⁷⁻⁶⁸. Por lo que los resultados han sido controversiales.

Quimiocinas y CCL5 (RANTES)

I. Función.

Las quimiocinas son pequeñas proteínas que actúan como quimioatrayentes facilitando la migración y degranulación de los leucocitos, además de promover la activación de moléculas de adhesión como las integrinas y la angiogénesis (figura 14) ⁶⁹. Las citocinas quimiotácticas se han involucrado en la fisiología y patofisiología de varios procesos inflamatorios agudos y crónicos, ya que atraen y estimulan la migración de diversos subgrupos de leucocitos, como los neutrófilos, células T, eosinófilos y monocitos a los sitios de inflamación (figura 15) ^{57,70-73}. Hay diversas evidencias que sugieren que las quimiocinas juegan un papel importante en el desarrollo y progresión de las enfermedades autoinmunes.

La CCL5 es una quimiocina que se caracteriza por la presencia de 2 cisteínas adyacentes (C - C), esta pequeña proteína tiene un peso molecular de 10 kDa y está formada por 91 aminoácidos ^{62,74}, su expresión es inducida en varios tipos celulares incluyendo a macrófagos, células dendríticas, linfocitos y células endoteliales ^{75,76}, y su función consiste en atraer a las células que expresen receptores para CCL5 (CCR5) como las células T activadas y de memoria, monocitos, macrófagos y células dendríticas inmaduras a los sitios de inflamación ⁷⁶⁻⁷⁸. La expresión de CCL5 mediada por células dendríticas puede favorecer la expansión de células del tipo TH1 ⁷⁹. Algunos estudios recientes han demostrado que CCL5 se expresa en mayor cantidad en las articulaciones inflamadas de pacientes con artritis juvenil que en sangre periférica (figura 16 a) ⁸⁰.

Pharoah y cols., encontraron altos niveles de la proteína CCL5 en las células de la membrana sinovial, y mediante inmunohistoquímica identificaron la proteína en el endotelio de las membranas sinoviales de pacientes pediátricos con artritis (figura 16 b, c) ⁸⁰.

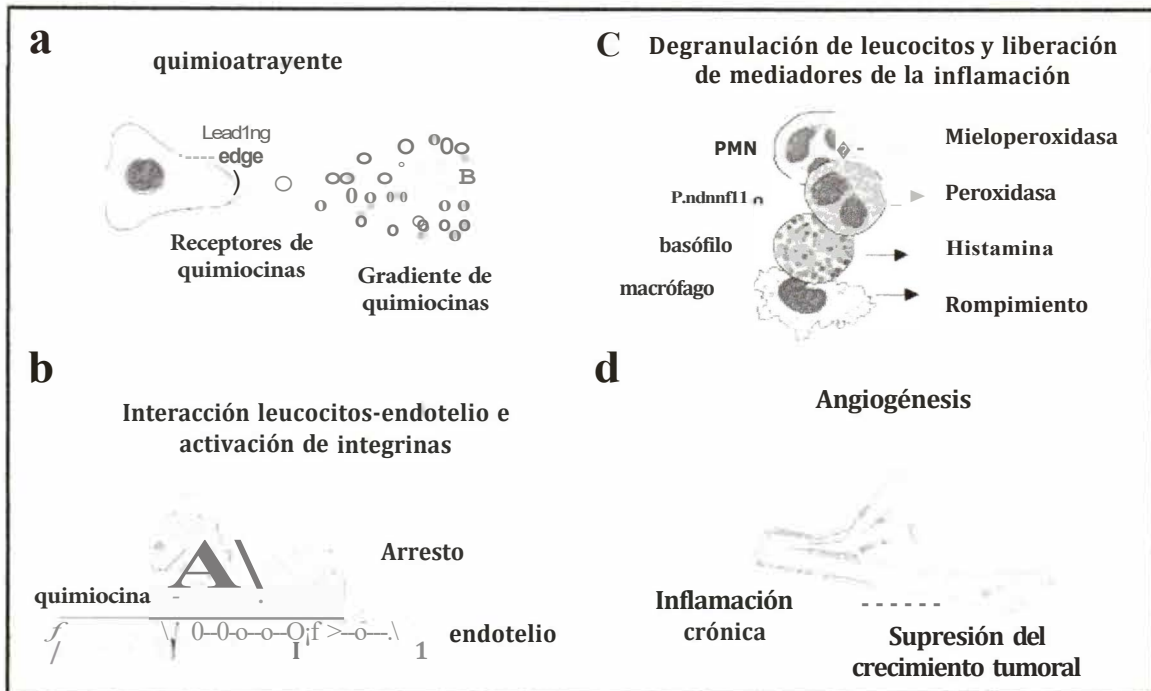


Figura 14. **Funciones de las quimiocinas.** Las quimiocinas cumplen diversas funciones importantes en el sistema inmune, como a) quimioatrayentes de células T a los sitios de inflamación, b) degranulación de productos de inflamación de leucocitos por medio de diferentes inductores, c) algunas quimiocinas inducen la expresión de genes de adhesinas, etc. d) algunas quimiocinas están involucradas en la angiogénesis.

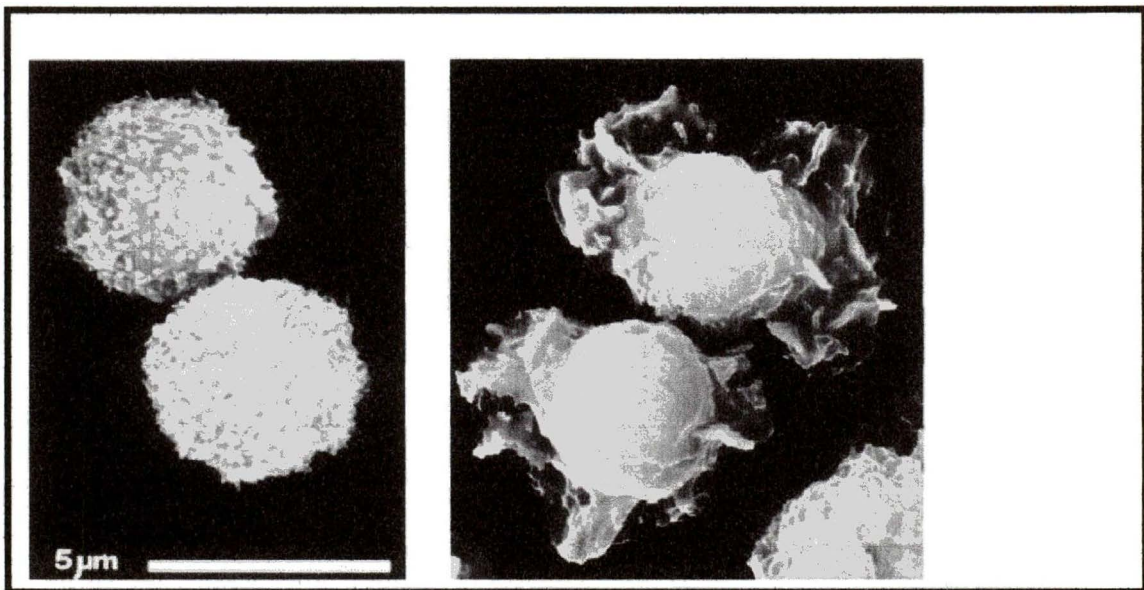


Figura 15. **Microscopía electrónica de neutrófilos.** Cambio morfológico de un neutrófilo antes y después de la estimulación con quimiocinas.

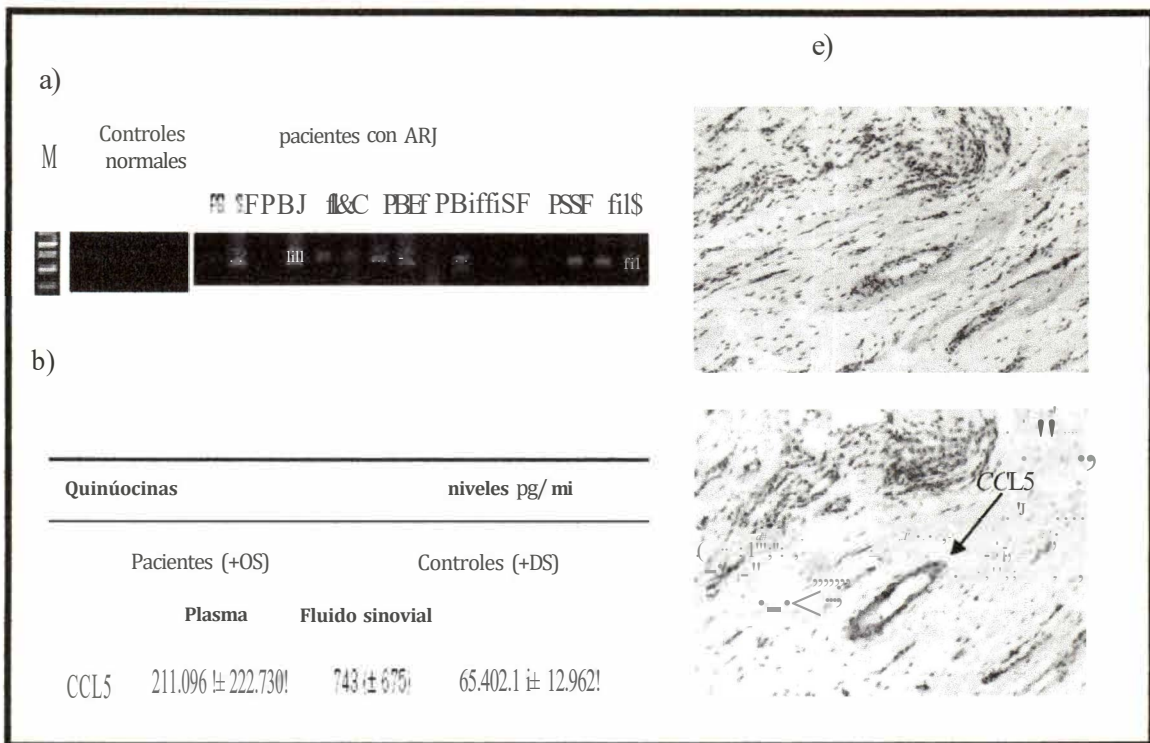


Figura 16. Expresión de mRNA y proteína CCL5 en individuos con ARJ. a) mRNA de CCL5 de sangre periférica y líquido sinovial de pacientes con artritis infantil, b) concentración de proteína CCL5 en pacientes y controles en plasma y líquido sinovial c) expresión de la proteína CCL5 en el endotelio de tejido sinovial y d) inflamado.

11.GenCCL5

El gen que codifica para la quimiocina CCL5 se localiza en la banda 11 del brazo largo del cromosoma 17 (17q11) ⁶². Este es un gen pequeño de 8.8 kb que está constituido por 3 exones. El producto del gen es un mRNA de 1227 bases ⁶². La base de datos de NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica por sus siglas en inglés) indica que hay 55 SNPs a través de todo el gen incluyendo promotor, intrones y exones.

Un grupo Japonés identificó dos SNPs en la región promotora que resultaron muy importantes en la regulación del gen CCL5 ya que alteran la expresión de dicho gen, estos SNPs se encuentran en la posición - 28 C/G y en - 403 G/A (figura 17) ⁸¹. En este estudio se analizó el efecto que tienen estos SNPs en la expresión del gen en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) tipo 1, ellos observaron que los SNPs - 28 G y - 403 A conducen a la sobreexpresión del gen, lo que conlleva a la atracción de varias células del sistema inmune. En el caso de los pacientes infectados por el VIH, estos polimorfismos tienen un efecto protector debido a que el virus interactúa con CCR5, el receptor de CCL5. En este estudio también se realizaron transfecciones a líneas celulares con algunas construcciones que llevaban diversos haplotipos de CCL5 y se logró documentar que algunos de los haplotipos tenían mayor efecto en la síntesis de la quimiocina (figura 18) ⁸¹.

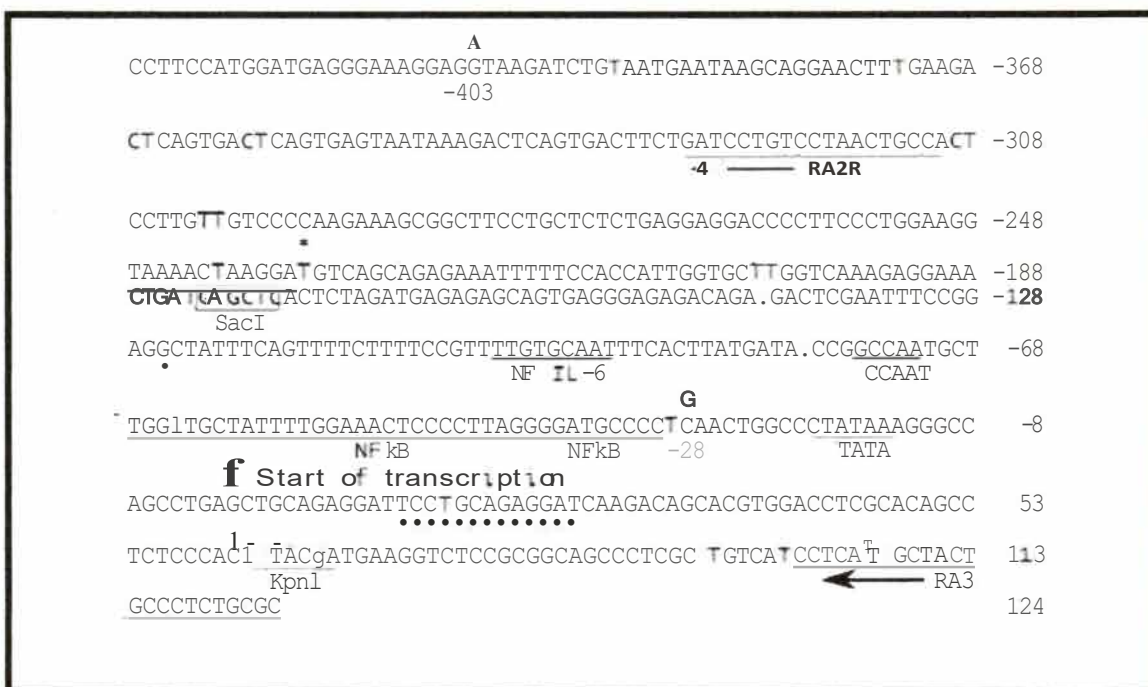


Figura 17. Parte de la secuencia del promotor de **CCL5**. En esta secuencia se muestran los dos SNP - 28 C/G y - 403 G/A ubicados a partir del sitio de inicio de la transcripción y que previamente fueron identificados y asociados con algunas enfermedades autoinmunes. Se muestra también la secuencia consenso para NF - kp cercana al SNP - 28 C/G.

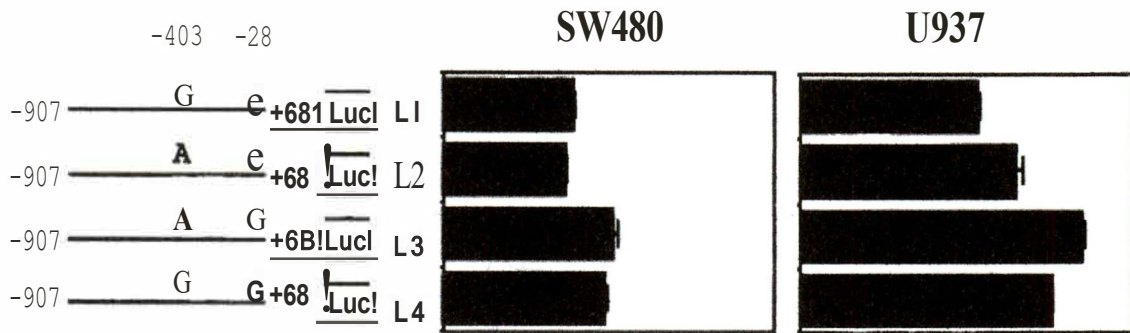


Figura 18 Transfección en las líneas celulares SW480 y U937 con haplotipos del SNP - 28 C/G y - 403 G/A. Esta imagen muestra el efecto funcional de los SNPs en la expresión del gen *CCL5*.

111. Epidemiología molecular del gen *CCL5*

Dos SNPs previamente identificados y analizados en pacientes con HIV-1 mostraron que influían en la expresión del gen *CCL5* ⁸¹. Actualmente se han analizado el SNP - 28 C/G y - 403 G/A del gen *CCL5* en diferentes enfermedades y en diferentes poblaciones. Este gen ha sido analizado principalmente por poblaciones Asiáticas como la Japonesa, la China y la Taiwanesa en enfermedades autoinmunes como el Lupus Eritematoso Sistémico de adultos ⁸² e infantes ⁸³ y la AR de adulto ⁸⁴.

En este último estudio, Wang y cols., analizaron ambos SNPs (- 28 C/G y - 403 G/A) de la región promotora del gen en una corte de 151 pacientes con AR (121 mujeres y 30 hombres) y 149 controles (113 mujeres y 36 hombres), sin embargo el que mostró diferencias estadísticamente significativas y asociación fue el SNP - 403 G/A, el genotipo A/A fue encontrado en mayor frecuencia en la población estudiada (OR 3.3, IC: 1.4 - 7.9, p 0.005) y la frecuencia alélica de A también mostró diferencias estadísticas significativas (p=0.024) ⁸⁴.

Inhibidores κp e $\text{I}\kappa\text{B}$ L

1. Función

Los inhibidores del factor de transcripción NF- κp ($\text{I}\kappa\text{ps}$) son proteínas conocidas como reguladoras de la actividad del factor nuclear κp (NF- κp) ya que ambas proteínas forman un complejo en el citoplasma. Las $\text{I}\kappa\text{ps}$ pertenecen a una familia de proteínas que incluyen $\text{I}\kappa\text{p}\alpha$, $\text{I}\kappa\text{p}\beta$, $\text{I}\kappa\text{p}\gamma$, Bcl3 , p105 , p110 y la recién descrita $\text{I}\kappa\text{pL}$ ⁸⁵⁻⁸⁷. Las proteínas de esta familia se caracterizan por presentar dominios repetidos de ankirina los cuales están involucrados en la interacción proteína - proteína ⁸⁸. El inhibidor mejor caracterizado de NF- κp es $\text{I}\kappa\text{p}\alpha$. Esta proteína se une con gran avidéz a la subunidad p65 (RelA) de NF- κp a través de los dominios de ankirina ⁸⁹. Durante la activación de NF - κp numerosos estímulos incluyendo los de la IL1 y $\text{TNF}\alpha$ activan al complejo de protein-cinasas de $\text{I}\kappa\text{ps}$ (IKK) que fosforilan a $\text{I}\kappa\text{p}\alpha$ en los residuos 32 y 36 de serina ubicados en el dominio amino terminal. La fosforilación es necesaria para iniciar la degradación de $\text{I}\kappa\text{p}\alpha$, esta fosforilación hace que $\text{I}\kappa\text{p}\alpha$ sea ubiquitinada y sea rápidamente degradada por la vía no lisosomal (complejo proteolítico 26S ATP-dependiente compuesto de un proteosoma de 700 kDa). La fosforilación de $\text{I}\kappa\text{p}\alpha$ permite la liberación y transmigración de NF - κp al núcleo de la célula, finalmente cuando esto sucede entonces NF- κp comienza a transcribir varios genes importantes del sistema inmune innato y adaptativo como la IL-6 , IL-1 , $\text{TNF}\alpha$ (figura 19) ^{87,89}.

$\text{I}\kappa\text{pL}$ (Inhibidor parecido a $\text{I}\kappa\text{p}$) es una proteína con peso molecular de 38 kDa y está formada por 381 aminoácidos. Aunque no se conoce su función se sabe que es muy similar a la secuencia de $\text{I}\kappa\text{p}\alpha$. Reportes recientes indican que $\text{I}\kappa\text{pL}$ tiene una diferente localización subcelular con respecto a $\text{I}\kappa\text{p}\alpha$. La secuencia de aminoácidos deducida del gen *$\text{I}\kappa\text{pL}$* contiene dos repetidos completos y uno parcial de ankirinas, seguida de una región ácida muy similar a las proteínas que son miembros de la familia de inhibidores κp ^{90,91}.

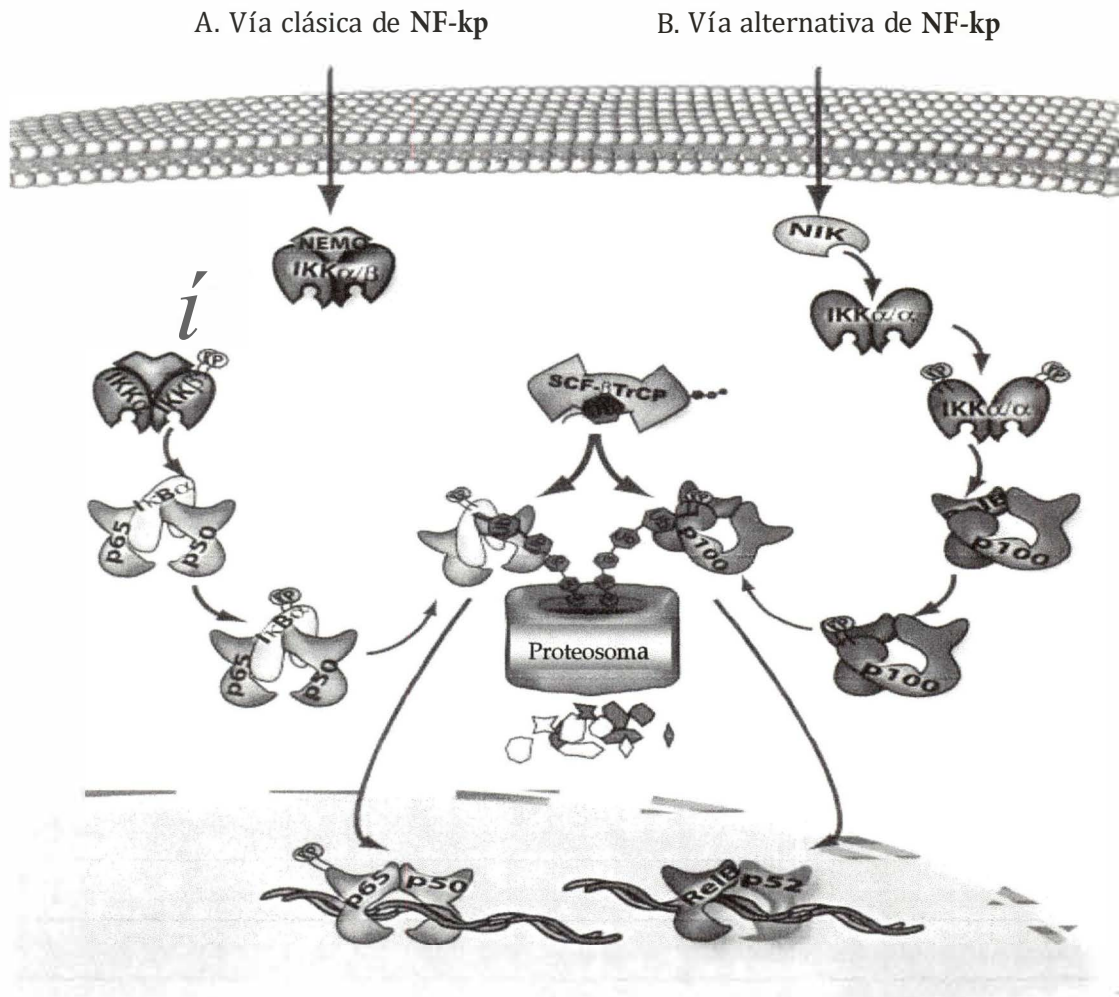


Figura 19. La regulación de NF - κ p. Varias proteínas como cinasas de los inhibidores de NF - κ p, los inhibidores κ B median la expresión de NF- κ B, estas regulan su translocación al núcleo celular y la transcripción de genes involucrados en procesos inflamatorios.

II. *GenIKF3L*

El gen *IKFJL* se encuentra en el brazo corto banda 21.3 del cromosoma 6, está formado por 11.2 kb y consta de 4 exones y 3 intrones. El producto del gen es sintetizado en un RNAm de 1463 bases. A lo largo del gen se han identificado 64 SNPs ⁶².

Varios estudios de ligamiento y asociación han identificado que la región de HLA es muy importante para el desarrollo de varias enfermedades autoinmunes incluyendo a la ARJ. La región del HLA no solo contiene genes de clase I y II sino a otros con relevancia inmunológica. Aunque frecuentemente existen discrepancias en los estudios de ligamiento para la búsqueda de loci involucrados en las patologías, la región de HLA se ha mantenido como el principal locus de susceptibilidad a desarrollar AR de adulto y de infantes, el gen *IKFJL* se encuentra en la región de HLA y se ha encontrado asociado a la enfermedad ^{87, 92-94}.

Epidemiología del gen *IKF3L*

Gracias a la secuencia completa del genoma humano ahora se sabe que el gen *IKFJL* tiene distribuidos a través de su secuencia de DNA 66 SNPs y algunos de ellos han sido analizados en algunas enfermedades en varias poblaciones, por ejemplo los SNPs ubicados en la región promotora - 262 A/G y - 62 T/A han sido analizados mediante estudios de casos-controles en una corte de 124 pacientes con diabetes tipo 1 en población Japonesa mostrando asociación con esta enfermedad ⁹¹, por otro lado en esta misma población se ha documentado que el SNP - 62 de IKBL es un alelo de susceptibilidad para AR (OR 2.08, IC: 1.41 - 3.07, p=0.0088) ⁸⁷, estos resultados fueron replicados en población Taiwanesa ^{87,95}.

Proteína de unión al transportador asociado al procesamiento de antígenos (TAPBP).

I. Función

Cuando un antígeno propio o extraño entra en contacto con una célula presentadora de antígeno (CPA) es fagocitado, este antígeno es degradado en el citoplasma por un complejo de proteínas con actividad enzimática denominado proteosoma, los péptidos generados por el proteosoma pueden variar desde 3 - 32 residuos de aminoácidos (figura 20). Muchos de los péptidos se unen a moléculas del HLA clase I, algunos de esos péptidos son llevados por proteínas transportadoras asociadas al procesamiento de antígenos (TAP) ATP-dependientes desde el citosol al lumen del retículo endoplásmico, de esta manera estos péptidos se unen a moléculas de HLA clase I. Sin embargo, hay algunas moléculas accesorias que son importantes para la interacción TAP-HLA clase I como por ejemplo la proteína de unión al transportador asociado al procesamiento de péptidos (TAPBP).

La TAPBP es una glucoproteína con localización en el retículo endoplásmico, tiene un PM de 47.6 kDa y consta de 448 aminoácidos, su función es importante para una eficiente interacción entre TAP y moléculas de HLA de clase I¹⁷. La TAPBP tiene además actividad de chaperona, dicha proteína está involucrada de manera indirecta en la presentación de antígenos a la superficie de las células⁹⁸. De esta manera la TAPBP es necesaria para el ensamblaje y para la presentación del péptido a moléculas de HLA de clase I⁹⁸.

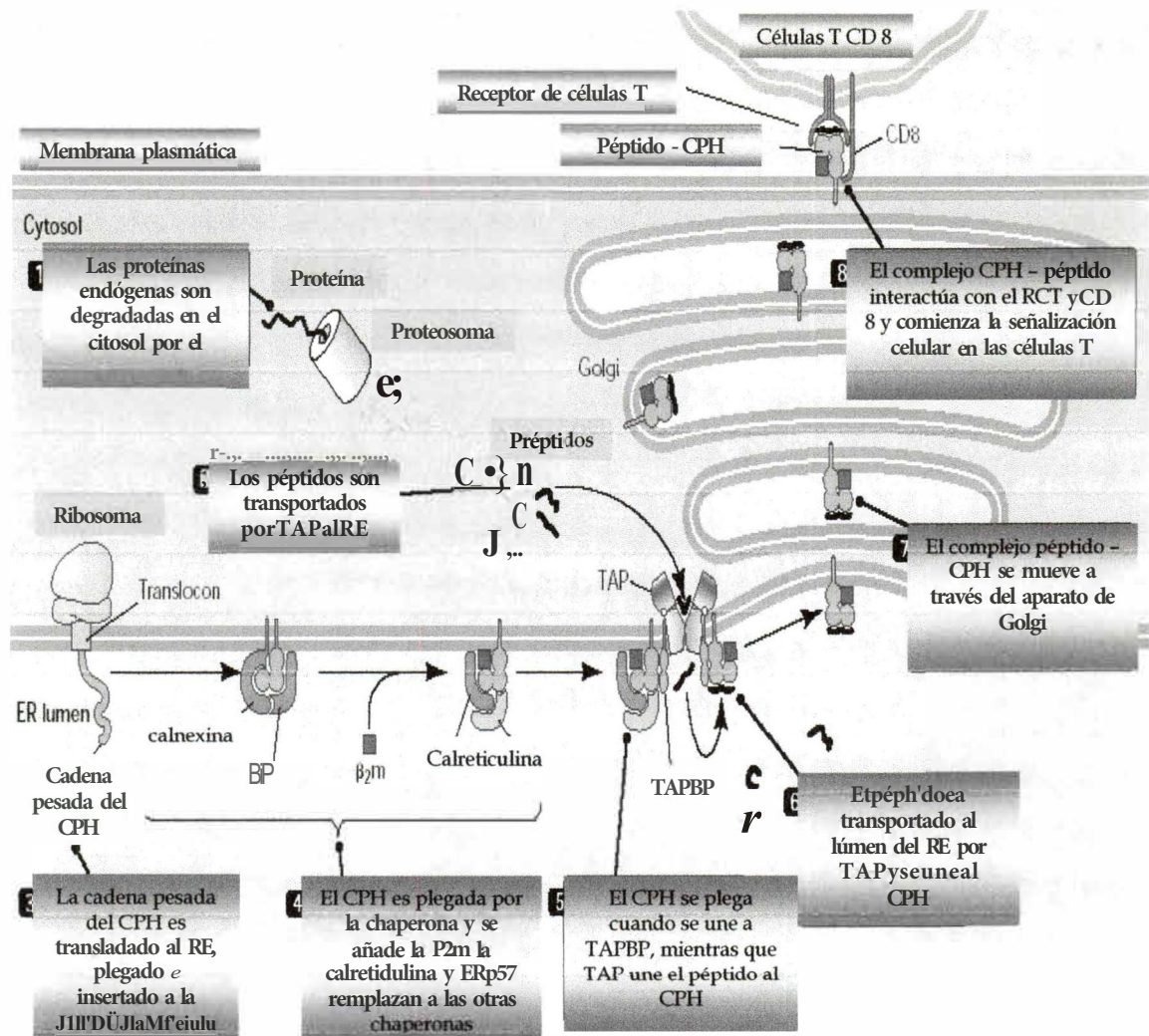


Figura 20. Interacción de una CPA y un linfocito T citotóxico, y como un antígeno es procesado y presentado en la superficie celular. Proteínas claves en el transporte de péptidos antigénicos desde el citoplasma al retículo endoplásmico son TAP1 y TAP2, además la proteína TAPBP se encarga de plegar y transportar moléculas de HLA clase I a través del retículo endoplásmico para que éstas se unan con los péptidos antigénicos.

11 Gen de **TAPBP**

El gen *TAPBP* se encuentra ubicado en la banda 21.3 del brazo corto del cromosoma 6 (6p21), donde se encuentra la región de HLA, y específicamente en la región de los genes de HLA clase II ⁶². Como se mencionó anteriormente la región del HLA ha dado varias evidencias de ligamiento y asociación en pacientes con AR de adultos y de niños ^{87, 92%, 98}. De hecho el gen *TAPBP* se encuentra a una distancia de 180 kilobases del HLA-DP. El gen abarca una región que comprende 14.38 kb y a través de estas bases se encuentran 8 exones y 7 intrones. El producto del gen es un mRNA de 3629 pb ⁶². Se han identificado 66 SNPs a través de toda la región genómica que abarca este gen.

11.1 Epidemiología del gen **TAPBP**

Bukulmez y cols., analizaron un SNP no sinónimo de este gen ubicado en el exon 4 (260 C/G) en poblaciones caucásicas de USA e Inglesa con ARJ. Ellos analizaron el SNP en un estudio de casos y controles y también con la prueba de desequilibrio de transmisión. Interesantemente encontraron asociado este SNP en ambas poblaciones ($p=0.04$). Cabe mencionar que el SNP no sinónimo a nivel de proteína cambia un aminoácido no polar (treonina <Thr>) por uno básico (**arginina** <Arg>), y que este cambio en la estructura tridimensional de la proteína pudiera afectar la función de chaperona de la proteína y alterar la respuesta inmune tanto innata como adaptativa ⁹⁸.

Antecedentes y justificación

Debido a que las enfermedades autoinmunes representan en su conjunto aproximadamente el 5% de todas las enfermedades a nivel mundial,⁹⁹ y que la artritis reumatoide juvenil representa un problema serio de salud por su frecuencia y porque esta patología conlleva a la incapacidad en el movimiento debido a la destrucción del cartílago y hueso, es por ello que es necesario entender la etiopatogénesis de la enfermedad en las diferentes poblaciones. Los estudios de ligamiento y asociación han demostrado que el componente genético de la enfermedad es importante para conferir susceptibilidad o protección. Es por esto que es importante estudiar a los diversos polimorfismos en diferentes genes candidatos y genes modificadores de la enfermedad. Actualmente en nuestro país se están desarrollando diversos trabajos de investigación en el cual se está investigando el papel de varios genes involucrados en la susceptibilidad a desarrollar ARJ, en el laboratorio de Enfermedades Multifactoriales del INMEGEN se han analizado e identificado varios polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs en varios genes que confieren susceptibilidad a la enfermedad, todos estos genes tienen relación con el sistema inmune y la respuesta inflamatoria, y entre los genes que se han visto asociados incluyendo a los del complejo principal de histocompatibilidad o HLA clase I, II y III se encuentran el *TNF*, *IL-10*, *IL-6*, *VDR*, *PTPN22*, *PDC1*. Sin embargo, todo aquel gen que por su función potencialmente contribuya a la patofisiología de la enfermedad es importante señalar que se ha observado una alta heterogeneidad genética en los factores genéticos que confieren susceptibilidad en las diferentes poblaciones. Por esta razón este proyecto tuvo como objetivo analizar SNPs en otros genes candidatos importantes en la respuesta inmune e inflamatoria como el - 889 C/T de *IL-1 alfa*⁵⁰, el 260 C/G de *TPSN*⁹⁸, el - 62 T/A del inhibidor *NF-kB*⁷¹ y el - 28 C/G, -109 G/A y - 403 G/A de *CCL5* o Rantes⁸⁴.

Objetivo general

- ☐ Determinar si los polimorfismos localizados en genes candidatos involucrados en la respuesta inmune e inflamatoria están asociados a la susceptibilidad o protección de la ARJ en una muestra de pacientes pediátricos mexicanos.

Objetivos particulares

- ☐ Conocer la frecuencia de los SNPs en los genes de *IL-1alfa*, *RANTES*, *TPSN* e *IkBL1* en la muestra estudiada tanto en individuos sanos como afectados con ARJ.
- ☐ Determinar si existen alelos de riesgo o protección en los genes estudiados.
- ☐ Contribuir en el conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad.

Estrategia Experimental

Población de estudio

Los pacientes diagnosticados clínicamente como ARJ y sus padres fueron captados del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Nacional de Pediatría (INP), del Hospital General Centro Médico "La Raza" y del Hospital Infantil de México. Los controles fueron individuos sanos, libres de enfermedad y sin antecedentes de algún tipo de inflamación crónica o cualquier otra enfermedad autoinmune, obtenidos del banco de sangre del Instituto Nacional de Pediatría, SS. A cada paciente se le extrajo el DNA a partir de sangre periférica.

Extracción de sangre periférica de casos y controles

A todos los pacientes con sus padres y los controles se les tomó una muestra de 5 - 10 ml de sangre periférica por venopunción. Se empleó EDTA como anticoagulante.

La extracción del DNA genómico fue a partir de los leucocitos totales a partir del kit Maxi-Kit Quiagen, y se obtuvo a través del siguiente procedimiento:

1. En un tubo falcon de 15 ml se agregaron 5 ml de sangre periférica y 200 μ l de proteasa.
2. Al mismo tubo se le agregó 6 ml de buffer AL (buffer de lisis) teniendo cuidado de que no entre en contacto el buffer directamente con la proteasa ya que la inactiva.
3. Se agitó suavemente durante 15 segundos y posteriormente se mezcló vigorosamente en un vortex durante 1 minuto.

4. Se incubó a 70 °C por 10 minutos en un baño maría.
5. Se le agregaron 10 ml de etanol absoluto frío y se agitó suavemente durante 15 segundos, posteriormente se agitó vigorosamente durante 1 minuto en un vortex.
6. Después la mitad del producto se paso por una columna contenida en un tubo falcón nuevo de 50 ml, y se centrifugó a 5, 000 r.p.m., durante 3 minutos.
7. Se desechó el filtrado y se vació a la columna el resto de producto que quedo en el tubo falcon original, y nuevamente se volvió a centrifugar a 5, 000 r.p.m., durante 3 minutos.
8. Se desechó el filtrado y se agregaron 5 ml de buffer AW1 (buffer de lavado) a la columna, posteriormente se centrifugó a 5,000 r.p.m., durante 1 minuto.
9. Se decantó el filtrado y se agregó el segundo buffer de lavado AW2 (5 ml) a la columna, posteriormente se centrifugó a 5, 000 r.p.m., durante 15 minutos.
10. Las columnas se pasaron a nuevos tubos.
11. Al nuevo tubo se le agregaron 1 000 µl de buffer AE (buffer de elusión del DNA).
12. Finalmente se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente y se centrifugó a 5, 000 r.p.m., durante 2 minutos.

Repurificación de DNA de pacientes que presentaban degradación genómica con el midi-kit QIAquick.

Un banco de DNA de algunos pacientes con ARJ fueron captados en 1999, cuando se observó la integridad del DNA de estos pacientes en geles de agarosa se observaron bandas de DNA degradadas, por lo cual se procedió a repurificar esos productos de DNA con el kit midi-kit.

- ▶ A la muestra de DNA se le agregó Tris-EDTA (TE) hasta alcanzar un volumen de 200 μ l, posteriormente se le agregaron 20 μ l de proteinasa K en un tubo eppendorf de 1.5 μ l
- ▶ Se le agregaron 200 μ l de buffer AL al tubo eppendorf.
- ▶ Las muestras se incubaron a 56 °C durante 30 minutos.
- ▶ Después de la incubación se centrifugó la muestra con un spin.
- ▶ Se agregaron 200 μ l de etanol (96 - 100 %) a la muestra y se agitó durante 15 segundos, posteriormente se centrifugó con un spin
- ▶ Se agregó la mezcla a una columna que estuvo en un tubo contenida el un tubo eppendorf nuevo y se centrifugó a 8,000 r.p.m., durante 2 minutos
- ▶ Se agregaron 500 μ l AW1 y se centrifugó a 14,000 r.p.m., durante 1 minuto
- ▶ Se decantó el filtrado y se añadieron 500 μ l de buffer AW2, posteriormente se centrifugó a 14,000 r.p.m., durante 5 minutos

- ▶ La columna se colocó en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 µl
- ▶ Se agregaron 75 µl de buffer AE a la columna y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente.
- ▶ Se colocó la muestra en un tubo eppendorf nuevo, y se rotuló para saber que muestra era, posteriormente se cuantificó.
- ▶ Después se hizo un gel de agarosa al 1 % para ver la integridad del DNA re-purificado.

Cuantificación del DNA

Una vez que obtuvimos el DNA genómico de los casos y los controles se procedió a cuantificar el DNA total de cada caso y cada control. Para realizar este procedimiento utilizamos el equipo automatizado nanoDrop, modelo ND-1000 spectrophotometer. La cuantificación del DNA se leyó a una longitud de onda de 280 nanómetros. Los datos obtenidos de la cuantificación de cada muestra fue diluida, estas diluciones fueron empleadas para sintetizar fragmentos genómicos y para analizar diversos SNPs en diferentes genes de interés al estudio.

Diluciones del DNA de los casos - controles y producción de las placas de PCR para discriminación alélica

Para realizar los experimentos de discriminación alélica en el equipo de Tiempo Real se realizaron diluciones del DNA de cada uno de los pacientes con ARJ y de los individuos sanos. Para obtener resultados confiables se homogenizaron las diluciones de los individuos que entraron a participar en este estudio. Para obtener las diluciones y las placas se realizó lo siguiente:

1. Las diluciones para discriminación alélica en el equipo de tiempo real se hicieron a una concentración de 5 ng/μl. Por lo que todas las muestras se diluyeron con agua destilada libre de DNasa, proteasas, etc (Gibco).
2. Posteriormente se hizo una placa maestra de 96 pozos con un volumen de 100 μl a una concentración de 5 ng/μl cada pozo. Noventa y dos pozos representan muestras de pacientes mientras que 4 son controles negativos.
3. A partir de esta placa maestra se tomaron 2 μl de cada pozo con una pipeta multicanal y se colocaron en varias placas hijas para que el DNA se evaporara.
4. Posteriormente el DNA liofilizado quedó listo para ser analizado con las diferentes sondas Taqman para los diferentes SNPs de los genes candidatos que fueron analizados en este estudio.

Discriminación alélica con el método fluorescente de 5' exonucleasa (Taqman).
Para obtener múltiples copias de la secuencia donde estaba el polimorfismo a analizar de cada gen se requirió hacer una PCR convencional, para esto Applied Biosystem sintetiza la sonda y envía en el mismo vial un par de primer's que flanquean el SNP a analizar (ver mezcla de reacción).

Condiciones de PCR

pre-PCR

50 °C por dos minutos

95 °C por diez minutos

► PCR

2 temperaturas, 45 ciclos

95 °C durante 0.15 segundos

60 °C durante 1 minuto

4 ^{-x)}

1. La mezcla de reacción para la discriminación alélica consistió en lo siguiente:

> 0.125 µl de sonda para analizar el SNP junto con el par de primer's específicos para cada SNP

> 0.125 de mezcla de reacción (enzima, buffer, cloruro de magnesio)

> 0.375 de agua

2. A cada pozo de la placa de 96 se le agregaron 5 µl de mix.

3. Las diferentes placas con el DNA liofilizado se analizaron para los diferentes SNPs en los genes - 28 C/G, -109 C/T y -403 G/A de *CCL5*, - 889 C/T de *IL1 alfa*, - 62 T/A de *IKBL1* y 260 C/G de *TPSN*.

4. Cada placa fue leída por un láser del equipo de Tiempo Real y los datos escaneados fueron proporcionados por el software SDS 2.2 (Applied Biosystem) (ver diagrama de flujo) (figura 21).

5. Posteriormente se capturaron manualmente los genotipos de cada individuo (casos y controles) para analizar su frecuencia alélica y genotípica.

6. Finalmente se emplearon los programas bioestadísticas y bioinformáticos Epilinfo, Epidat y Finetti para calcular el equilibrio de Hardy-Weinberg y los riesgos de cada SNP en la susceptibilidad o protección en la enfermedad.

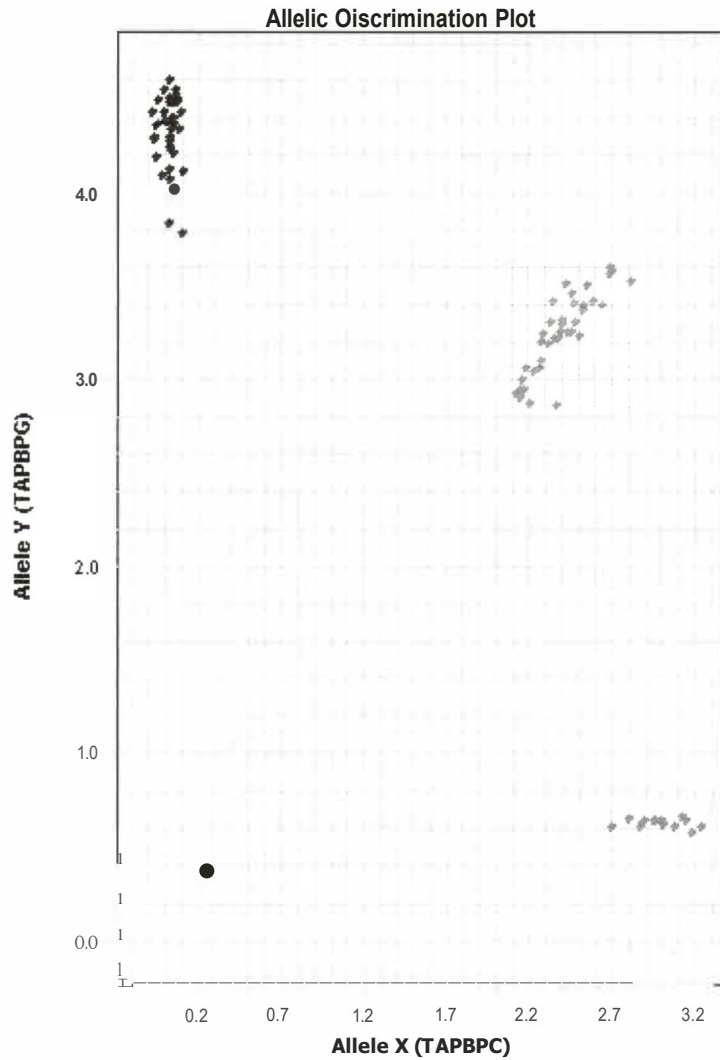


Figura 21. **Plot que muestra los genotipos de un SNP.** Esta imagen muestra los genotipos de 92 individuos con ARJ, el SNP analizado en esta imagen es el 260 C/G de gen *TAPBP*. Algunos individuos que tienen el genotipo C/C son detectados por la sonda Vic, mientras que otros que son homocigotos para G/G son detectados por la sonda Fam. Por otro lado, también hay individuos que presentan ambos alelos, ellos representan al genotipo heterocigoto. Los cuadros en negro son los controles negativos.

QUANTO: Software para calcular el tamaño de la muestra y el poder estadístico. Antes de iniciar los estudios moleculares se calculó el tamaño de muestra mínimo necesario para tener resultados que fueran óptimos para tener diferencias estadísticamente significativas. El programa que empleamos para alcanzar este objetivo fue el QUANTO (<http://hydra.usc.edu/gxe>). Este software toma en cuenta diversos parámetros entre los que se encuentran: la prevalencia de la enfermedad en la población, la frecuencia del SNP en la población, el nivel de significancia estadística, el poder estadístico, modelo de herencia de la enfermedad, OR, etc. El tamaño de muestra requerida con un modelo de herencia recesivo para este estudio de acuerdo al número de los 350 controles fue de 122 individuos afectados con ARJ. Con este número mínimo se esperaban diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.05$), además de un poder estadístico del 80 %.

FINETTI: programa de análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg

El equilibrio de Hardy-Weinberg se analizó mediante el programa bioinformático y bioestadístico FINEm (ejemplo tabla 7) ¹⁰⁰. El programa FINEm es robusto debido a que proporciona los resultados del equilibrio de Hardy-Weinberg en base al cálculo de la X^2 mediante tres valores de p . FINETTI proporciona además valores de riesgo, nivel de significancia estadística, intervalo de confianza, X^2 , etc., para los estudios de casos y controles (ver tabla 7).

Tabla 7. Tabla obtenida de FINETTI. Ejemplo de análisis de equilibrio de Hardy - Weinberg y de asociación casos y controles mediante el programa FINETTI.

SNP	Controls	Cases	Heterozygosity				
			Hardy-Weinberg	Chi2	p	Odds ratio	CI
SNP1	n11=339 (339.09) n12=11 (10.93) n22=0 (0.09) f _{al} =0.98 +/-0.005 F=-0.01597 p=0.765184 (Pearson) p=0.675161 (Lr) p=1.000000 (Exact)	n11=129 (129.03) n12=4 (3.94) n22=0 (0.03) f _{al} =0.98 +/-0.007 F=-0.01527 p=0.860239 (Pearson) p=0.804811 (Lr) p=1.000000 (Exact)	Risk allele 2				
			[11]<->[2]	[11]<->[12]	[11+1]<->[22]	[11]<->[12+22]	common odds ratio
			Odds ratio=0.956 C.I.=[0.302-3.030] chi2=0.01 p=1.00144 (F)	Odds ratio=0.956 C.I.=[0.299-3.055] chi2=0.01 p=0.93895	Odds ratio=2.622 C.I.=[0.052-132.813] chi2=NaN p=1.00000	Odds ratio=0.956 C.I.=[0.299-3.055] chi2=0.01 p=0.93895	Odds_ratio=0.956 p=0.93895
			Risk allele 1				
			[2]<->[1]	[22]<->[12]	[22]<->[11]	[11+12]<->[22]	common odds ratio
			Odds ratio=1.046 C.I.=[0.330-3.313] chi2=0.01 p=1.00144 (F)	Odds ratio=0.391 C.I.=[0.007-22.882] chi2=NaN p=1.00000	Odds ratio=0.391 C.I.=[0.008-19.324] chi2=NaN p=1.00000	Odds ratio=0.391 C.I.=[0.008-19.293] chi2=NaN p=1.00000	Odds_ratio=0.857 p=0.9325

EPI-INFO VERSIÓN 3.3.2 Y EPIDAT VERSIÓN 3.1: programas para análisis de asociación.

Para corroborar los resultados obtenidos del programa FINETTI del riesgo, valores de significancia estadística p , intervalo de confianza y X^2 se emplearon dos programas bioinformáticos y bioestadísticos comunes para este tipo de estudios, uno de ellos es EpiInfo versión 3.3.2 (figura 22) ¹⁰¹ y el programa para análisis epidemiológico de datos tabulados Epidat versión 3.1 (figura 23) ¹⁰². De acuerdo a estos tres programas se obtuvieron los resultados de los valores de riesgo, IC, X^2 y valor de p y se concluyó si hubo diferencias estadísticamente significativas y asociación alélica entre cada uno de los SNP y la artritis reumatoide juvenil.

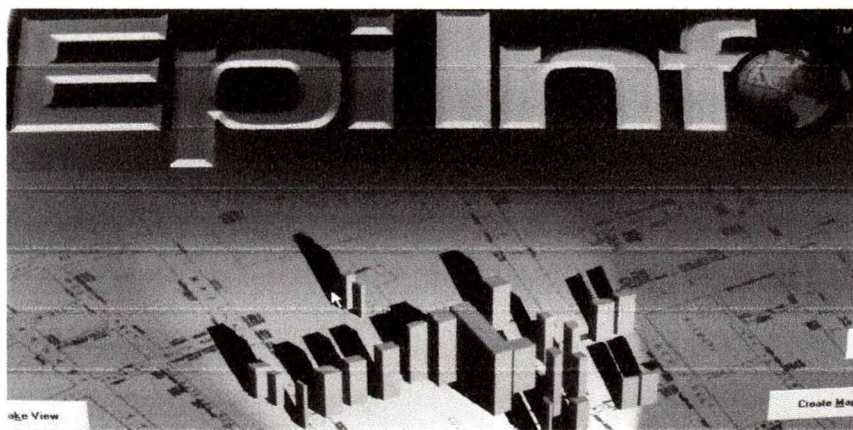


Figura 22. Logotipo del programa Epilnfo. Software estadístico que se empleó para analizar resultados obtenidos de los estudios de casos y controles.



Figura 23. Logotipo del programa Epidat. Software estadístico que se empleó para corroborar los resultados obtenidos de casos y controles de los programas FINETII y Epilnfo.

Estrategia experimental

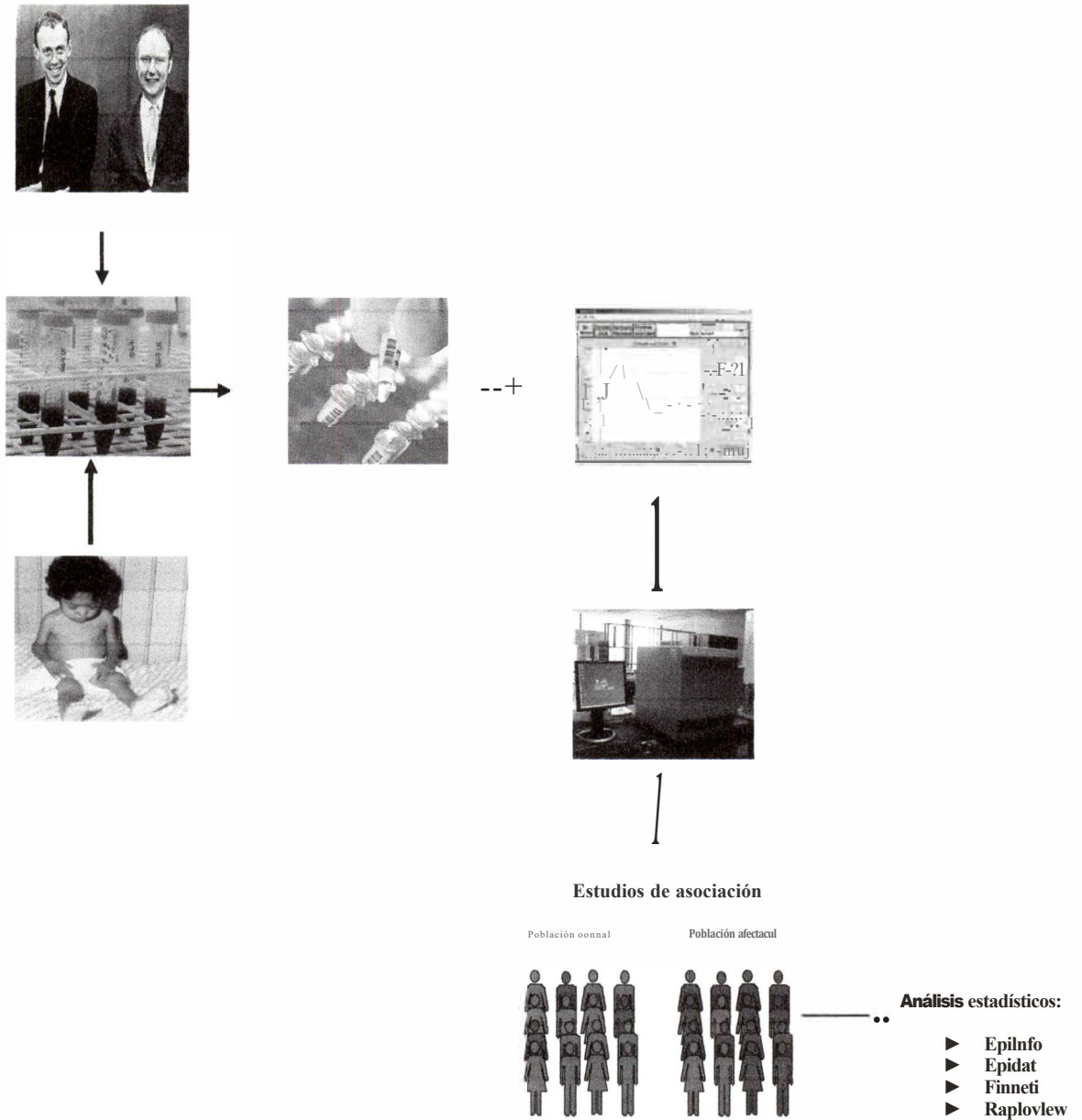


Figura 24. Estrategia experimental seguida en este estudio.

Resultados

Número de pacientes y controles analizados en este estudio.

En este estudio de casos y controles se analizaron 133 pacientes menores de 16 años con diagnóstico clínico de artritis reumatoide juvenil, este grupo de pacientes pediátricos incluyó a 74 individuos del sexo femenino y 59 varones. También se incluyeron 350 individuos sanos adultos, de los cuales 240 de estos fueron mujeres y 110 fueron varones (figura 25 y 26).

Los pacientes con ARJ fueron colectados de varios Hospitales e Instituciones de Salud Pública ubicados en la ciudad de México, los cuales son centros nacionales de referencia para captar pacientes de diversas partes de la Republica Mexicana, entre los Hospitales e Institutos de donde se colectaron las muestra fueron del Centro Médico Siglo XXI del IMSS, Hospital Infantil de México, Centro Médico la Raza y el Instituto Nacional de Pediatría (INP), siendo el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI el que más muestras de sangre periférica aportó para este estudio, y el INP el que menos aportó (figura 27).

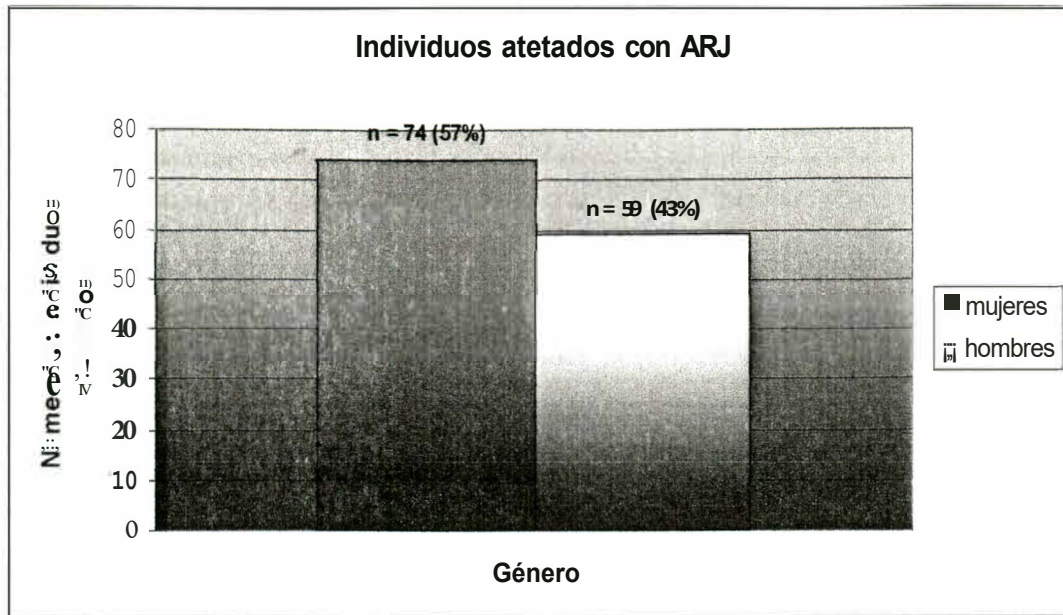


Figura 25. Gráfica que representa al número de individuos afectados con ARJ. Se observa que en este estudio las mujeres presentan un número mayor de individuos afectados en relación a los varones.

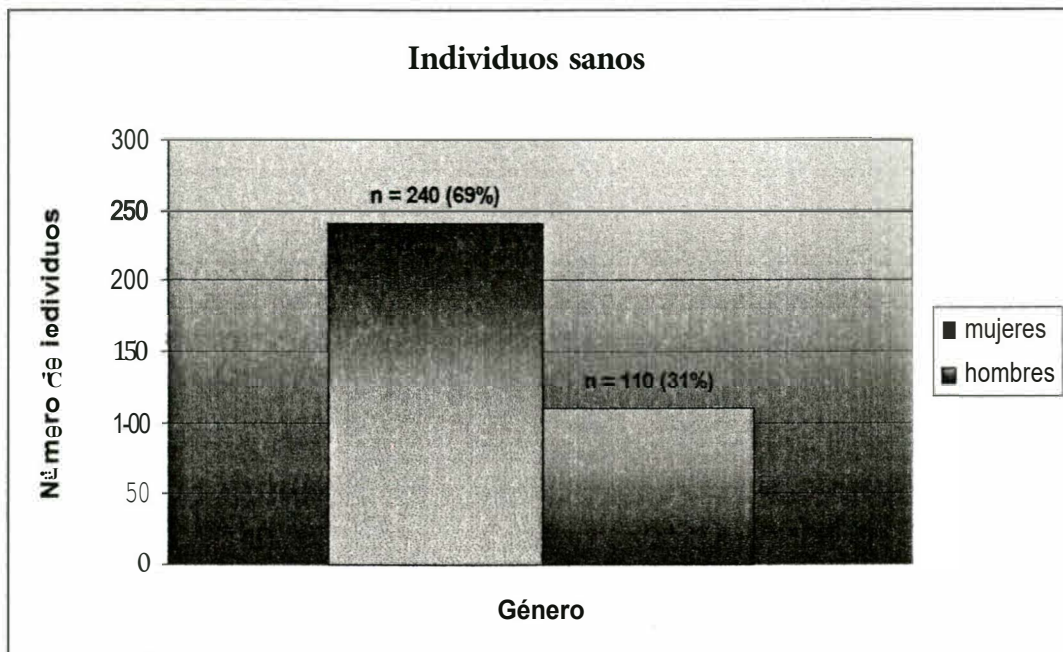


Figura 26. Gráfica que representación el número de controles. En este estudio el número de mujeres sanas recolectadas del INP fue mayor al de los varones.

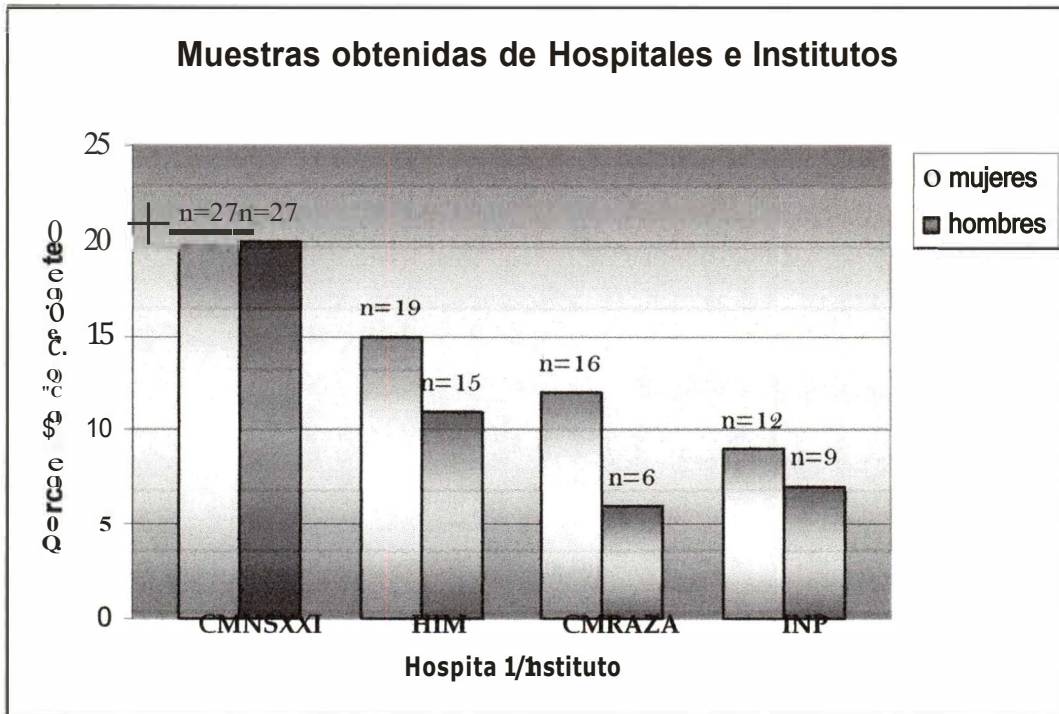


Figura 27. Gráfica que representación el número de individuos afectados captados de diferentes hospitales e institutos de salud pública de la Ciudad de México. El Hospital que más muestras de sangre periférica capturó fue el CMNSXXI, IMSSS, y el que menos capturó fue el INP, SS.

Integridad del DNA de pacientes

El primer paso fue observar la integridad del DNA de 100 muestras de pacientes con ARJ contenidos en un banco de DNA generado de 1999 - 2001 en geles de agarosa al 1%. El DNA de 8 pacientes con ARJ mostró degradación importante (figura 28), por lo que se realizó la repurificación de todas las muestras con el Kit de repurificación QIAquick, sin embargo, la cantidad de DNA genómico disminuyó de más de 300 ng/ μ l a aproximadamente 100 ng/ μ l (figura 29).

Pacientes 1 2 3 4 5 6 7 8

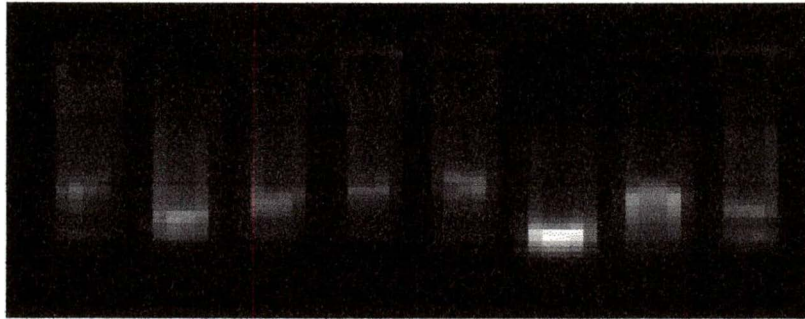


Figura 28. Integridad del DNA en un gel de agarosa al 1% de 8 pacientes con ARJ de 1999. Lo que se observa aquí es una alta degradación en el DNA de los pacientes analizados.

Pacientes 1 2 3 4 5 6 7 8

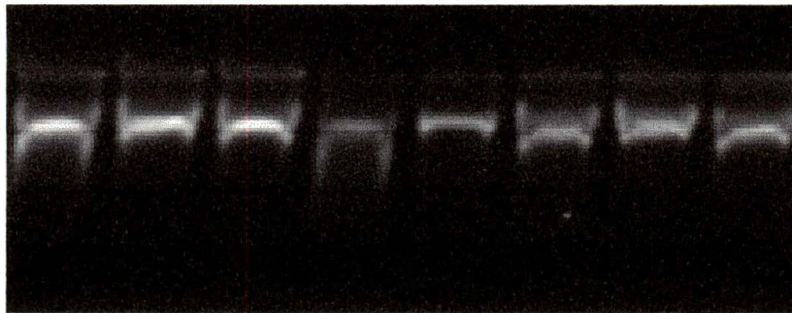


Figura 29. Integridad del DNA en un gel de agarosa al 1% de 8 pacientes con ARJ **después del proceso de repurificación** se observó DNA genómico de alto peso molecular, sin embargo al momento de cuantificarlo disminuyó su concentración.

Posteriormente a esto se colectaron muestras de sangre periférica de 33 pacientes más con ARJ y se les hizo la extracción del DNA genómico. En la figura 30 se presenta un gel de agarosa al 1 % para observar la integridad del DNA genómico de cuatro pacientes con ARJ y 3 individuos sanos (figura 27). Cabe señalar que para realizar los ensayos de discriminación alélica con el equipo de PCR en tiempo real (Applied Biosystem 7900) se requieren al menos 2 ng de DNA por cada μ l de

agua. De esta manera todas las muestras de los pacientes independientemente de la concentración de DNA que tuvieran se homogenizaron mediante dilución a 5 ng/ μ l (figura 31).

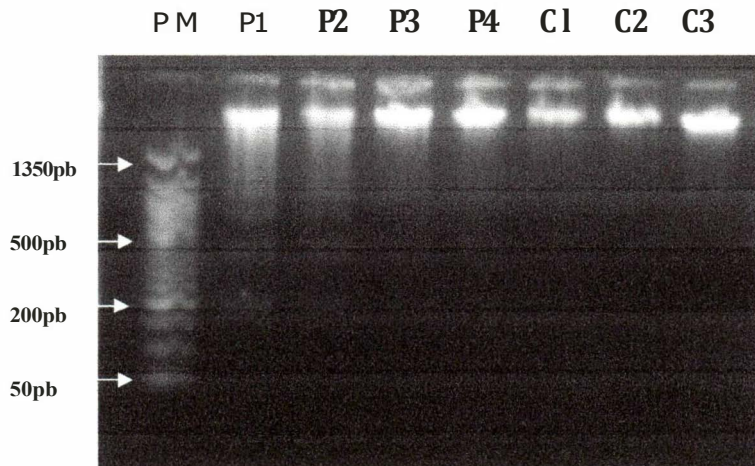


Figura 30. Electroforesis de agarosa al 1% que muestra la integridad del DNA genómico extraído de 4 pacientes (P1-P4) y 3 controles (C1-C3). Se observó en el gel de agarosa que el DNA genómico es de alto peso molecular y presenta poca degradación genómica.

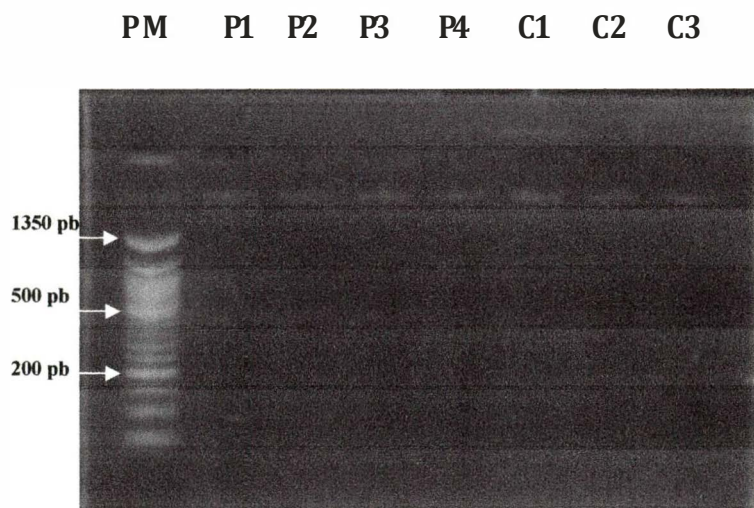


Figura 31. Electroforesis de agarosa al 1% que muestra las diluciones de las muestras de DNA de 4 pacientes (P1-P4) y 3 controles (C1-C2). Para realizar ensayos de discriminación alélica de los SNPs en el equipo de PCR en tiempo real se requieren una dilución mínima de 2 ng/ μ l de DNA genómico por cada individuo analizado.

SNPs analizados en este estudio

En la tabla 8 se muestran los SNPs que se analizaron en los diferentes genes que participan en la regulación del sistema inmune e inflamatorio en los individuos sanos y afectados con artritis reumatoide juvenil, así como su ubicación dentro del genoma, ubicación dentro del gen y su rs.

Tabla 8. SNPs que se analizaron en el presente estudio

Polimorfismos en genes candidatos en ARJ analizados en el presente estudio				
Gen	locus	SNPs		rs
<i>IL1A</i>	2q14	- 889 G/A		1800587
<i>CCL5</i>	17q 11	- 28 C/G		2280788
<i>CCL5</i>	17q11	- 109 C/T		1800825
<i>CCL3</i>	17q11	- 403 G/A		2107338
<i>JKBL</i>	GpZ 1.3	- 62 A/T		2971392
<i>TPSN</i>	G.p23	2G0C/G Thr	Arg	2071888

Análisis del equilibrio de Hardy- Weinberg

Tanto los casos como los controles estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg para cada uno de los 6 SNPs analizados en los diferentes genes, por lo tanto se puede sugerir que no hay estratificación poblacional en nuestra muestra de estudio.

Análisis de los SNPs -28 C/G, -109 C/T y -403 G/A del gen *CCL5* o *RANTES*

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs - 28 C/G, -109 C/T y - 403 G/A del gen *CCL5* no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los casos con ARJ y los controles (ver tabla 9).

Cuando las frecuencias alélicas y genotípicas se estratificaron por sexo tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas (información no mostrada), de esta manera el alelo G del SNP - 28 de *CCL5* que representa la susceptibilidad en población China, no está asociado a la susceptibilidad con la ARJ en la población pediátrica mexicana analizada.

Tabla 9. Análisis del SNPs - 28 C / G (rs 2280788) del gen CCLS en ARJ y controles						
Genotipo	Casos n = 133 (%)	Controles n = 350 (%)	Comparación genotipos	OR (95%IC)	X ²	p
C/C	129 (97.0)	339 (96.9)	C/CvsG/G	2.62 (0.05-132.8)	NaN	1.00
C/G	4 (3.0)	11 (3.1)	C/C vs C/G	0.96 (0.29-3.05)	0.01	0.94
G/G	0 (0)	0 (0)				
Alelo	casos n=266(%)	controles n=700(%)		OR (95% IC)	x ²	p
e	262 (98.5)	689 (98.4)				
G	4 (1.5)	11 (1.6)		0.96 (0.30-3.03)	0.01	1.00

Posteriormente se analizó el SNP - 403 G/A del gen CCLS, los resultados obtenidos no mostraron diferencias estadísticamente significativas a pesar que si hubo diferencias en porcentajes entre los pacientes con ARJ y controles (tabla 10). Posteriormente los genotipos de casos y controles fueron estratificados por sexo; mujeres-mujeres, hombres-hombres sin que estos análisis mostraran diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados). La tabla 10 muestra tanto el número de casos como controles analizados, los porcentajes, los valores de riesgo, intervalo de confianza, X² y valor de p fueron obtenidos en este estudio por medio de los programas bioestadísticos y bioinformáticas EpiInfo y Epidat. El alelo de riesgo A del SNP - 403 G/A del gen CCLS no está asociado a la susceptibilidad de la ARJ en la muestra pediátrica analizada.

Tabla 10. Análisis del SNPs - 403 G / A (rs 2107538) del gen *CCLS* en ARJ y controles

Genotipo	Casos n=133 (%)	Controles n= 350 (%)	Comparación genotipos	OR (95%IC)	X ²	P
G/G	61 (45.9)	171 (48.9)	G/G vs A/A	1.36 (0.72-2.60)	0.87	0.35
G/A	55 (41.4)	144 (41.1)	G/G vs G/A	1.07 (0.69-1.64)	0.10	0.75
A/A	17 (12.7)	35 (10.0)	G/G vs G/A+ A/A	1.12 (0.75-1.68)	0.35	0.55

Alelo	Casos n=230(%)	Controles n=500(%)	OR (95% IC)	x ²	p
G	177 (66.5)	486 (69.4)			
A	89 (33.5)	214 (30.6)	1.12 (0.69 - 1.80)	0.23	0.63

Posteriormente se buscó e identificó otro SNP que estuviera también en la región promotora del gen *CCLS*, para hacer esta búsqueda utilizamos la pagina de NCBI y también el programa *SNPper* ⁴⁵. Cabe mencionar que *SNPper* identifica no sólo al SNP dentro o cercano al gen sino además proporciona la ubicación real del SNP a través de todo el gen o genes que se conocen, por otro lado la página de SNPs de NCBI sólo proporciona datos de los SNPs que están dentro del gen y no de los que están en la región promotora o cercana al gen. Con el programa *SNPper* ⁴⁵ identificamos otro SNP que se encuentra en la región promotora del gen *CCLS*, la ubicación exacta del SNP está en la posición -109 y el cambio identificado es C/T. Posteriormente se buscó *in silico* si este SNP estaba en un posible sitio consenso de unión a un determinado factor de transcripción involucrado en la respuesta

inmune e irúlamatoria. En un artículo previamente publicado Liu H y cols.,⁸¹ identificaron que cerca de esta posición había un posible factor de transcripción (IL-NF6) que se podía unir a esta región, lo que ellos no identificaron fue al SNP en su población estudiada esto debido a que este polimorfismo no existe en su población. Después empleamos el programa bioinformático *MAPper*¹⁰³ para identificar otros posibles factores de transcripción que se unieran cerca o en la región - 109 de CCLS, con este programa identificamos que otro posible factor de transcripción se podía unir a esta secuencia, el posible factor de transcripción encontrado *in szlico* fue IRF3.

Se diseñaron los oligonucleótidos y las sondas para el ensayo de Taqman para este SNP y se determinó si los genotipos o alelos estaban asociados a la ARJ. Los resultados obtenidos del SNP - 109 C/T de CCLS no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles en la población estudiada. En la tabla 11 se muestran el número total de pacientes y controles analizados, así como el porcentaje, los valores de riesgo, intervalo de confianza, X^2 y p .

Una vez que se realizaron los cálculos entre todos los casos y controles se procedió a analizar las frecuencias de los genotipos y alelos de los casos y controles pero estratificados por sexo; es decir, mujeres-mujeres, hombres-hombres sin que ninguno de ellos mostraran diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados). Podemos concluir entonces que este SNP ubicado en la región reguladora - 109 C/T de CCLS no está involucrado en la susceptibilidad de la ARJ en población pediátrica mexicana.

Tabla 11. Análisis del SNPs - 109 T/ C (rs 1800825) del gen CCLS en ARJ y controles

Genotipo	Casos n= 133 (%)	Controles n= 350 (%)	Comparación genotipos	OR (95%IC)	χ²	p
T/T	104 (78.2)	278 (79.4)	T/T vs C/C	0.89 (0.09-8.66)	0.01	0.92
T/C	28 (21.1)	69 (19.7)	T/C vs C/C	1.08 (0.66-1.77)	0.10	0.74
C/C	1 (0.70)	3 (0.90)	C/C vs C/T + T/T	1.07 (1.12-1.75)	0.09	0.76

Alelo	casos n= 266 (%)	controles n= 700 (%)	OR (95%IC)	χ²	p
T	236 (88.7)	625 (89.3)			
c	30 (11.3)	75 (10.7)	1.05 (0.67-1.66)	0.60	0.80

Después de que se analizaron los SNPs en forma individual y aislada se procedió a construir haplotipos con estos tres SNP - 28 C/G, -109-T/C y - 403 G/A del gen CCL5. Como es bien sabido en muchos casos los SNP individuales no están asociados a la enfermedad, sin embargo, pueden en muchos casos los haplotipos formados por estos pueden estar asociados o involucrados con la susceptibilidad y/o protección de la enfermedad. La construcción de los haplotipos se realizó con el programa del Hapmap internacional; Haploview ¹⁰⁴.

Los resultados obtenidos mostraron 17 combinaciones de SNPs (haplotipos) entre estos 3 marcadores genéticos ubicados en la región promotora de CCLS (ver tabla

12). A pesar de encontrar varios haplotipos con diferentes porcentajes entre casos y controles, ninguno de ellos mostró diferencias estadísticamente significativas.

De los 17 haplotipos, 3 son mostrados en la figura 32, estos haplotipos solo se ponen para representar al número y porcentaje de los casos y controles analizados, además se ponen los haplotipos que pueden representar susceptibilidad en nuestra población - 28 G y - 403 A, -109 C y - 403 A, y-28 C, -109 T y - 403 G, este último se puso en la gráfica por que fue el haplotipo más frecuente entre los tres SNPs. Sin embargo, ninguno de ellos estuvo asociado a la ARJ en la población pediátrica mexicana estudiada.

Tabla 12. Haplotipos identificados de los SNPs - 28 qG, -109 C/f y - 403 G/A del gen CCL5. De nuestro estudio obtuvimos 17 haplotipos diferentes, en esta tabla representamos las diferentes combinaciones de los tres SNPs analizados del gen CCL5.

-28	-109	-403
e	T	
G	T	
e	e	
e		G
G		G
e		A
le		A
	T	G
	e	G
	T	A
	le	A
ie	T	G
G	T	G
e	e	G
e	T	A
G	T	A
e	e	A

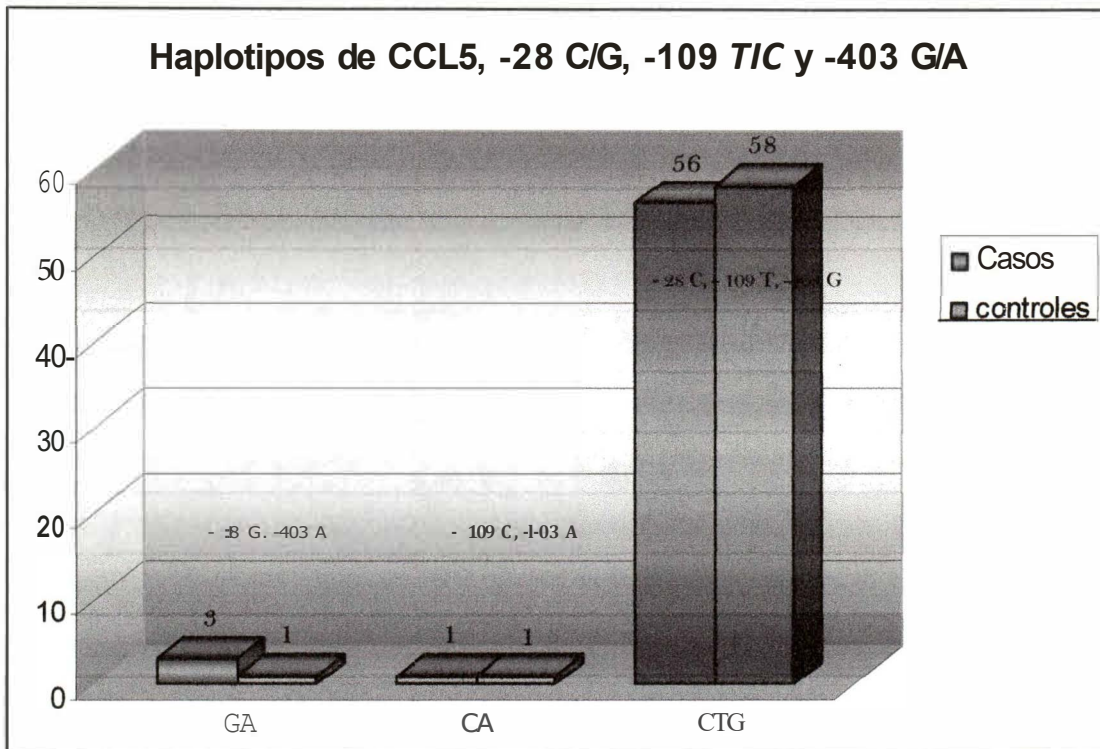


Figura 32. **Representación de tres haplotipos.** Los haplotipos se obtuvieron mediante el software Haploview, tres de ellos se representan aquí, ninguno presentó grandes diferencias en porcentajes, los primero dos haplotipos (GA y CA) son los reportados como de susceptibilidad, el haplotipo CTG fue el más frecuente en nuestra población.

Análisis del SNP T/C-889 del gen IL-1a

Otro SNP analizado en este trabajo fue el - 889 T/C del gen que codifica a la IL-1a. Cuando se comparó el número total de genotipos y alelos entre todos los casos y controles no se observaron diferencias estadísticamente significativas (tabla 13), sin embargo cuando las frecuencias genotípicas y alélicas se compararon por sexo; se observaron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles varones, no así en mujeres (tabla 14), sin embargo el genotipo identificado nos proporcionó un OR de protección y no de susceptibilidad como previamente había sido reportado (tabla 15) Sin embargo con la p corregida la asociación se pierde. En conclusión este SNP no está asociado con protección en pacientes pediátricos con ARJ.

Tabla 13. **Análisis de asociación del SNP - 889 C/f del gen *IL-1a* en casos y controles.** En esta tabla se muestran los valores de riesgo, IC, χ^2 y valor de p.

Genotipo	Casos n=133(%)	Controles n= 350(%)	Comparación genotipos	OR (95%IC)	χ^2	p
C/C	88 (66.2)	219 (62.6)	C/C vs T/T	1.7 (0.51-2.70)	0.15	0.697
C/T	36 (27.0)	112 (32.0)	C/C vs C/T	0.8 (0.51-2.70)	0.95	0.330
T/T	9 (6.8)	19 (5.4)	C/C vs T/A +T/T	0.85(0.56-1.30)	0.54	0.463

Alelo	casos n= 266(%)	controles n= 700(%)	OR (95%IC)	χ^2	p
e	212 (79.7)	550 (78.6)			
T	54 (20.3)	150 (20.3)	0.94 (0.65-1.32)	0.14	0.70

Tabla 14. **Análisis del SNP - 889 C/f del gen *11-la*.** Comparación de los genotipos y alelos entre mujeres tanto en casos y controles.

Genotipo	Casos n= 74(%)	Controles n= 240(%)	Comparación genotipos	OR (95%/C)	χ^2	p
C/C	88 (66.2)	219 (62.6)	C/C vs T/T	1.7 (0.51-2.70)	0.15	0.697
C/T	36 (27.0)	112 (32.0)	C/C vs C/T	0.8 (0.51-2.70)	0.95	0.330
T/T	9 (6.8)	19 (5.4)	C/C vs T/A +T/T	0.85(0.56-1.30)	0.54	0.463

Alelo	casos n= 148(%)	controles n= 480(%)	OR (95%/C)	χ^2	p
e	117(79.0)	382 (79.6)			
T	31 (21.0)	98 (24.4)	0.94 (0.65-1.32)	0.147	0.70

Tabla 15. Análisis de asociación del SNP - 889 C/f del gen *IL* - 1a. Comparación de genotipos y alelos entre varones casos y controles, valores de OR, IC, etc.

Genotipo	Casos n= 59(%)	Controles n= 110(%)	Comparación genotipos	OR (95% IC)	x ²	p
C/C	41 (69.5)	63 (57.3)	C/C vs T/T	1.53 (0.41-5.64)	0.42	0.514
C/T	13 (22.0)	42 (38.2)	C/C vs C/T	0.47 (0.22-0.99)	4.00	0.045
T/T	5 (8.5)	5 (4.5)	C/C vs C/T +T/T	0.58 (0.30-1.15)	2.42	0.119

Alelo	casos n= 118(%)	controles n= 220(%)	OR (95% IC)	x ²	p
C	95 (80.5)	168 (78.4)			
T	23 (19.5)	52 (23.6)	0.78 (0.45-1.35)	0.76	0.38

Análisis del SNP - 62 T/A del gen *IKBL*

La comparación de las frecuencias tanto de genotipos como de alelos del SNP - 62 T/ A del gen *IKBL* fue analizada por conteo directo entre todos los casos y los controles. Los valores de riesgo, intervalo de confianza, X² y p se presentan en la tabla 16. Cuando se compararon los 133 pacientes con ARJ y los 350 individuos sanos se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de los genotipos y los alelos (ver tabla 16), aún después de la corrección por la prueba de Bonferroni. Sin embargo el valor de riesgo fue diferente al que previamente se había reportado, es decir de protección y no de susceptibilidad como había sido reportado en población Japonesa (tabla 16) ⁸⁷.

Cuando se compararon las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP - 62 T/ A de *IKBL* se observarán diferencias estadísticamente significativas (datos no

mostrados), solo entre los varones con ARJ y varones controles con un OR de 0.44, y un intervalo de confianza de 0.24 - 0.79, χ^2 7.63 y una p de 0.0057. El valor de p después de la corrección de Bonferroni fue de 0.0114. El poder estadístico para este SNP fue calculado con el programa QUANTO y fue de 0.083 (ver tabla 17). De acuerdo con los datos obtenidos muestran resultados que sugieren que este SNP confiere protección en varones con ARJ en nuestra población.

Tabla 16. **Comparación de genotipos y alelos del SNP - 62 T/A entre mexicanos y japoneses.** En la parte superior se muestra el análisis de asociación del SNP - 62 T/A de *IKBL* en población pediátrica mexicana, en la parte inferior se muestran los de la población japonesa.

Genotipo	Casos n= 133(%)	Controles n= 350(%)	Comparación genotipos	OR (95%IC)	χ^2	p	corrección Bonferroni
T/T	47 (35.3)	148 (42.3)	T/T vs A/A	0.44 (0.24-0.79)	7.63	0.005	0.0114
T/A	58 (43.6)	163 (46.6)	T/T vs TA	0.89 (0.56-1.43)	0.25	0.615	
A/A	28(21.U)	39 (11.1)	T/A vs A/A	U.49 (U.28-U.87)	5.93	U.015	U.03

Alelo	casos n= 266(%)	controles n= 700(%)	OR (95%IC)	χ^2	p	C Bonferroni
T	152 (42.9)	59 (65.6)	0.70 (0.52-0.93)	5.89	0.015	0.03
A	114 (42.9)	241 (34.4)				

Genotipos asociados de IKBL-62 en población Japonesa

Genotipos	Casos n= 116(%)	Controles n= 100(%)	OR (95% IC)	χ^2	P
T/T	60 (57.7)	34 (34.0)	2.08 (1.41-3.07)	6.86	0.0088
T/A	47 (35.4)	51 (51.0)	0.65 (0.45-0.96)	2.38	0.12

Tabla 17. Análisis de asociación del SNP - 62 T/A de *IKBL*. Tabla que muestra valores OR, IC, X², significancia estadística, además se muestra la asociación de los genotipos y alelos en varones.

Genotipo	Casos n= 59(%)	Controles n= 110(%)	Comparación genotipos	OR (95%IC)	X ²	p
T/T	21 (35.6)	49 (44.5)	T/T vs A/A	0.34 (0.13-0.85)	5.45	0.019
T/A	23 (39.0)	49 (44.5)	T/T VS T/A	0.37 (0.15-0.93)	4.63	0.031
A/A	15 (25.4)	12 (11.0)	T/T+ T/A vs A/A	0.35 (0.15-0.83)	6.03	0.014

Alelo	casos n= 118(%)	controles n= 210(%)	OR (95%IC)	X ²	p
T	65 (55.0)	147 (66.8)			
A	53 (45.0)	73 (33.2)	0.60 (0.38-0.96)	4.52	0.03

Análisis del SNP 260 C/G del gen *TAPBP*

El análisis de este SNP no sinónimo C/G Thr/Arg ubicado en el exon 4 se muestra en la tabla 18. El análisis de genotipos y alelos en este SNP mostró diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los casos y controles (tabla 18) pero no cuando se compararon por sexo (información no mostrada). El alelo de riesgo en este SNP es el G, el riesgo que confiere este SNP es de 1.4, con intervalo de confianza de 1.06 - 1.89 y una p de 0.016. Después de la corrección del valor de p por la prueba de Bonferroni (p = 0.032), no se perdió la asociación de susceptibilidad a desarrollar ARJ (tabla 18). Los genotipos también fueron comparados entre casos y controles mostrando diferencias estadísticamente significativas entre C/C vs G/G, con un OR de aproximadamente 2 (ver tabla 18). También se corrigió el valor de p obtenido de las comparaciones de los genotipos,

sin embargo la asociación se perdió con el genotipo C/C vs G/G ($p=0.054$), el genotipo C/C vs C/G + G/G se siguió conservando (OR: 1.57) (ver tabla 18). Nuestros resultados sugieren que este SNP se encuentra asociado a la susceptibilidad con la ARJ en pacientes pediátricos mexicanos con ARJ.

Tabla 18. Análisis del SNP 260 C/G del gen TAPBP en casos y controles. La distribución de genotipos y alelos en la población que estudiamos, además de los valores de OR, significancia estadística, IC, χ^2 , y corrección de Bonferroni, muestran asociación con la enfermedad

Genotipo	Casos n= 59(%)	Controles n= 110(%)	Comparación genotipos	OR (95%IC)	χ^2	P	Corrección Bonferroni
C/C	23 (17.3)	85 (24.3)	C/C vs G/G	1.88 (1.06-3.32)		0.027	0.054
C/G	57 (42.9)	161 (46.0)	C/C vs C/G	1.60 (0.92-2.75)		2.90	0.08
G/G	53 (39.8)	104 (29.7)	C/C vs C/G + G/G	1.57 (0.03-2.37)	7.67	0.005	0.01

Alelo	casos n= 266(%)	controles n= 700(%)	OR (95%IC)	χ^2	p	C. Bonferroni
e	103 (38.7)	331 (47.3)				
G	163 (61.3)	369 (52.7)	1.42 (1.06-1.89)	5.71	0.016	0.033

DISCUSIÓN

La artritis reumatoide juvenil representa la principal causa de artropatía infantil en diversas poblaciones. ¹ Esta enfermedad se caracteriza por una respuesta inmune desregulada principalmente del tipo Th1, cuando se altera ocasiona destrucción del cartílago y el huesos ¹⁰⁵, además, esta enfermedad puede afectar a otros órganos y sistemas ¹⁰. La etiología de la ARJ aún no está clara, aunque se ha propuesto la existencia de factores genéticos y ambientales involucrados en su génesis. ¹⁰ Algunas de estas propuestas actualmente no han podido ser replicadas en los laboratorios de investigación, sin embargo los estudios de heredabilidad proponen que el principal factor de riesgo para el desarrollo para el desarrollo de esta patología son los factores genéticos. El objetivo del presente estudio fue analizar SNPs en diversos genes que tienen un papel fundamental en la respuesta inmune tipo Th1.

En este estudio se analizaron 6 SNPs en 4 genes candidatos, 5 de ellos previamente reportados como alelos de susceptibilidad en diferentes poblaciones, y uno que no había sido reportado previamente.

Las frecuencias genotípicas tanto en los casos como en los controles se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que disminuye la posibilidad de que los resultados obtenidos en el presente trabajo sean el reflejo de la endogamia, posibles errores de tipificación de los pacientes con ARJ y controles, apareamiento no azaroso (estratificación poblacional), la presencia de mutación y la consecuencia de la migración en la población analizada ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

En un estudio previo en población asiática se observó asociación de los polimorfismos - 28 C/G y - 403 G/A localizados en la región promotora del gen *CCL5* o *Rantes*, con ARJ ⁸⁴ y lupus eritematoso sistémico ^{82-8.3}.

Un trabajo publicado en 1998 por Liu H y cols ⁸¹, demostró que ambos SNPs incrementaban la expresión de *CCL5*, lo que conferirían protección a pacientes infectados con el virus que provoca inmunodeficiencia humana, ya que *CCL5* es un ligando de *CCR5* que actúa como coreceptor del VIH ⁸¹. Por otra parte Wang R., y cols ⁸⁴, en el 2005 encontraron que el SNP - 403 G/A estaba asociado con la AR del adulto, mientras que el - 28 C/G no estuvo asociado a susceptibilidad.

El SNP - 28 C/G ya que se encuentra cercano a un posible sitio de unión para el factor de transcripción NF- κ p pensamos que este SNP podía tener implicaciones en la patogénesis de la ARJ, debido a que NF- κ p es un heterodímero que actúa como factor de transcripción para una serie de genes involucrados en la inflamación y destrucción del cartílago y hueso como la IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF- α , etc. ^{58,87,89,109, 110}.

En contraste a lo observado en población China la frecuencia del SNP - 28 C/G es alta (G = 11.7% en controles), este SNP en nuestra población mostró una frecuencia baja tanto en casos como en controles; 1.5% y 1.6%, respectivamente. De hecho por definición si es un polimorfismo, solo que es poco frecuente. Los datos obtenidos indican que este SNP no tiene relevancia en la susceptibilidad de la ARJ en nuestra población a diferencia de la población China ⁸⁴.

Por otro parte, estudios *in vitro* en dos líneas celulares el SNP - 403 de *CCL5* demostraron que también afecta la expresión del gen y lleva en última instancia a sobreexpresar más esta quimiocina ⁸¹.

Este SNP a diferencia del - 28 C/G se encontró en una alta frecuencia tanto en casos como en controles; 33.5% y 30.6%, respectivamente, sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, por lo que el alelo A del SNP - 403 G/A no representa un alelo de susceptibilidad en nuestra población.

En un intento por desarrollar un estudio más extensivo del gen *CCL5*, se realizó la búsqueda de otros SNPs mediante el software *SNPper*, el cual está ligado a la base de datos del NCBI ⁶², este software identificó un SNP en la posición -109 T/C de la región promotora. De hecho, Liu H y cols ⁸¹ identificaron un posible factor de transcripción cerca de la posición de este SNP, sin embargo ellos no encontraron éste SNP en los sujetos estudiados debido a no existe esta variante alélica en población China. Posteriormente, con el programa *MAPper* ¹⁰³ se identificó otro posible sitio de unión al factor de transcripción IRF3 en una secuencia consenso donde está ubicado el SNP - 109 T/C.

La comparación de genotipos y alelos entre casos y controles no mostró diferencias estadísticamente significativas a pesar de la ligera diferencia observada en el alelo de riesgo entre casos y controles. La frecuencia de este alelo en población mexicana fue de 11.3% y 10.7% en casos y controles respectivamente. A pesar de la relativa importancia de este SNP en la regulación del gen no se encontró asociado a la susceptibilidad de la ARJ en población mexicana.

A pesar de que los SNPs en forma individual no confieren susceptibilidad por si solos es posible que la combinación de ellos en forma de haplotipos puedan ejercer un efecto en la etiopatogenia de la ARJ¹¹.

En este análisis se identificaron 17 haplotipos que incluyeron 2 o 3 alelos del gen *CCL5* (tabla 12), sin embargo, ninguno de ellos mostró diferencias estadísticamente significativas entre los casos y controles.

El haplotipo que representa susceptibilidad (-28 G y - 403 A) fue poco frecuente en nuestra población tanto en casos como en controles; 3% y 1% respectivamente. Este haplotipo de susceptibilidad no mostró diferencias estadísticamente significativas, por lo que no está asociado a la ARJ de la población pediátrica mexicana.

Otro haplotipo que podría ser de susceptibilidad fue el - 109 C y - 403 A, su frecuencia fue rara en nuestra población ya que no alcanzo ni en casos ni en controles el 1% (0.75% y 0.3% respectivamente). Por lo que este haplotipo no está asociado con susceptibilidad a desarrollar ARJ en nuestra población.

La combinación esperada de los SNP de riesgo -28 G, - 109 C y -403 A no se observo en nuestra población. Esto nos sugiere que estas combinaciones de este haplotipo en el gen *CCL5* no predisponen al desarrollo de la ARJ en la población pediátrica afectada con esta patología. El haplotipo que encontramos muy frecuente tanto en casos como en controles en nuestra población fue el -28 C, -109 T y - 403 G (CTG) con 55.6% y 58.0% respectivamente. La combinación de este haplotipo en estudios *in vitro* nos sugieren que el alelo - 28 C y - 403 G no están involucrados en la sobreexpresión de *CCL5*. Este último resultado nos sugiere que la distribución de este haplotipo es frecuente en nuestra población, sin embargo tampoco está asociado a la enfermedad con protección o riesgo a desarrollar ARJ.

Con respecto al gen que codifica para IL-1a se ha demostrado que ciertos alelos se asocian a la presencia de erosión del hueso en modelos animales y en pacientes con AR ^{60,112}. El SNP - 889 C/T en la región 5' del gen de la IL-1a. El cual se ha observado que influye en la expresión de la IL-1a ⁶⁴.

Sin embargo, cuando analizamos las frecuencias de genotipos y alelos de este SNP en casos y controles no observamos diferencias estadísticamente significativas. Cuando se compararon las frecuencias entre casos y controles femeninos tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas, no obstante, cuando se compararon las frecuencias de genotipos y alelos entre los varones casos y controles se encontró asociación con protección, OR: 0.47, IC. 0.22 - 0.99, X^2 4.0 y valor de $p = 0.045$, estos resultado se contraponen con lo observado en algunas poblaciones como la Inglesa, donde este mostró asociación con susceptibilidad ⁵⁰. Aunque estos resultados no han sido replicados en otras poblaciones, es posible que las asociaciones observadas sean resultado de un desequilibrio de ligamiento con el verdadero SNP involucrado en la susceptibilidad. Por lo que se requieren esfuerzos en otras poblaciones, el análisis de otros SNPs existentes en IL-1a, además de IL-1p y el antagonista del receptor de IL-1, incrementar el tamaño de muestra ya que el valor de p es de apenas 0.045.

Varios estudios de ligamiento han identificado que el brazo corto del cromosoma 6 está involucrado en varias enfermedades autoinmunes ¹¹³ incluyendo a la AR¹¹⁴ y la ARJ ¹¹⁵. Tanto el gen *TAPBP* como *IKBL* se encuentran en la banda 21 del brazo corto del cromosoma 6.

El gen *IKBL* codifica para un inhibidor de NF- κ p, mientras que el gen *TAPBP* lo hace para una proteína de unión al procesamiento de antígenos. Estudios previos

BIBLIOTECA UACM

en poblaciones en asiáticas y caucásicas han identificado SNPs en los genes *IKBL* ⁸⁷ y *TAPBP* ⁹⁸, los cuales han mostraron evidencias de asociación con ARJ.

En población Japonesa se encontró que después de HLA-DRB1, el polimorfismo - 62 T/A localizado en la región promotora del gen *IKBL* es la variante alélica de susceptibilidad más importante en AR.

En contraste con lo observado en población adulta con AR, los estudios de asociación en nuestra población mostraron que el alelo T del SNP - 62 T/A se asoció con protección ya que la frecuencia alélica dio un resultado de riesgo de 0.70 con una significancia estadística de $p = 0.015$ y el genotipo T/T un OR de 0.44 con una p de 0.0057. Esto quiere decir que este alelo en nuestra población confiere protección a pacientes y controles que tienen este genotipo. Más importante el alelo A confiere un riesgo de 1.43 con una p de 0.015, mientras que el genotipo A/A confiere 2.26 veces más de riesgo, esta controversia pudiera ser explicada porque la AR y la ARJ se consideran como dos entidades diferentes o por heterogeneidad genética entre las poblaciones, sin embargo se requieren más estudios en ARJ para confirmar nuestros hallazgos.

Cabe aclarar que estudios funcionales han mostrado que el SNP - 62 T puede inhibir la expresión de *IKBL*, conduciendo a la expresión de NF- κ B y consecuentemente a la expresión de genes involucrados en el proceso de la inflamación. El alelo A disrumpe el sitio de unión al represor transcripcional 5E1, por lo que *IKBL* se transcribe de manera normal e inhibe a NF- κ B ^{116, 117, 118}.

No obstante no existe una evidencia contundente del efecto de este SNP en la expresión del gen *IKBL*, lo que sugiere que deben de realizarse más estudios funcionales con otras líneas celulares que puedan dar una mejor información ¹¹⁸.

Finalmente el análisis del SNP 260 C/G (thr/Arg) localizado en el exon 4 del gen *TAPBP*, asociado a AR de adultos en dos poblaciones caucásicas de Reino Unido y Estados Unidos ⁹⁸ mostró diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó la distribución alélica y genotípica entre casos y controles mostrando un OR de riesgo de 1.88 para el genotipo G/G, como previamente había sido reportado en población caucásica, de esta manera este SNP estuvo asociado a susceptibilidad en población pediátrica mexicana con ARJ. Es importante comentar que cuando se compararon por sexo los varones mostraron diferencias estadísticamente significativas pero no las mujeres, el riesgo en los varones fue de 1.62 con un nivel de significancia estadística de 0.036, cabe mencionar que este valor si se corrige por la prueba de Bonferroni se pierde la asociación alélica entre el marcador y la enfermedad, esto en su caso puede sugerir que los varones tienen un fondo genético diferente.

Hasta el momento no se sabe de que manera el cambio de una treonina por una arginina afecta la función de la proteína. Se sabe que la proteína TAP es muy similar a TAPBP y que cuando presenta alteraciones en su función, los individuos muestran infecciones crónicas en la infancia y manifestaciones autoinmunes en la fase adulta de su vida ¹¹⁹. Mutaciones en cualquiera de las subunidades de TAP llevan a una reducción en la superficie celular de moléculas de HLA clase I. De esta manera, citocinas que son producidas durante una infección crónica, pueden llevar a la activación de células T NK y a la lisis de células que expresan bajas cantidades de moléculas de HLA, resultando en daño a la piel y riñón, así como a otras manifestaciones autoinmunes ^{119,120}.

Aunque el cambio de aminoácido Thr → Arg puede alterar la cantidad y calidad de moléculas de HLA clase I, no se sabe como puede alterar la función de la

proteína y estar involucrada en la susceptibilidad y causar autoimmunidad. De hecho si el efecto fuera similar a lo que ocurre cuando TAP1 o TAP2 están alteradas, entonces habría una disminución en las moléculas de HLA clase I en la superficie de varios tipos celulares, sin embargo esto no se puede asegurar que ocurra, ya que no hay reportes de mutaciones en el gen *TAPBP* que afecten la presentación de antígenos en moléculas de HLA clase I.

Bukulmez H, y cols ⁹⁸, quienes identificaron el SNP 260 C/G asociado a ARJ subtipo sistémico, sugieren que debido a que no se conoce cual es la repercusión del SNP en la actividad de la proteína puede aseverar que este SNP éste involucrado en la susceptibilidad. De hecho ellos sugieren la posibilidad que el alelo 260 Arg pueda estar cercano a otro SNP del gen y formar parte de un haplotipo que contribuya en la susceptibilidad a la ARJ, o estar en desequilibrio de ligamiento con el verdadero SNP ubicado en otro gen. El gen candidato cercano a *TAPBP* es el gen *Daxx*, el cual codifica para una proteína efectora de ligando de Fas y del factor de crecimiento transformante involucrados en la regulación de la muerte celular programada o apoptosis ^{121,122}. Dado lo anterior, es importante analizar este y otros genes para determinar la contribución de cada uno de ellos en la patogenia de ARJ.

Conclusiones

- Las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs mostraron diferencias significativas a las reportadas en otras poblaciones.
- Los SNP individuales - 28 C/G, - 109 C/T y - 403 G/A de CCL5 no mostraron evidencia de asociación, lo que sugiere que estos SNPs no están involucrados en la susceptibilidad a ARJ en población pediátrica mexicana.
- Los diferentes haplotipos obtenidos de la combinación de los tres SNPs analizados de CCL5 tampoco mostraron diferencias estadísticamente en la población de estudio.
- El SNP - 889 C/T del gen *IL-1a* a diferencia de lo reportado mostró evidencia de protección en los varones con ARJ y no en mujeres, sin embargo cuando se corrigió el valor de p se perdió la asociación.

- ▶ Así mismo, en contraste con lo reportado en otras poblaciones, el polimorfismo - 62 T/A de *IKBL* mostró evidencia de protección en la población general con ARJ y en varones.
- ▶ El SNP no sinónimo 260 C/G exon 4 de *TAPBP*, el cual cambia una treonina por una arginina en la proteína, está asociado a la susceptibilidad a ARJ en nuestra población, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que este SNP este en desequilibrio de ligamiento con la verdadera variante causante de la enfermedad.
- ▶ Con estos estudios estamos colaborando en el descubrimiento de genes involucrados en la etiología de la enfermedad en la población pediátrica mexicana con ARJ.

Perspectivas

- Aumentar el número de muestra de los pacientes con ARJ
- Realizar en aquellos SNPs donde se reconoce el efecto de los cambios de nucleótido a nivel de proteína
- Analizar la cantidad de diferentes proteínas en el líquido sinovial así como el RNAm de pacientes con ARJ que tengan diferentes variantes alélicas del mismo gen.
- Incrementar el número de SNPs analizados y construir haplotipos de cada uno de los pacientes, así como realizar estudios con programas bioestadísticos y bioinformáticas para analizar el desequilibrio de ligamiento.
- Analizar mediante microarreglos de SNPs para conocer cuales son los demás SNPs que están involucrados en la susceptibilidad, protección y o severidad de la enfermedad.
- analizar los mismos pacientes de acuerdo al subtipo de la enfermedad (correlación genotipo - fenotipo)
- Realizar estudios de TDT.

Bibliografía:

1. Phelan JD, Thompson SD, Glass DN. Susceptibility to JRA/JIA: complementing general autoimmune and arthritis traits. *Genes and Immunity*. 2006; 7: 1-10.
2. Goldring SR. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2003; 42: i11-16.
3. Schneider R, Passo M. Juvenile rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin N Am*. 2002; 28: 503 - 530.
4. Kaipianen-Seppanen O, and Savolainen A. Changes in the incidence of juvenile rheumatoid arthritis in Finland. *Paediatric Rheumatology*. 2001; 40: 928-932.
5. Brevier E, J Bass, J Baum, J, *et al*. Current proposed revision of **JRA** criteria. *Arthritis Rheum*. 1977; 20: 195-9.
6. European League Against Rheumatism. EULAR Bulletin No. 4: nomenclature and classification of arthritis in children. Basel (Switzerland): National Zeitung AG; 1997.
7. Petty RE, Southwood TR, Baum J, *et al*. Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban1997. *Journal of Rheumatol*. 1998; 25: 1991-4.
8. Schaller **JG**. Juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatric Rev*. 1997; 18: 337- 349.

9. Prahalad S. Genetic analysis of juvenile rheumatoid arthritis: approaches to complex traits. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2006; 36: 83 - 90.
10. Weiss JE, Ilowite NT. Juvenile Idiopathic Arthritis. *Pediatr Clinics Of North America*. 2005; 52: 413 - 442.
11. Cassidy JT, Petty RE. The juvenile idiopathic arthritides. In: Cassidy JT, Petty RE, editors. *Textbook of pediatric rheumatology*. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2002. p. 214- 217.
12. Mitterski B, Drynda S, Boschow G, *et al*. Complex genetics predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis. *BMC Genetics*. 2004; 5: 1-14.
13. Lang BA, Shore A. A review of current concepts on the pathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol*. 1990; 17 (suppl 21): 1-15.
14. Tucker LB. Juvenile rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 1993; 5: 619 - 28.
15. Thomson, W., and Donn, R. Genetic epidemiology. Juvenile idiopathic arthritis genetics - What's new? What's next?. *Arthritis Research*. 2002; 4: 302- 306.
16. Goldring SR. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2003; 42 (suppl. 2): i11 - i16.
17. Albert ED, Scholtz S. Juvenile arthritis: genetic update. *Bailliere's Clin Rheumatol* 1998; 12: 209-18.

18. Prahalad S, Ryan MH, Shear ES, *et al.* Juvenile rheumatoid arthritis: linkage to HLA demonstrated by allele sharing in affected sibpairs. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 2335 -2338.
19. Phelan JD, and Thompson SD. Genomic progress in pediatric arthritis: recent work and future goals. *Curr Opin Rheumatol.* 2006; 18: 482 - 489.
20. Edwards J, and Cambridge G. B - cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nature Review Immunology.* 2006; 10: 1038
21. Shi FD, and Kaer LV. Reciprocal regulation between natural killer cells and autoreactive T cells. *Nature Reviews Immunology.* 2006; 6: 751 - 758.
22. Ladner UM, Pap T, Gay RE, *et al.* Mechanisms of Disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nature Clinical Practice Rheumatology.* 2005; 1: 102 - 110.
23. Ritchlin C. Fibroblast biology effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res.* 2000; 2: 356 - 360.
24. Weyand CM, Seyler TM, Goronzy, JJ. B cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Research & Therapy.* 2005; 7 (suppl): S9 - S12.
25. Hirholt J, Lindqvist AK, Holmdahl R. The genetics of rheumatoid arthritis and the need for animal models to find and understand underlying genes. *Arthritis Res.* 2001; 3: 87 - 97.
26. Zak NA, Shifman S, Shalom A, Darvasi, A. Genetic dissection of common diseases. *IMAJ.* 2002; 4: 438 - 443.

27. Still GF. On a form of chronic joint disease in children. *Medico-Chirurgical Trans.* 1987; 80: 47.
28. Ansell BM, Bywaters EG, Lawrence, JS. Familial aggregation and twin studies in Still's disease. Juvenile chronic polyarthritis. *Rheumatology*. 1969; 2: 37 - 61.
29. Baum J, Fine C. Juvenile rheumatoid arthritis in monozygotic twins: a case report and review of the literature. *Arthritis Rheum.* 1968; 11: 33 - 36.
30. Glass DN, and Giannini EH. Juvenile rheumatoid arthritis as a complex genetic trait. *Arthritis and Rheumatism.* 1999; 42. 2261 - 2268.
31. Moroldo MB, Chaudhari M, Shear ES, *et al.* Juvenile rheumatoid arthritis affected sibpairs. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 1962-1966.
32. Savolainen A, Salla H, Kotaniemi K, *et al.* Magnitude of the genetic component in juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2000; 59: 1001.
33. Prahalad S, O'Brien E, Fraser AM, *et al.* Familial aggregation of juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 4022 - 27.
34. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, *et al.* Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 30 - 37.
35. Baca V, Orozco L. 2004. Genética de las enfermedades complejas. En: "E. Orozco y J. Luna". Editorial: Instituto Politécnico Nacional, Mexico. Páginas: 75-91.

36. Mayeux R. Mapping the new frontier: complex genetic disorders. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005; 115: 1404 -1407.
37. Mathew C. Postgenomic technologies: hunting the genes for common disorders. *BMJ*. 2001; 322; 1031 - 1034.
38. Teare MD, Barrett JH. Genetic linkage studies. *Lancet*. 2005; 366: 1036 - 1044.
39. Rich N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human disease. *Science*. 1996; 273: 1516 - 1517.
40. Thompson SD, Moroldo MB, Guyer L, *et al*. A genome-wide scan for juvenile rheumatoid arthritis in affected sibpair families provides evidence of linkage. *Arthritis and Rheumatism*. 2004; 50: 2920 - 2930.
41. Venter JC, Adams MD, Myers EW, *et al*. The sequence of the human genome. *Science*. 2001; 291: 1304 -1351.
42. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nature Review Genetics*. 2006; 7: 85 - 97.
43. Carlson CS, Eberle MA, Kruglyak L, Nickerson DA. Mapping complex disease loci in whole-genome associated studies. *Nature*. 2004; 429: 446 - 452.
44. Oliver M. A haplotype map of the human genome. *Physiol Genomics*. 2003; 13: 3 - 9.

45. Riva A, and Kohane IS. SNPper: retrieval and analysis of human SNP's. *Bioinformatics*. 2002; 18: 1681 - 1685.
46. Riva A, Kohane IS. A SNP-centric database for the investigation of the human genome. *BMC Bioinformatics*. 2004; 5: 33 - 40.
47. Newton EM. Linkage disequilibrium maps and association mapping. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005; 115: 1425 - 1430.
48. Zhang K, Qin ZS, Liu JS, *et al*. Haplotype Block Partitioning and Tag SNP Selection Using Genotype Data and Their Applications to Association Studies. *Genome Research*. 2004; 14: 908 - 916.
49. Amos CI, Chen WV, Lee A, *et al*. High-density SNP analysis of 642 CAucasian families with rheumatoid arthritis identifies two new linkage regions on 11p12 and 2p33. *Genes and Immunity*. 2006; 7: 277 - 286.
50. McDowell TL, Symons JA, Ploski R, *et al*. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and novel interleukin-1 alpha polymorphism. *Arthritis Rheum*. 1995; 38: 221- 228.
51. Donn R, Alourfi Z, Benedetti FD, *et al*. Mutation screening of the macrophage migration inhibitory factor gene. *Arthritis and Rheumatism*. 2002; 46: 2402 - 2409.
52. Wang CR, Guo HR, Liu MF. Rantes promoter polymorphism as a genetic risk factor for rheumatoid arthritis in the Chinese. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2005; 23: 379 - 384.

53. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, *et al.* The effects of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998; 102: 1369-1376.
54. Viken MK, Amundsen SS, Kvien TK, *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.
55. Date Y, Seki N, Kamizono S, *et al.* Identification of a genetic risk factor for systemic juvenile rheumatoid arthritis in the 5'-flanking region of the TNF alpha gene and HLA genes. *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 2577 - 2582.
56. Curfs JHAJ, Meis JFGM, and Korstanje JAAH. A Primer on Cytokines: Sources, Receptors, Effects, and Inducers. 1997; 10: 742- 780.
57. Baggioni M. Chemokines and leukocytes traffic. *Nature.* 1998; 392: 565 - 568.
58. Ravindran JS, Owen P, Lagan A, *et al.* Interleukin 1a, interleukin 1p and interleukin 1 receptor gene polymorphisms in psoriatic arthritis. *Rheumatology.* 2004; 43: 22 - 26.
59. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol.* 1996; 14: 397 - 440.
60. Niki Y, Yamada H, Kikuchi T, *et al.* Membrane-Associated IL-1 Contributes to Chronic Synovitis and Cartilage Destruction in Human IL-1a Transgenic Mice. *The Journal of Immunology.* 2004; 172: 577 - 584.

61. Eastgate JA, Wood NC, DiGiovine FS. Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. 1988, 2: 706 - 9.
62. www.ncbi.nlm.nih.gov
63. Mansfield JC, Holden H, Tarlow JK, *et al.* Novel genetic association between ulcerative colitis and the antiinflammatory cytokine interleukin 1 receptor antagonist. *Gastroenterology*. 1994; 106: 637 - 42.
64. Hulkkonen J, Laippala P, Hurme M. Arare allele combination of the interleukin 1 gene complex is associated with high interleukin 1 beta plasma levels in healthy individuals. *Eur Cytokine Netw*. 2000; 11: 251 - 255.
65. Cox A, Camp NJ, Cannings C, *et al.* Combined sib-TDT and TDT provide evidence for linkage of the interleukin 1 gene cluster to erosive rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet*. 1999; 8: 1707 -1713.
66. McPowell TL, Symons JA, Ploski R, *et al.* A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin 1 alpha polymorphisms. *Arthritis Rheum*. 1995; 38: 221- 228.
67. Ravindran JS, Donn RP, Barret JH, Farhan A. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. British Paediatric Rheumatology Study Group. *Arthritis Rheum*. 2001; 44: 802 - 810.

68. Donn RP, Farhan AJ, Barrett JH, et al. Absence of association between interleukin 1 alpha and oligoarticular juvenile chronic arthritis in UK patients. *Rheumatology (Oxford)*. 1999; 38: 171- 175.
69. Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nature Immunology*. 2001;2: 95 -
70. Tanaka Y. T - cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 α . *Nature*. 1993; 361: 79 - 82.
71. Kitayama J, Mackay CR., Ponath PD, Springer TA. The C-C chemokine receptor CCR3 participates in stimulation of eosinophil arrest on inflammatory endothelium in shear flow. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 2017 - 2024.
72. Gerzten RE, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium underflow conditions. *Nature*. 1999; 398: 718 - 723.
73. Campbell JJ, et al. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science*. 1998; 279: 381- 384.
74. Olson TS, and Ley K. Chemokines and chemokine receptors in the leukocyte trafficking. *Am. J. Physiol. Regulatory integrative Comp. Physiol.* 2002; 283: R7 - R28.
75. Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997; 90: 909 - 928.
76. Luther SA, and Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nature Immunology*. 2001; 2: 102-107.

77. Sallusto F, Mackay CR, and Lanzavechia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2000; 18: 593- 620.
78. Baggiolini M, Dewald B, and Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines - CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 1994; 55: 97 -179.
79. Sallusto F. et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 2760 - 2769.
80. Pharoah DS, Varsani H, Tatham RW, et al. Expression of the inflammatory chemokines CCL5, CCL3 and CXCL10 in juvenile idiopathic arthritis, and demonstration of CCL5 production by an atypical subset of CD4⁺ T cells. *Arthritis Research and Therapy.* 2006; 8: R50 - R61.
81. Liu H, Chao D, Nakayama EE, et al. Polymorphisms in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96: 4581-4585.
82. Ye DQ, Yang SG, Li XP, et al. Polymorphisms in the promoter region of RANTES in Han Chinese and their relationship with systemic lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res.* 2005; 297: 108 - 113.
83. Liao CH, Yao TC, Chung HT, et al. Polymorphisms in the promoter region of RANTES and the regulatory region of monocyte chemoattractant protein-1 among Chinese children with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology.* 2004; 31: 2062 - 206.

84. Wang CR, Guo HR, Liu MF. RANTES promoter polymorphisms as a genetic risk factor for rheumatoid arthritis in the Chinese. *Clínica[and Experimental Rheumatology*. 2005; 23: 379 - 384.
85. Gilmore TD, and Morin PJ. The I κ p protein: members of the a multifunctional family. *Trends Genet*. 1993; 9: 427 - 433.
86. Thanos D, and maniatitis T. NF- κ p: a lesson in family values. *Cell*. 1995; 80: 529 - 532.
87. Okamoto K, Makino S, Yoshikawa Y, *et al*. Identification of *I κ pL* as the second major histocompatibility complex-linked susceptibility locus for rheumatoid arthritis. *Am. J. Hum. Genet*. 2003; 72: 303 - 312.
88. Beg AA, and Baldwin AS. The I κ p protein: multifunctional regulators of Rel/NF- κ p transcription factors. *Genes Dev*. 1993; 7: 2064 - 2070.
89. Jobin C, and Sartor RB. Toe I κ P/NF- κ p system: a key determinat of mucosal inflammation and protection. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2000; 278: C451 - C462.
90. Alberta MR, and Campbell RD. Characterization of a novel gene in the human major histocompatibility complex that encodes a potential new member of the I kappa B family of proteins. *Hum Mol Genet*. 1994; 3: 793- 799.
91. Yamashita T, Hamaguchi K, Kusuda Y, *et al*. *IKBL* promoter polymorphisms associated with resistance to type 1 diabetes in Japanese. *Tissue Antigens*. 2004; 63: 223-230.

92. Comelis F, Faure S, Martinez M, *et al.* New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 10746 - 10750.
93. Jawahher D, Seldin MF, Amos CI, *et al.* A genome-wide screen in multiplex rheumatoid arthritis families suggests genetic overlap with other autoimmune diseases. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; 68: 927 - 936.
94. Mackay K, Eyre S, Myerscough A, *et al.* Whole-genome linkage analysis of rheumatoid arthritis susceptibility loci in 252 affected sibling pairs in the United Kingdom. *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 632 - 639.
95. Lin CH, Cho CL, Tsai WC, *et al.* Inhibitors of KB-like gene polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Immunol Lett* 2006; 105: 193 -197.
96. Abele R, and Taropé R. The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing. *Physiolotj-* 2004; 19: 216 - 224.
97. Sadasivan B, Lehner PJ, Ortmann B, *et al.* *cRoies* for calreticulin and novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity.* 1996; 5: 103 -114.
98. Bukulmez H, Fife M, Tsoras M, *et al.* Tapasine gene polymorphisms in systemic onset juvenile rheumatoid arthritis: a family - based case - control study. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7: R285 - R290.

99. Wandstrat, A., and WAKeland, E. The genetics of complex autoimmune diseases: non- MHC susceptibility genes. *Nature Immunology*. 2001; 2: 802 - 809.
100. www.ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwal.pl
101. www.cica.es/epiinfo/programa.h
102. www.dxsp.sergas.es/AplEdatos/Epidat/cas/default.asp
103. *Mapper*: a search engine for the computational identification of putative transcription factor binding sites in multiple genomes. 2005; 6: 79- 98.
104. *Haploview*: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005; 21: 263 - 265.
105. Goldring S. R. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2003; 42: ii 11 - ii 16.
106. Deng H, Chen W, Recker R. Population admixture: detection by Hardy - Weinberg test and its quantitative effects on linkage - disequilibrium methods for localizing genes underlying complex traits. *Genetics*. 2001; 157: 885 - 897.
107. Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nature Review Genetics*. 2006; 7: 781 - 790.
108. Nielsen DM, Ehm MG, and Weir BS. Detecting marker-disease association by testing for Hardy - Weinberg disequilibrium. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 63: 1531 - 1540.

109. Crilly A, Maiden N, Capell HA, Madhok R. Predictive value of interleukin 1 gene polymorphisms for surgery. *Ann Rheum Dis.* 2000; 59: 695 - 699.
110. Jue DM, Jeon KL, Jeong YJ. Factor nuclear κ (NF- κ) pathway as a therapeutic target in rheumatoid arthritis. 1999; 14: 231 - 238.
111. Syvanen AC. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. 2001; 2: 930 - 941.
112. Wim B. Arguments for interleukine 1 as a target in chronic arthritis. 2000; 59: i81 - i84.
113. Zanelli E, Breedveld F.C, de Vries RP. HLA association with autoimmune disease: a failure to project?. *Rheumatology.* 2000; 39: 1060 - 1066.
114. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 2003; 423: 356 -361.
115. Murria K, Moroldo MB, Donnely P, Parlad S, Passo MH, Gianini EH, Glass DN. Age - specific effects of juvenile rheumatoid arthritis - associated HLA alleles. *Arthritis Rheum.* 1999; 42: 2261- 2268.
116. Allcock RJ, Baluchova K, Cheong KY, Price P. Haplotypic single nucleotide polymorphisms in the central MHC gene IKBL, a potential regulator of NF-kappa B function. *Immulogenetics.* 2001; 52: 289 - 293.
117. Tak PP, and Firestein GS. NF - κ a key role in inflammatory diseases. 2001; 107: 7-11.

118. Sekido R, Murai K, Funahashi J, Kamachi Y, Fujisawa A, Nabeshima Y, Kondoh H. Toe delta - crystallin enhancer - binding protein pEFl is a repressor of E2-box-mediated gene activation. *Mol Cell Biol.* 1994; 14: 5692- 5700.
119. Moins H. T. et al. Association of a syndrome resembling Wegener's granulomatosis with low surface expression of HLA class-I molecules. *Lancet.* 1999; 354: 1598 - 1603.
120. Markel G, et al. Toe mechanisms controlling NK cell autoreactivity in TAP2-deficient patients. *Blood.* 2004; 103: 1770-1778.
121. Yang X, Krhosrsvi - Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a novel Fas - bindin protein that actives JNK and apoptosis. *Cell.* 1997; 89: 1067 -1076.
122. Perlman R, Schiemann W, Brooks W, et al. TGF-beta induced apoptosis is mediated by the adaptader protein DAXX that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol.* 2001; 3: 708 - 714.

APENDICE

Reactivos

Agarosa. Volumen final 100 m.l

- 1% de agarosa
- Aforar con 99 con buffer TBE
- Marcador de peso molecular: DNA ladder 50-1350 pb

Buffer Tris, borato y EDTA (TBE 10X). Volumen final = 1 Lt

- 108 grs de Tris-base
- 55 grs de ácido bórico
- 4 m.l de 0.5 M de EDTA, pH 8.0
- Aforar a un Lt con agua desionizada

Acarreador.

- Azul de bromofenol al 0.25%
- Xilencianol al 0.25%
- Ficoll 15%

Coordinación de Certificación y Registro

UACM
Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada Humano me es ajeno



REGISTRADO: 1-6-RASIF 1565Q, CON DONGLES #
PLAZA COMERCIAL, LOCAL 1042, MONTE ALTO,
CALLE 51, O.W., C.L. CH 5110 m