

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

DOCTORADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

*"Implicaciones funcionales de polimorfismos en genes
asociados a artritis reumatoide juvenil"*

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

JULIAN RAMÍREZ BELLO

Director de tesis

Dra. Lorena Orozco Orozco

México, D.F. Julio 2013.

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.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA

Dra. Lorena Orozco
Profesor-Investigador de tiempo parcial, Posgrado en ciencias Genómicas,
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.
Subdirectora de Investigación Médica,
Instituto Nacional de Medicina Genómica.

ASESORES

Dr. Mauricio Castañón Arreola
Profesor-Investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas,
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dra. Elisa Azuara Liceaga
Profesor-Investigador del Posgrado en Ciencias Genómicas,
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dr. Emilio Córdova Alarcón
Investigador en Ciencias Médicas,
Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Dra. Silvia Jiménez Morales
Investigador en Ciencias Médicas,
Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), S.Sa., en colaboración con los hospitales Centro Médico Nacional Siglo XXI, y el Instituto Nacional de Pediatría. La dirección general de la tesis estuvo a cargo de la Dra. Lorena Orozco, profesora-investigadora de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y Subdirectora de Investigación Médica del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

DEDICADO A:

Mi querida esposa Tania Nallely García Morales.

Porque gracias a su paciencia y apoyo he podido superarme en todos los proyectos de mi vida, incluyendo los académicos. Por amarme con todas sus fuerzas y por dejarme ser lo que quiero en la vida. Por valorar los momentos que ambos hemos vivido.

Mi adorada Estéfany Eurídice.

Por su bondad, sabiduría, calidez y amor que me demuestra día tras día. Gracias Estéfany por tus sonrisas, enojos, virtudes, cariños, halagos, enseñanzas, travesuras, porque no me canso de ver tus virtudes, gracias por ser una excelente hija. Gracias por ser tan maravillosa.

Mi nena Oriana Fernanda

A mi otro regalo divino que me ha hecho ver la vida de diferente manera. Se que en este momento aún no puedes leer, cuando lo hagas podrás ver que le doy gracias a Dios, darte la característica de ser tan cariñosa y amorosa, por regalarme tantos momentos alegres y divertidos (y también por ponerme los pelos de punta a cada rato).

Mi madre y padre.

Porque en cada palabra siguen dando muestra de lo grande que son. Gracias a mi madre por sus palabras de alivio, consuelo y amor. A su fortaleza, la cuál la ha convertido en su principal arma. A mi padre, a pesar de su silencio enseña y demuestra un gran amor.

Mis pacientes.

Porque desafortunadamente han sido mi razón para obtener este grado profesional.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lorena

Por permitirme ser parte de su exitoso grupo de investigación en Inmunogenética y Enfermedades Metabólicas, por compartir su espacio, tiempo y conocimientos. Porque me ha dejado crecer junto con ella.

A mis asesores

Le agradezco a cada uno de ellos sus enseñanzas y consejos, gracias a esto he podido superarme en lo académico y personal. Gracias por permitirme ser su colaborador.

A mis amigos de laboratorio

A mis amigas: Silvia, Lupita research group, Yolis, y amigos: Rafael, Emilio, Fede, porque hemos sabido llevarnos bien (que es muy difícil; jajaja) y aguantarnos. Por todo se apoyo personal y académico y, por ser un pilar importante en mi formación profesional.

A los estudiantes

A Erika, Omar, Celio, Ruth por confiar en mí como profesor y asesor de tesis, tesinas, porque siempre estuvieron dispuestos a colaborar conmigo en el trabajo de investigación.

A mis compañeros de generación del doctorado

Porque me soportaron durante mucho tiempo, por cruzarse un tiempo en mi vida, gracias colegas y amigos míos: Lupita, Mauro, Alma, Nonatzin.

INDICE	PÁGINA
Dedicatoria -----	iv
Agradecimientos -----	v
Índice-----	vi-ix
Abreviaturas -----	x-xi
Lista de Figuras -----	xii-xiii
Índice de tablas -----	xiv
Resumen -----	1
Abstract -----	2
1. Introducción -----	3
1.1 Artritis reumatoide juvenil -----	3
1.1.1 Prevalencia e incidencia de la ARJ -----	3
1.1.2 Características clínicas de la ARJ -----	3
1.1.3 Clasificación de la artritis reumatoide crónica-----	5
1.1.4 Clasificación de la ARJ -----	5
1.1.4.1 ARJ pauciarticular -----	6
1.1.4.2 ARJ poliarticular -----	6
1.1.4.3 ARJ sistémica -----	6-7
1.1.5 Etiología de la ARJ -----	7
1.1.6 Fisiopatología de la ARJ -----	7
1.1.7 Genética de la ARJ -----	14
1.1.8 La ARJ como enfermedad multifactorial -----	15
1.1.9 Papel de los SNP en la AJ -----	16
1.1.10 Estrategias para identificar factores genéticos en ARJ-----	18
1.1.11 Estudios de ligamiento en ARJ -----	19
1.1.12 Estudios de asociación alélica -----	21
1.1.13 Causas de asociación -----	23
1.1.14 Efecto de los SNP asociados a enfermedades complejas-----	23
1.1.15 La importancia de los rSNP -----	25
1.1.16 Genes asociados a ARJ -----	26
1.1.17 Genes incluidos en este estudio -----	27

1.1.18	FCRL3 y su asociación con diversas EA -----	27
1.1.19	Importancia de la vía de señalización TNF- α en la ARJ -----	28
2.	Justificación -----	30
3.	Objetivos	
3.1	Objetivo general -----	31
3.2	Objetivos particulares -----	31
4.	Hipótesis -----	31
5.	Diseño de estudio -----	31
6.	Material -----	32
6.1	Población de estudio -----	32
7.	Método	
7.1	Análisis molecular -----	32
7.2	Plaqueo de muestras para el análisis de SNP-----	33
7.3	Discriminación alélica mediante la técnica 5' exonucleasa---	34
7.4	Validación del SNP funcional -169T/C de <i>FCRL3</i> -----	36
7.5	Purificación de los productos de PCR-----	38
7.6	Análisis <i>in silico</i> de los alelos analizados en este estudio-----	38
7.7	Identificación de nuevos SNP en el promotor de <i>TNFR1</i> ---	38
7.8	Análisis del polimorfismo ins/del -94ATTG/- de <i>NFKB1</i> --	39
7.9	Evaluación funcional de polimorfismos en la expresión de su transcrito -----	40
7.9.1	Extracción del RNA de leucocitos de sangre periférica -----	40
7.9.2	Síntesis de la primera cadena del DNA complementario ---	41
7.10	Análisis de expresión génica de <i>TNFR1</i> mediante PCR de punto final y de tiempo real -----	43
7.10.1	Análisis de expresión génica de <i>TNFR1</i> mediante PCR de punto final -----	43
7.10.2	Análisis de expresión génica mediante PCR de tiempo real-	44
7.11	Análisis de datos -----	46
7.11.1	Estimación del tamaño de muestra y poder estadístico -----	46
7.11.2	Evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg -----	46

7.11.3	Análisis de asociación entre casos y controles -----	46
7.11.4	Evaluación de la expresión génica-----	47
8.	Resultados -----	48
8.1	Número y porcentaje de casos y controles -----	48
8.1.1	Genes y SNP incluidos en este estudio -----	48
8.1.3	Equilibrio de Hardy-Weinberg-----	49
8.1.4	Genes no asociados a ARJ -----	51
8.1.5	Genes asociados a ARJ -----	52
8.1.6	Genes asociados a ARJ dependiente de género -----	53
8.2	Datos de secuenciación de <i>TNFR1</i> -----	57
8.2.1	Análisis de asociación de SNP en el promotor de <i>TNFR1</i> --	59
8.3	Análisis de haplotipos y LD en genes asociados a ARJ -----	60
8.4	Amplificación y restricción enzimática de la ins/del -94ATTG/- de <i>NFKB1</i> -----	63
8.4.1	Interacción epistática entre los SNP -169T/C y la ins/del -94ATTG/- de <i>NFKB1</i> -----	65
8.5	Análisis de expresión génica relativa de <i>TNFR1</i> -----	65
8.5.1	Número y porcentaje de individuos evaluados para el análisis de expresión génica -----	65
8.5.2	Expresión génica de <i>TNFR1</i> mediante PCR de punto final--	66
8.5.3	Curva estándar de la expresión génica relativa de los genes <i>GAPDH</i> y <i>TNFR1</i> -----	67
8.5.4	Datos de la evaluación funcional del SNP -329G/T de <i>TNFR1</i> en la expresión génica -----	68
9.	Discusión -----	69-780
10.	Conclusiones -----	81
11.	Perspectivas -----	82
12.	Referencias -----	83-100
13.	Anexo 1 (Lista de oligos de los genes <i>FCRL3</i> , <i>TNFR1</i> y <i>NFKB1</i>) -----	101

14. Anexo 2 (Condiciones de PCR para generar amplicones de TNFR1 y secuenciación) -----	102-6
15. Anexo 3 (Reactivos) -----	107
16. Artículo publicado -----	108-112

ABREVIATURAS

ACJ	Artritis crónica juvenil
AIJ	Artritis idiopática juvenil
ANA	Anticuerpos antinucleares
AR	Artritis reumatoide
ARJ	Artritis reumatoide juvenil
CAR	Colegio Americano de Reumatología
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CPA	Célula presentadora de antígenos
CPH	Complejo principal de histocompatibilidad
cSNP	Polimorfismo de un solo nucleótido codificante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilen - diaminotetracético
E-HW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
EM	Esclerosis múltiple
EULAR	Liga europea contra el reumatismo
Fc γ RL3 gama	Proteína 3 parecida al receptor 3 de la fracción cristalizable
FR	Factor reumatoide
GMCSF	Factor estimulante de colonia macrófagos granulocitos
GWAS	Estudios de asociación del genoma completo
GWLS	Estudios de ligamiento del genoma completo
HLA	Antígeno leucocitario humano
IC 95%	Intervalo de confianza del 95%
IgM	Inmunoglobulina subtipo M
IL	Interleucina
ILAR	Liga internacional contra el reumatismo
Ins/del	Inserción/delección
ITAM	Motivo de activación basado en tirosina
ITIM	Motivo de inhibición basado en tirosina

LES	Lupus eritematoso sistémico
LD	Desequilibrio de ligamiento
MAF	Frecuencia del alelo no común
MCP1	Proteína 1 quimioatrayente de monocitos
INMEGEN	Instituto Nacional de Medicina Genómica
INP	Instituto Nacional de Pediatría
NF - kB	Factor nuclear kappa B
rSNP	Polimorfismo de un solo nucleótido regulador
RCB	Receptores de células B
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTPN22	Tirosin - fosfatasa 22
TA	Tiroiditis autoinmune
TACE	Enzima convertidora del TNF- α
TDT	Prueba de desequilibrio de transmisión
TBE	Tris -Ácido bórico- EDTA
TNF - α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFR1	Receptor 1 del TNF- α
TNFR2	Receptor 2 del TNF- α
SSa	Secretaría de Salud
SNP	Polimorfismos de un solo nucleótido
srSNP	SNP RNA estructural
STR	Repeticiones cortas en tandem
UTR	Región no traducidas
VNTR	Repeticiones en tandem de número variable
λ s	riesgo de recurrencia en hermanos

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1. Articulación diartrosica normal y afectada por ARJ -----	8
Figura 2. Células y moléculas involucradas en la inflamación sinovial, destrucción del cartílago y erosión del hueso -----	10
Figura 3. Modelo de auto-perpetuación de los linfocitos B autoreactivos y génesis de la artritis -----	11
Figura 4. Papel de los linfocitos T autoreactivos en la génesis de autoinmunidad -----	12
Figura 5. Papel inhibitorio de los linfocitos T NK en autoinmunidad -----	13
Figura 6. Frecuencia de las variantes genéticas y efecto sobre las enfermedades -----	15
Figura 7. Distribución de SNP en varios genes, combinación de alelos de los SNP y TagSNP -----	18
Figura 8. Los análisis de ligamiento en familias afectadas -----	20
Figura 9. Estudios de asociación casos y controles -----	21
Figura 10. Prueba de desequilibrio de transmisión -----	22
Figura 11. Clasificación de los SNP funcionales -----	24
Figura 12. Implicaciones biológicas de los SNP funcionales en las enfermedades -----	29
Figura 13. Señalización mediada por TNF- α -----	27
Figura 14. Preparación de placas para el análisis de los SNP -----	34
Figura 15. Plot de discriminación alélica -----	35
Figura 16. Distribución de casos y controles por género -----	48
Figura 17. Evaluación de la expresión génica de <i>TNFR1</i> -----	57

Figura 18. Secuencia de un individuo heterocigoto para los polimorfismos -980 y -995 en <i>TNFR1</i> -----	58
Figura 19. Resultados de la secuenciación de un fragmento de 1000 pb del promotor de <i>TNFR1</i> -----	59
Figura 20. LD entre los SNP de <i>FCRL3</i> -----	62
Figura 21. LD entre los SNP de <i>TNFR1</i> -----	62
Figura 22. LD entre los 12 SNP de <i>NFKB1</i> -----	63
Figura 23. Amplicón de <i>NFKB1</i> -----	64
Figura 24. Restricción enzimática del amplicón de 311 pb de <i>NFKB1</i> -----	64
Figura 25. Distribución del número y porcentaje de individuos empleados para el análisis de expresión -----	66
Figura 26. Análisis de expresión del gen <i>TNFR1</i> -----	66
Figura 27. Curva estándar de los genes <i>GAPDH</i> y <i>TNFR1</i> -----	67
Figura 28. Análisis de la expresión génica relativa de <i>TNFR1</i> en 19 individuos sanos -----	68
Figura 29. Activación de STAT3 y STAT4 a través de IL23R y TYK2, proteínas asociadas a ARJ-----	71
Figura 30. Transducción de señales mediada por el producto del gen <i>FCRL3</i> asociado a ARJ -----	73
Figura 31. Vía de señalización del TNF- α y de los productos de los genes (<i>TNF-α</i> , <i>TNFR1</i> , <i>NFKB1</i>) las proteínas TNF-, TNF1 y NFKB1 asociados a ARJ -----	79

LISTA DE TABLAS

PÁGINA

Tabla 1. Incidencia y prevalencia de la ARJ en diferentes poblaciones ---	4
Tabla 2. Clasificación de las artritis crónicas en niños -----	5
Tabla 3. Moléculas efectoras liberadas por fibroblastos de la membrana sinovial-----	11
Tabla 4. Características de enfermedades multifactoriales -----	16
Tabla 5. Características de los SNP -----	17
Tabla 6. Regiones ligadas a ARJ y posibles genes involucrados con su fisiopatología -----	20
Tabla 7. Genes asociados y no asociados a ARJ -----	26
Tabla 8. Genes, SNP y posible función biológica de los alelos analizados en este estudio -----	49
Tabla 9. Genes no asociados a AEJ -----	51
Tabla 10. Genes que mostraron asociación a ARJ -----	52
Tabla 11. Distribución de las MAF de los SNP <i>NFKB1</i> _1-5,10 y 11 del gen <i>NFKB1</i> en mujeres con ARJ-----	53
Tabla 12. Distribución de genotipos de los SNP <i>NFKB1</i> _1-5 y 11 de <i>NFKB1</i> asociados en mujeres con ARJ -----	54
Tabla 13. Distribución y asociación de las MAF del SNP -1218A/C del gen <i>TYK2</i> , de los SNP -169T/C, +358G/C, +1381G/A de <i>FCRL3</i> y -329T/G de <i>TNFR1</i> en varones con ARJ -----	55
Tabla 15. Análisis alélica y genotípica del SNP - 889 T/C de <i>IL-1a</i> en hombres -----	66
Tabla 16. Análisis alélica y genotípica del SNP - 62 T/A de <i>ILKBL</i> -----	67
Tabla 17. Análisis alélica y genotípica del SNP - 62 T/A de <i>ILKBL</i> en hombres -----	68
Tabla 18. Análisis alélica y genotípica del SNP 260 C/G de <i>TAPBP</i> -----	69

Resumen

La artritis reumatoide juvenil (ARJ) representa a la artropatía autoinmune más común de la infancia. El desarrollo de la ARJ está fuertemente influenciada por la combinación de factores genéticos y ambientales. Diversos genes involucrados con la síntesis de proteínas relacionadas con inflamación y autoinmunidad han sido asociados con susceptibilidad a desarrollar ARJ en distintas poblaciones. En este estudio de casos y controles, donde se incluyeron 215 pacientes con ARJ y 430 controles, se evaluó el impacto de 41 polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) en 14 genes candidato del sistema inmune (*IL2*, *IL8*, *IL17*, *CD40*, *CD80*, *GMCSF*, *MCP1*, *TACE*, *TNFR1*, *TNFR2*, *TYK2*, *IL23R*, *FCRL3*, y *NFKB1*) y su relación con la susceptibilidad a padecer esta patología multifactorial. Nuestros resultados sugieren que todos los SNP de los genes analizados estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg (E-HW), excepto el SNP -1455A/C del gen *TACE*, E-HW $p=0.002$). Los genes *IL2*, *IL8*, *IL17*, *CD40*, *CD80*, *GMCSF*, *MCP1* no mostraron asociación con ARJ. Sin embargo, SNP en los genes *TYK2* (-1218A/G, $p=0.008$), *IL23R* (-738G/A, $p=0.02$), *FCRL3* (-169T/C, $p=0.03$), y *NFKB1* (-94ATTG/-, $p=0.016$, *NFKB1_1C/T*, $p=0.01$, *NFKB1_2C/T*, $p=0.001$, *NFKB1_3G/A*, $p=0.002$, *NFKB1_4C/T*, $p=0.002$, *NFKB1_5T/C*, $p=0.02$, *NFKB1_7C/T*, $p=0.02$, *NFKB1_10G/C*, $p=0.008$, *NFKB1_11T/C*, $p=0.008$) si mostraron asociación con ARJ. Los genes *TYK2*, *FCRL3*, *TNFR1*, y *NFKB1* se asociaron con ARJ de manera dependiente de género, en varones se mostró lo siguiente; *TYK2* -1218A/G, $p=0.002$, *FCRL3* -169T/C, $p=0.003$, y *TNFR1* -309G/T, $p=0.004$, mientras en mujeres: *NFKB1* -94ATTG/-, $p=0.01$, *NFKB1_1C/T*, $p=0.018$, *NFKB1_2C/T*, $p=0.004$, *NFKB1_3G/A*, $p=0.008$, *NFKB1_4C/T*, $p=0.004$, *NFKB1_5T/C*, $p=0.002$, *NFKB1_10G/C*, $p=0.027$, *NFKB1_11T/C*, $p=0.028$. El análisis de haplotipos mostró una asociación de los genes *FCRL3*, *TNFR1* y *NFKB1* y ARJ. Los haplotipos CGCA de *FCRL3* y InsTTATCCTTCCG de *NFKB1* mostraron los siguientes valores; OR 0.35, $p=0.00005$, y OR 0.65, $p=0.0052$, respectivamente. Mientras el haplotipo CTTGC de *TNFR1* mostró la siguiente asociación; OR 1.62, $p=.016$. El análisis de expresión génica mostró que el alelo T del SNP -309G/T de *TNFR1* asociado a ARJ en varones no afecta los niveles de expresión en individuos sanos. Nuestros datos sugieren que estos polimorfismos son marcadores importantes de desarrollo a ARJ en nuestra población.

Abstract

Juvenile rheumatoid arthritis (JRA) comprises the most common autoimmune arthropathies of childhood. Strong evidences suggests that development are involved both genetic and environmental factors. Several single nucleotide polymorphisms (SNP) found in genes involved with inflammation and autoimmunity have been associated with susceptibility to JRA. We performed a case – control study including two hundred fifteen patients with JRA and four hundred thirty controls. The aim was to evaluate the impact of 41 SNP in 14 candidate genes of the immune system and its relationship to susceptibility to develop this disease multifactorial. Our results suggest that all SNP of *IL2*, *IL8*, *IL17*, *CD40*, *CD80*, *GM-CSF*, *MCP-1*, *TACE*, *TNFR1*, *TNFR2*, *TYK2*, *IL23R*, *FCRL3* and *NFKB1* genes were in Hardy-Weinberg equilibrium (E-HW), except the SNP-1455A / C *TACE*, E-HW $p = 0.002$). SNP located in the *IL2*, *IL8*, *IL17*, *CD40*, *GMCSF*, *MCP1*, *TNFR2* y *TACE* are not involved in the JRA physiopathology. However, *TYK2* (-1218A/G, $p=0.008$), *IL23R* (-738G/A, $p=0.02$), *FCRL3* (-169T/C, $p=0.03$), and *NFKB1* (-94ATTG/-, $p=0.016$, *NFKB1_1C/T*, $p=0.01$, *NFKB1_2C/T*, $p=0.001$, *NFKB1_3G/A*, $p=0.002$, *NFKB1_4C/T*, $p=0.002$, *NFKB1_5T/C*, $p=0.02$, *NFKB1_7C/T*, $p=0.02$, *NFKB1_10G/C*, $p=0.008$, *NFKB1_11T/C*, $p=0.008$) polymorphisms were associated with JRA. After gender stratification, we found an association between JRA and *TYK2* (-1218A/G, $p=0.002$), *FCRL3* (-169T/C, $p=0.003$), and *TNFR1* (-309T/G, $p=0.004$) genes in male group. While in women we observed the following: *NFKB1* -94ATTG/-, $p=0.01$, *NFKB1_1C/T*, $p=0.018$, *NFKB1_2C/T*, $p=0.004$, *NFKB1_3G/A*, $p=0.008$, *NFKB1_4C/T*, $p=0.004$, *NFKB1_5T/C*, $p=0.002$, *NFKB1_10G/C*, $p=0.027$, *NFKB1_11T/C*, $p=0.028$. Haplotype analysis showed an association between haplotypes involving *FCRL3*, *NFKB1* (gene and JRA. The CGCA and InsTTATCCTTCCG haplotype of *FCRL3* and *NFKB1* showed association with JRA (OR 0.35, $p=0.00005$, y OR 0.65, $p=0.0052$, respectively). Meanwhile, CTTGC haplotype of *TNFR1* showed association with susceptibility to JRA (OR 1.62, $p=0.016$). Gene expression analysis in males showed no significant difference in the *TNFR1* expression level either T or G alleles of -309G/T SNP. Ours results suggest that *TYK2*, *IL23R*, *FCRL3*, *TNFR1* and *NFKB1* gene are associated with JRA in Mexican population.

1. Introducción

1.1. Artritis reumatoide

La artritis representa un grupo heterogéneo de enfermedades inflamatorias articulares que se asocian con manifestaciones extrarticulares.¹ Estas patologías se dividen por el tiempo de evolución en artritis aguda y crónica. La artritis aguda tienen un tiempo de evolución inferior a 6 semanas, (no sólo es una causa de urgencia médica por la incapacidad funcional, sino también porque si se deja evolucionar sin un tratamiento adecuado, pueden comprometer la vida de los pacientes, mientras la artritis crónica se presentan en los individuos con un tiempo de evolución mayor a 6 semanas.² Entre las artritis crónicas autoinmunes más comunes en adultos y niños se encuentran la artritis reumatoide (AR) y la artritis reumatoide juvenil (ARJ), respectivamente. Siendo incluso la AR y la ARJ las enfermedades autoinmunes más comunes³⁻⁵.

1.1.1 Prevalencia e incidencia de la ARJ

La incidencia y prevalencia exacta de la ARJ no está muy clara; en Finlandia se ha reportado una prevalencia de apenas el 0.1% de las enfermedades que afectan a dicha población⁶. Otros estudios han reportado que la incidencia de la ARJ varía considerablemente de una población a otra, pero en general se presenta entre 10 a 23 por cada 100,000 niños (Tabla 1), mientras la prevalencia se presenta de 0.83 a 220 por cada 100,000 nacidos vivos⁷.

1.1.2 Características clínicas de la ARJ

La ARJ es una enfermedad caracterizada por presentar inflamación en una o más articulaciones con al menos 6 semanas de evolución que afecta a niños menores de 16 años, y predomina en el género femenino³. Esta entidad se caracteriza por inflamación, edema, eritema, prurito, pérdida de la función y rigidez articular que frecuentemente causa discapacidad funcional, alterando la calidad de vida de los individuos afectados. Durante la evolución de la enfermedad se van destruyendo progresivamente las articulaciones debido a procesos inflamatorios desregulados. Sin embargo, la enfermedad se puede presentar con manifestaciones clínicas muy

variable y puede ir desde la inflamación de una articulación, hiperemia y prurito, hasta destrucción del cartílago y erosión de hueso de varias articulaciones; incluso puede haber manifestaciones extrarticulares^{7,8}. Estos eventos destruyen progresivamente la estructura normal de los componentes articulares y el daño que sufren las articulaciones depende de la gravedad de la enfermedad⁹. En la ARJ generalmente las articulaciones grandes son las más afectadas, sin embargo, las articulaciones pequeñas como las de manos y pies se ven involucradas especialmente en algunos subtipos clínicos¹⁰. En ocasiones, también las articulaciones temporo-mandibular, cervicales, torácicas y columna lumbar pueden estar afectadas en los pacientes con esta patología^{11,12}. Otro rasgo clínico común en niñas es la uveítis.

Tabla 1. Incidencia y prevalencia de la ARJ en diferentes poblaciones.

País	Incidencia No/100,000	Prevalencia No/100,000	Autores
Japón	0.83	*NR	Fujikawa y Okuni , 1997
Finlandia	19.5	*NR	Kaipianen
Noruega	22.6	148.1	Seppanen,1995
Turquía	*NR	64	Moe y Rygg, 1998
Alemania	3.5	20	Ozen, 1998
Australia	*NR	400	Kiessling, et al. 1988
Costa Rica	6.8	34.9	Manners and Diapevven

▲ NR. No reportado (Datos tomados de Schneider R)⁷.

1.1.3 Clasificación de la artritis reumatoide crónica

El Colegio Americano de Reumatología (ACR por sus siglas en ingles)¹³, la Asociación Europea Contra el Reumatismo (EULAR)¹⁴ y la Asociación Internacional Contra el Reumatismo (ILAR)¹⁵, han clasificado a los niños con artritis reumatoide crónica tomando en cuenta los síntomas y algunos marcadores moleculares presentes en los individuos afectados (Tabla 2). 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.

Tabla 2. Clasificación de las artritis crónicas en niños.

ACR (1997) ARJ	EULAR (1978) ACJ*	ILAR (1997) AIJ**
Sistémica	Sistémica	Sistémica
Poliarticular	Poliarticular	Poliarticular FR positivo
Oligoarticular	ARJ	Poliarticular FR negativo
	Oligoarticular	Oligoarticular: persistente
	Artritis con psoriasis	extendida
		Artritis relacionada con psoriasis
		Artritis relacionada con entesitis
		Otras

* ACJ: Artritis crónica juvenil ** AIJ: Artritis idiopática juvenil

1.1.4. Clasificación de la ARJ

El ACR clasifica a la artritis reumatoide de acuerdo al número de articulaciones afectadas con una evolución no menor a seis semanas en niños menores de 16 años. Esta clasificación subdivide a la enfermedad en tres subtipos clínicos, los cuales son definidos por los síntomas clínicos que se presentan en los primeros seis meses de enfermedad. El curso clínico de la ARJ se puede predecir después de los primeros seis meses de enfermedad¹³. Los tres principales subtipos de la ARJ son, a) pauciarticular u oligoarticular, b) poliarticular y c) sistémica.

1.1.4.1 ARJ pauciarticular

Este subtipo se desarrolla en al menos el 50% de los niños afectados con ARJ, y suele presentarse antes de los 6 años de edad y se caracteriza por presentar inflamación de al menos cinco articulaciones durante los primeros seis meses de evolución de la enfermedad, usualmente se ven afectadas las grandes articulaciones como cuello, muñecas, rodillas y tobillos. Un porcentaje importante de los individuos con ARJ pauciarticular sintetizan anticuerpos antinucleares (ANA) y la mayoría de ellos desarrollan uveitis^{7,9}. Este subtipo casi nunca afecta las caderas y raramente las articulaciones pequeñas de las manos y pies. Algunos investigadores frecuentemente dividen a los subtipos pauciarticular en subtipo persistente o extendido (Tabla 2)¹³.

1.1.4.2 ARJ poliarticular

Este subtipo representa aproximadamente el 35% de los casos con ARJ y se caracteriza por la presencia de artritis en más de cinco articulaciones dentro de los primeros seis meses de evolución de la enfermedad. Aquí se incluyen a los pacientes con factor reumatoide positivo (FR+) y negativo (FR-). Este subtipo puede ser simétrico y usualmente involucra a articulaciones grandes y pequeñas de manos y pies, aunque también otras articulaciones como la de la espina cervical y temporomandibular pueden estar afectadas¹². Los pacientes seropositivos al FR frecuentemente desarrollan poliartritis más tempranamente que aquellos con FR negativo, quienes tienen un pronóstico clínico variable^{8,11}. Los pacientes con FR positivo son principalmente adolescentes con artritis simétricas pequeñas y sinovitis erosiva temprana. Algunos subtipos clínicas de la ARJ se asocian con variantes genéticas comunes, sin embargo, este subtipo en particular no tiene gran asociación con el complejo principal de histocompatibilidad (CPH) o antígeno leucocitario humano (HLA)^{7,11}.

1.1.4.3. ARJ sistémico

Este subtipo representa aproximadamente el 15% de los casos con ARJ y se caracteriza por presentar manifestaciones sistémicas extraarticulares como fiebre igual o mayor a 39°C durante lapsos que pueden oscilar entre varias semanas, meses y en algunos casos años. La ARJ sistémica usualmente afecta más de 5 articulaciones tanto grandes como pequeñas¹⁰. Algunos rasgos clásicos del

subtipo sistémico son los picos de fiebre elevada, linfadenopatía, pleuritis, pericarditis o esplenomegalia^{7,10,16}. Por otro lado, no se ha reportado asociación con la edad, género o HLA⁷.

1.1.5. Etiología de la ARJ

La etiología de la ARJ no está bien definida, sin embargo, existe un gran número de evidencias que sugieren que esta patología tiene un origen multifactorial, es decir, se requiere de la interacción de múltiples genes con el medio ambiente⁷. Aunque los factores ambientales involucrados en el desarrollo de esta entidad no se han establecido claramente, se han observado diversas asociaciones con niveles anormales de hormonas, traumas articulares, microorganismos infecciosos como el virus de la rubéola, retrovirus, virus de la hepatitis C, parvovirus B19, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma* y *Helicobacter pylori*, entre otros. Sin embargo, ninguna de estas evidencias han sido replicadas en laboratorios de investigación⁷. Mediante estudios en familias y gemelos se ha logrado documentar la participación de factores genéticos en el desarrollo de esta patología, incluso, se ha asociado con algunos genes del CPH en ratones o el HLA en humanos y otros genes involucrados con susceptibilidad y/o gravedad con la enfermedad principalmente *TNF- α* , *IL6*, *MIF* y *PTPN22*, entre otros³.

1.1.6. Fisiopatología de la ARJ

Una articulación es una serie de estructuras que permiten la conjunción de dos o más huesos y pueden ser móviles o fijas¹⁷. Gran parte de la movilidad corporal se debe a la presencia de diversos tipos articulaciones como las fibrosas, cartilaginosas y sinoviales¹⁷. En estas últimas, los huesos que forman este tipo de articulaciones cuentan con una cavidad sinovial y se mantienen juntos por la acción del tejido conectivo denso irregular de una capsula articular y con frecuencia por el trabajo de los ligamentos. Las membranas sinoviales revisten las cavidades de articulaciones con libertad de movimiento y se componen de tejido conectivo areolar con fibras elásticas y número variable de adipocitos. Diversos tipos celulares de la membrana sinovial secretan líquido sinovial, *per se* su función es lubricar las articulaciones para reducir la fricción, proporcionar nutrientes y eliminar desechos metabólicos de los condrocitos del cartílago articular¹⁷. Los estudios anatómico-histológicos y genético-molecular en ARJ son

escasos, sin embargo, aunque existen diferencias marcadas entre la forma infantil y del adulto, los extensos estudios realizados en AR han sido muy útiles como modelo para esclarecer el daño anatómico-histológico y genético-molecular en pacientes con ARJ. Los análisis histológicos de pacientes con AR han mostrado una fuerte participación de eventos inflamatorios en la membrana sinovial y en el pannus, lo cual contribuye en la patogénesis de la remodelación del tejido conectivo sinovial anormal, estos mismos eventos se cree pueden pasar en ARJ (Figura 1)¹⁰.

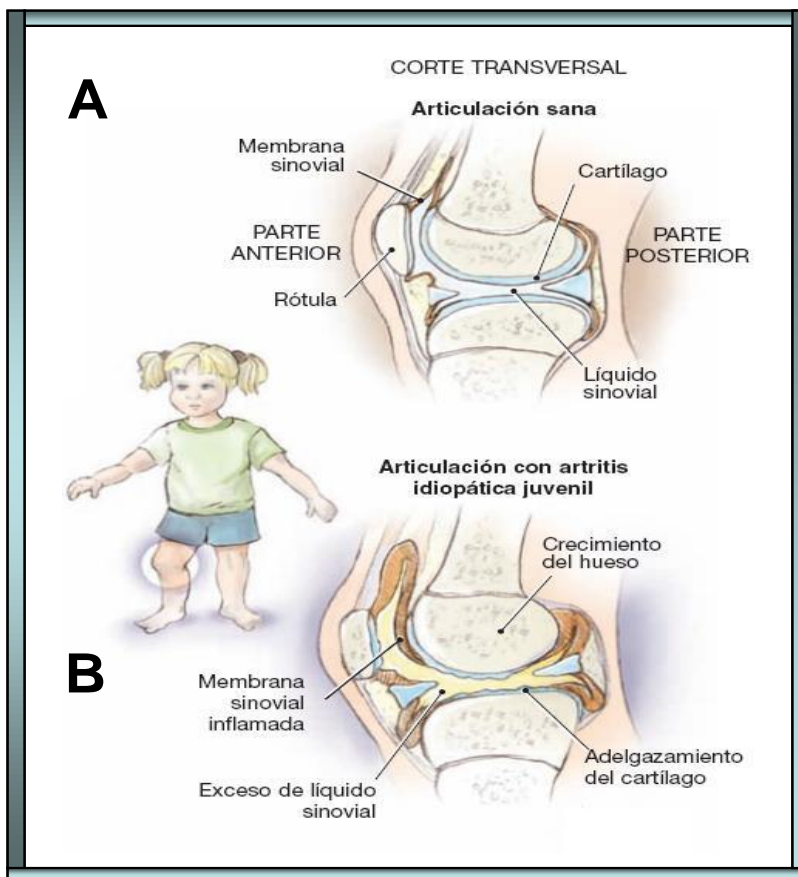


Figura 1. Articulación diartrosica normal y afectada por ARJ. A) Estructura y componentes básicos de una articulación normal con movimiento, las articulaciones están protegidas por una membrana sinovial. **B)** En la ARJ, la membrana sinovial se inflama y su estructura y su función se ven afectadas junto con el cartilago y hueso.

Diversas investigaciones han documentado que en la ARJ, varios tipos celulares del sistema inmune innato y adaptativo reaccionan contra tejidos propios de los individuos afectados con esta enfermedad. Lo anterior es debido a una falla en la clonalidad de los linfocitos T, produciendo daño tisular y en un porcentaje importante, daño sistémico. En la membrana sinovial de los pacientes con ARJ se infiltran diversos tipos de células inflamatorias como macrófagos, neutrófilos, células plasmáticas, células dendríticas y una alta proporción de células T activadas (las cuales contienen altas concentraciones de receptores de quimiocinas) que actúan contra las células de la membrana sinovial de las articulaciones^{3,10,18}. Diversos estudios muestran la importancia de los fibroblastos sinoviales en la producción de diferentes proteínas implicadas en la inflamación, destrucción del cartílago y hueso (Tabla 3)¹⁹. Se ha observado también que los linfocitos B juegan un papel fundamental en el desarrollo de la artritis; la presencia del anticuerpo monoclonal dirigido contra CD20 de los linfocitos B de ratones causa una completa disociación de los folículos de las células B y reduce significativamente la síntesis de la IL-1 β , INF γ , citocinas sintetizadas por los linfocitos T e involucradas fuertemente con esta enfermedad. Estos datos sugieren que las células B tienen un efecto en el desarrollo de la ARJ²⁰. Además de las células implicadas en el desarrollo de la autoinmunidad, algunas moléculas solubles como el TNF- α , IL6, IL1 β y la proteína C reactiva juegan un papel clave en la inflamación, destrucción del cartílago y erosión del hueso, llevando al daño de la estructura articular (Figura 2). El TNF- α y la IL1 β inducen la activación de diversas enzimas de la matriz extracelular, tales como las metaloproteasas^{10,21,22}.

En la ARJ existen pocos estudios que permiten explicar la fisiopatología de la enfermedad. En este sentido, la AR ha sido ampliamente estudiada y diversos modelos de autoinmunidad desarrollados para estudiar la AR han servido para proponer vías fisiopatológicas comunes entre ellas. La primera de ellas propone un papel fundamental de los linfocitos B autoreactivos en la generación de señales de perpetuación y en la activación de los linfocitos T CD4⁺ a través del FR (inmunoglobulina M: IgM, la cuál se ha propuesto puede generar autoinmunidad). Cuando el FR interactúa con un antígeno X (desconocido), la fracción cristalizable (Fc) del FR se une a un receptor de las células B (RCB), posteriormente ocurre endocitosis del antígeno, el cual es degradado en el citoplasma y presentado en

moléculas del HLA clase II en la membrana de la célula presentadora de antígeno (CPA). Así el HLA junto con el antígeno y las moléculas coestimuladoras de los linfocitos B activan a los linfocitos T CD4⁺ e inducen su proliferación y diferenciación al fenotipo Th2. Finalmente, estos linfocitos sintetizan una gran cantidad de citocinas y quimiocinas que ayudan a perpetuar la activación de los linfocitos B autoreactivos. Otra evidencia experimental propone que el FR puede interactuar con proteínas del complemento como la C3d, al unirse con el receptor 2 del complemento estimula a los linfocitos B autoreactivos a producir moléculas coestimuladoras, así como también la activación de los linfocitos T (Figura 3)^{23,24}.

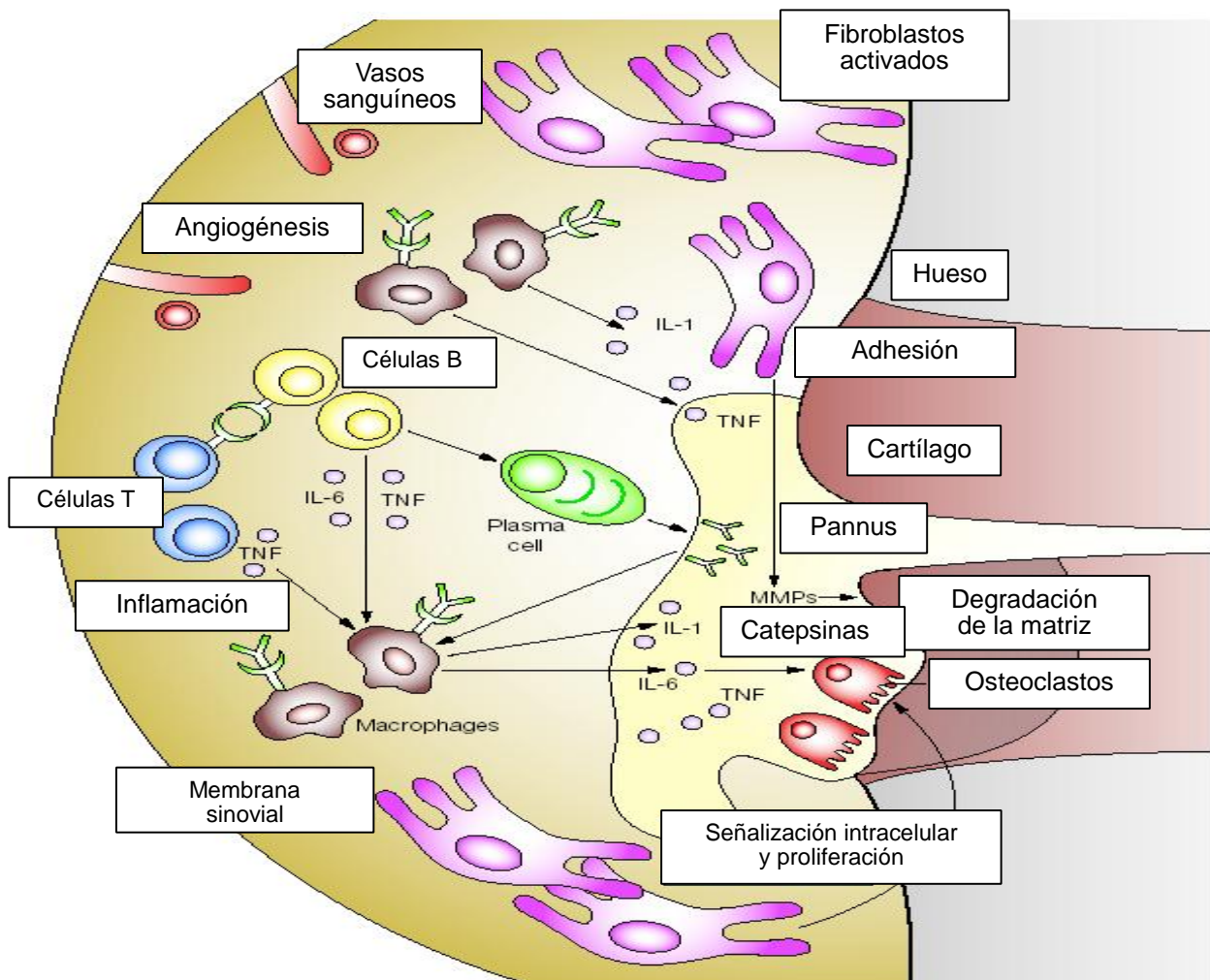


Figura 2. Células y moléculas involucradas en la inflamación sinovial, destrucción del cartílago y erosión del hueso. Las células de la membrana sinovial y las moléculas solubles que liberan al líquido sinovial tienen un papel fundamental en la inflamación, la angiogénesis, la degradación del cartílago y la erosión del hueso. (Tomado de Müller-Ladner, 2005)

Tabla 3. Moléculas efectoras liberadas por fibroblastos de la membrana sinovial.

Citocinas y quimiocinas efectoras	Función
> IL-8, TGF- β , PDGF, GM-CSF, G-CSF, FGF, VEGF, EGF.	Angiogénesis
> IL-8, IL-16, MCP-1, MIP-1, MCP-1 α	Quimiocinas
> IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-15, LIF, PDGF, MIF, GM-CSF, TRX	Citocinas pro-inflamatorias
> IL4, IL-10	Citocinas anti-inflamatorias
> PGE ₂ , 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

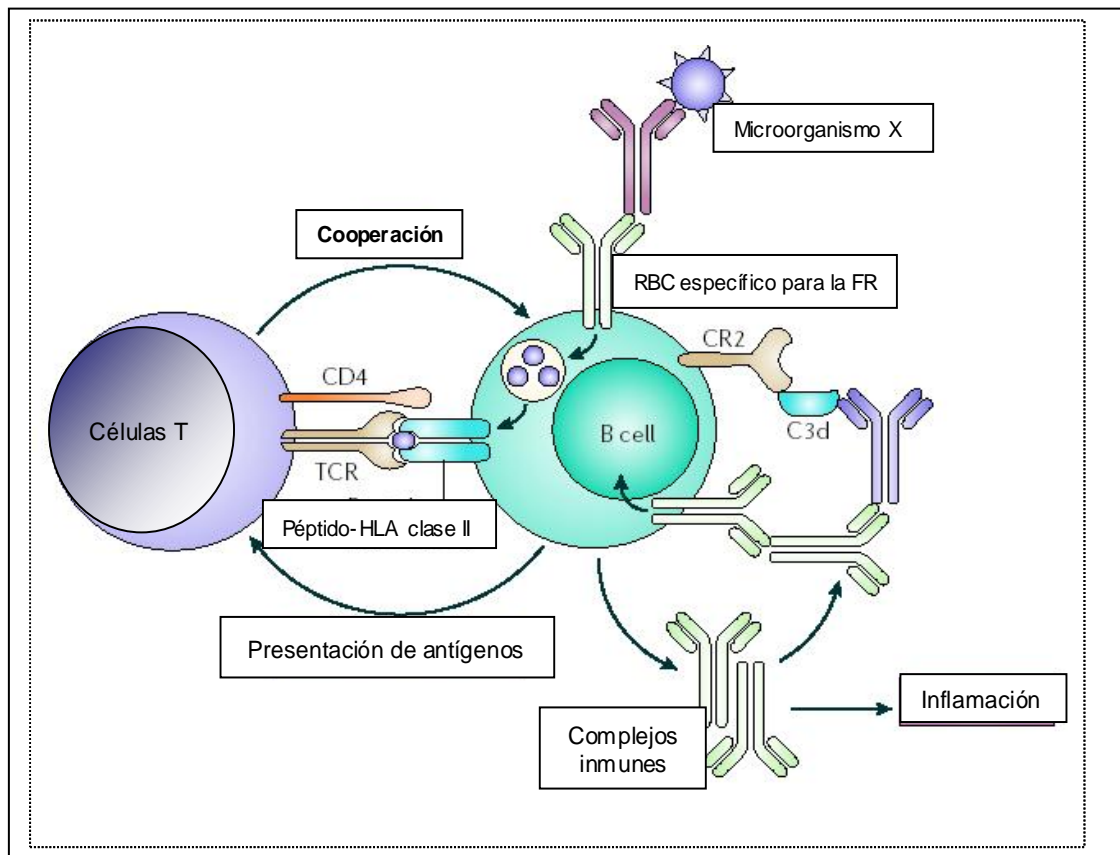


Figura 3. Modelo de auto-perpetuación de los linfocitos B autoreactivos y génesis de la artritis. Posible papel de autoanticuerpos (FR) mediada por células B autoreactivas en la génesis de la AR (Tomado de Edgard, 2006).

Por otro lado, otros autores plantearon otra hipótesis derivada de varias evidencias experimentales, esta propone que los linfocitos T asesinos naturales (NK: Natural Killer) y las células T autoreactivas juegan un papel fundamental en el desarrollo de enfermedades autoinmunes²⁵. Según esta hipótesis los linfocitos NK pueden regular negativa o positivamente a los linfocitos T autoreactivos ya existentes. Las células NK pueden producir citocinas y quimiocinas que determinan la diferenciación de las células T CD4⁺ vírgenes a células tipo T_H1 o T_H2, de esta manera pueden influir en el desarrollo de la respuesta autoinmune. Por otro lado, las células NK y las CPAs profesionales pueden coadyuvar a la génesis de linfocitos T autoreactivos a través de moléculas coestimuladoras sintetizadas por los linfocitos NK. Finalmente, los linfocitos NK pueden promover directamente la generación de linfocitos T autoreactivos a través de moléculas coestimuladoras como OX40 o 2B4 (Figura 4).

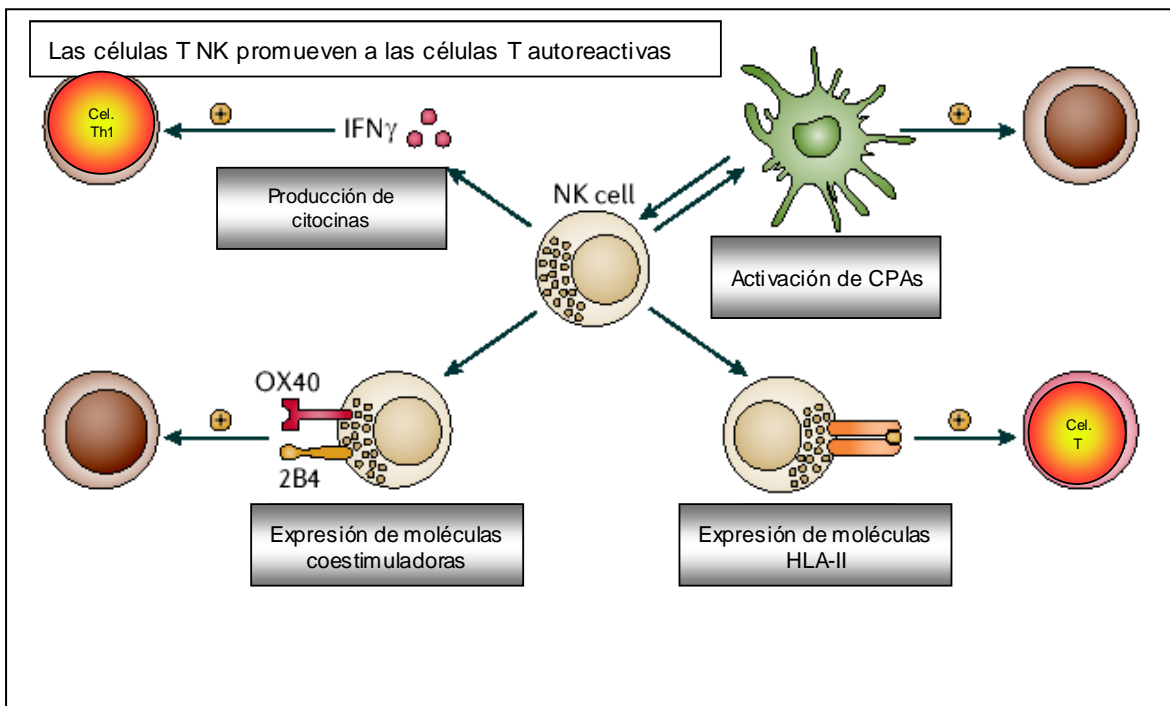


Figura 4. Papel de los linfocitos T autoreactivos en la génesis de autoinmunidad. Hipótesis que propone que los linfocitos NK activan a los linfocitos T autoreactivos en una respuesta autoinmune. (Tomado de Shi, 2006)

Además, existen evidencias experimentales donde se muestra a los linfocitos NK inhibiendo a los linfocitos T autoreactivos. Se ha demostrado también que los linfocitos NK pueden lisar a las células dendríticas autólogas y apagar la respuesta inmune mediada por células T a través de la síntesis de TGF- β . Finalmente, se ha documentado el papel de los linfocitos T en la regulación de eventos de antiproliferativos al activar al gen supresor de tumor p21 (Figura 5)²⁵.

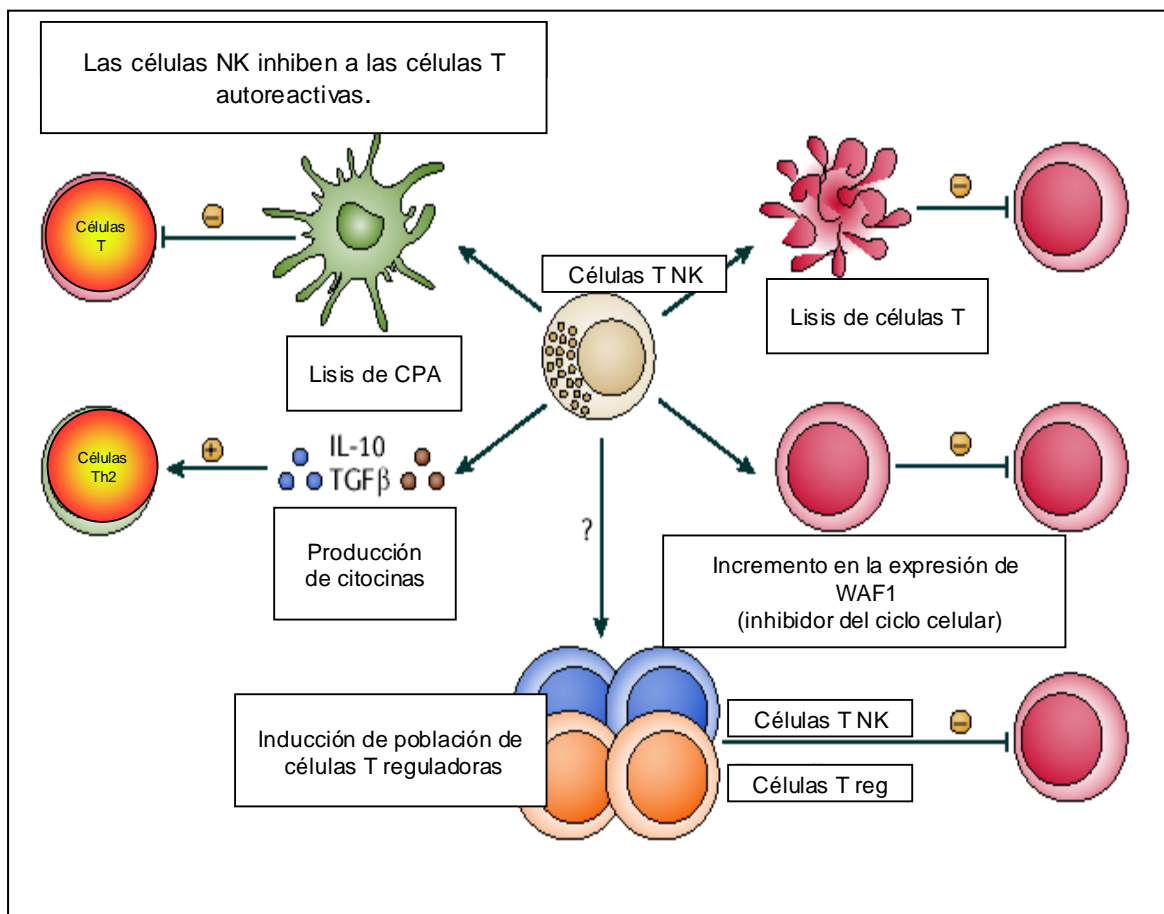


Figura 5. Papel inhibitorio de los linfocitos T NK en autoinmunidad. Mecanismos propuestos por los cuales las células T NK pueden inhibir la activación de los linfocitos T autoreactivos (Tomado de Shi, 2006).

1.1.7. Genética de la ARJ

En ARJ no existen estudios de estimación de su heredabilidad, sin embargo, en otras patologías autoinmunes como la AR, se ha observado que la contribución genética es de aproximadamente el 60%²⁶. Estudios en gemelos y en familias han proporcionado evidencias de la contribución genética en la susceptibilidad a ARJ²⁷. En un estudio donde se incluyeron 113 pares de hermanos con ARJ, se documentó en 71 de ellos una alta concordancia tanto del subtipo clínico como del inicio de la enfermedad²⁸. Por otro lado, se ha demostrado una alta concordancia de la enfermedad en los gemelos monocigotos (MC) comparado con los gemelos dicigotos (DC), estos datos claramente muestran la importancia del factor genético en el desarrollo de esta patología. Se ha calculado la concordancia en gemelos MC, esta es del 30 – 40³⁰⁻³³. Se ha estimado también el riesgo que tiene un gemelo MC, los resultados muestran una probabilidad de 250 – 400 veces más para desarrollar ARJ, comparado con cualquier individuo de la población general. Otros estudios han documentado un riesgo de recurrencia de ARJ en hermanos (ls) es de 15 - 20, similar al de diabetes mellitus tipo I insulino dependiente. La concordancia y la ocurrencia de la enfermedad entre los familiares de primer grado es indicativo de la existencia de factores de riesgo compartidos en la familia^{27,29,30}. Aunque los gemelos y los pares de hermanos con ARJ se han descrito frecuentemente, familias con varios hijos afectados con esta enfermedad sólo rara vez han sido reportadas. Se estima que el riesgo de recurrencia de un individuo que tiene hermanos con ARJ es de 30 veces mayor que el de la población general^{27,31}.

Es bien conocido que variaciones o polimorfismos (variantes genéticas encontradas en la población general con una frecuencia igual o mayor al 1%) en genes que codifican para moléculas del HLA están asociados al desarrollo de la ARJ. Por ejemplo, se han observado polimorfismos genéticos en el HLA-A2 asociados con la aparición temprana de el subtipo oligoarticular en niñas^{7,8}. Se ha documentado también a varios alelos (formas alternativas de un gen) del HLA-DRB1 *08, *11, DQA1*04, *05 y DQB1 *04 asociados con el subtipo oligoarticular persistente, mientras el HLA-DRB1 *08 confiere riesgo al subtipo poliarticular FR negativo y el HLA-DRB1 *11 se ha asociado con riesgo al subtipo sistémico^{7,11,27}. A pesar de las diversas evidencias de la asociación genéticas de algunos alelos

de los HLA con la ARJ, un estudio en pares de hermanos afectados ha mostrado la importancia de las moléculas del HLA en el desarrollo de la ARJ, sin embargo, estos sólo representan alrededor del 17% de todos los genes involucrados con esta patología³⁴. Esto sugiere que otros *loci* encontrados fuera de la región de HLA están involucrados con la fisiopatología de la ARJ.

1.1.8. La ARJ como enfermedad multifactorial

A diferencia de las enfermedades mendelianas o monogénicas (que tienen un patrón de herencia clásico), y cuyo desarrollo depende de una mutación de alta penetrancia en un solo gen, las entidades multifactoriales (que no tienen un patrón de herencia bien definido) dependen de la interacción de muchos genes (enfermedades poligénicas) con polimorfismos o variantes genéticas de baja penetrancia y el medio ambiente, tal como ocurre en la ARJ (Figura 6)^{25,35,36}. Un factor de confusión en el estudio de las enfermedades complejas es la expresividad variable, la cual se refiere al espectro en la gravedad de la enfermedad en un conjunto de individuos afectados. En las enfermedades multifactoriales los genes involucrados en la génesis de dichas patologías se denominan genes de susceptibilidad, más que causales de enfermedad³⁷⁻³⁹. Las características de las enfermedades complejas se muestran en la tabla 4.

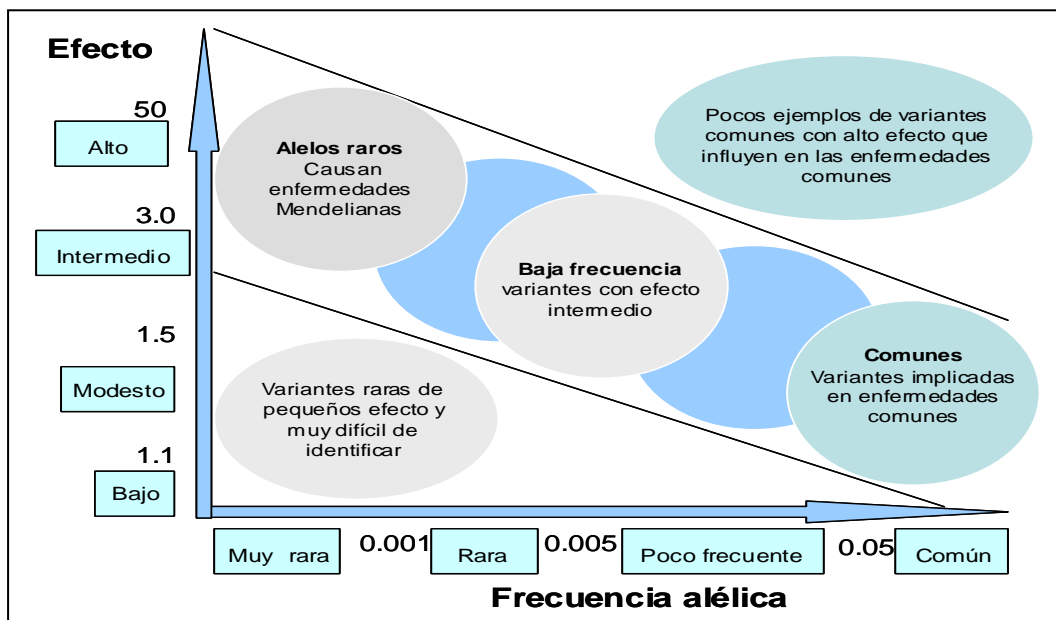


Figura 6. Frecuencia de las variantes genéticas y efecto sobre las enfermedades. Esta imagen muestra como el efecto de una patología depende de la frecuencia de las variaciones genéticas; genes de alta penetrancia (Mendelianas) o baja penetrancia (Complejas). (Modificada de Wright AF, 2001)⁴⁰.

Tabla 4. Características de las enfermedades multifactoriales

Características	Definición
Influencia multifactorial	Contribución genética y ambiental
Poligénica	Influenciada por varios genes
Influenciada por variantes genéticas comunes/raras	STRs, VNTRs, SNPs, CNVs*
Variantes genéticas de baja penetrancia	Una gran proporción de individuos que las portan no manifiestan la enfermedad.
Heterogeneidad genética	Espectro amplio de la gravedad del fenotipo clínico
Heterogeneidad fenotípica	La gravedad y por tanto el subtipo de la enfermedad puede variar entre individuos

1.1.9. Papel de los SNP en la ARJ.

El proyecto del genoma humano, culminado en el 2004, logró determinar la secuencia y el mapa físico de los genes, así como la construcción de una gran base datos de la variabilidad genética del humano, conteniendo principalmente los polimorfismos de un sólo nucleótido o SNP (por sus siglas en inglés). La figura 7 muestra varios SNP, su distribución en un secuencia específica del DNA, varios haplotipos y tagSNP^{41,42}. A partir de los resultados del proyecto del genoma humano se creó el proyecto del mapa de haplotipos o HapMap, el cuál tuvo como objetivos caracterizar el número total de SNP en un genoma, su segregación en bloques de haplotipos y su relación con la susceptibilidad, protección o gravedad en una determinada enfermedad, así como con la respuesta a un determinado fármaco.⁴⁵⁻⁴⁸ Un reporte del HapMap en el 2007, reportó 3.1 millones de SNP distribuidos a través del genoma humano⁴⁹, y para el 2008 éste se incrementó a 11 millones, sin embargo, se ha propuesto una cantidad de hasta 20 millones, muchos de estos son propios de cada población⁵⁰. La importancia del uso de los SNP en las enfermedades complejas radica en su amplia distribución dentro y fuera de los genes (1 en cada 250 pb), sus posibles implicaciones biológicas dependiendo la región del gen se encuentre el SNP, por ejemplo, en la región del promotor, las regiones 5' y 3' UTR, intrones o exones⁵¹⁻⁵³. Además su utilidad

también se debe a la simplicidad para analizarlos por métodos automatizados y su posible asociación con susceptibilidad, protección, gravedad de la enfermedad o la respuesta al tratamiento (Tala 5). Además, otro tipo de polimorfismos causantes de susceptibilidad o protección a enfermedades han sido reportados. Los repetidos en tándem de número variable (VNTR), repetidos cortos en tándem (STR) y variantes en el número de copias (CNV)⁴⁴, si bien son poco frecuentes en los genes y en el genoma humano también son una fuente de variabilidad genética y fenotípica, así como de susceptibilidad o protección a enfermedades. Dado que su tamaño es mayor y son muy informativos (estos presentan un mayor número de genotipos y alelos), estos pueden tener un efecto más claro en las enfermedades multifactoriales o complejas comparado con los SNP^{44,54}. Por su parte, aunque el número de CNV en el genoma es todavía menor al de los STR y VNTR, varios de ellos han sido asociados con patologías autoinmunes como AR y LES⁵⁶⁻⁵⁷. Los CNV abarcan tamaños de al menos 0.5-1 kb de longitud, resultado de amplificaciones, deleciones e inserciones^{54,55}.

Tabla 5. Características de los SNP

Definición de SNPs	Polimorfismos de un sólo nucleótido
Número de alelos	Generalmente bialélicos; un alelo de frecuencia mayor y uno de frecuencia menor (MAF)
Distribución	Amplia; 1 cada 250 pb
Ubicación genómica	Regiones intra e intergénicas
Efecto biológico	SNPs funcionales y no funcionales
Clasificación funcional	rSNPs, srSNPs, cSNPs
Participación en patologías	Confiere susceptibilidad, protección, respuesta al tratamiento, asociados con gravedad
Formas de analizarlos	Metodologías manuales o automatizadas

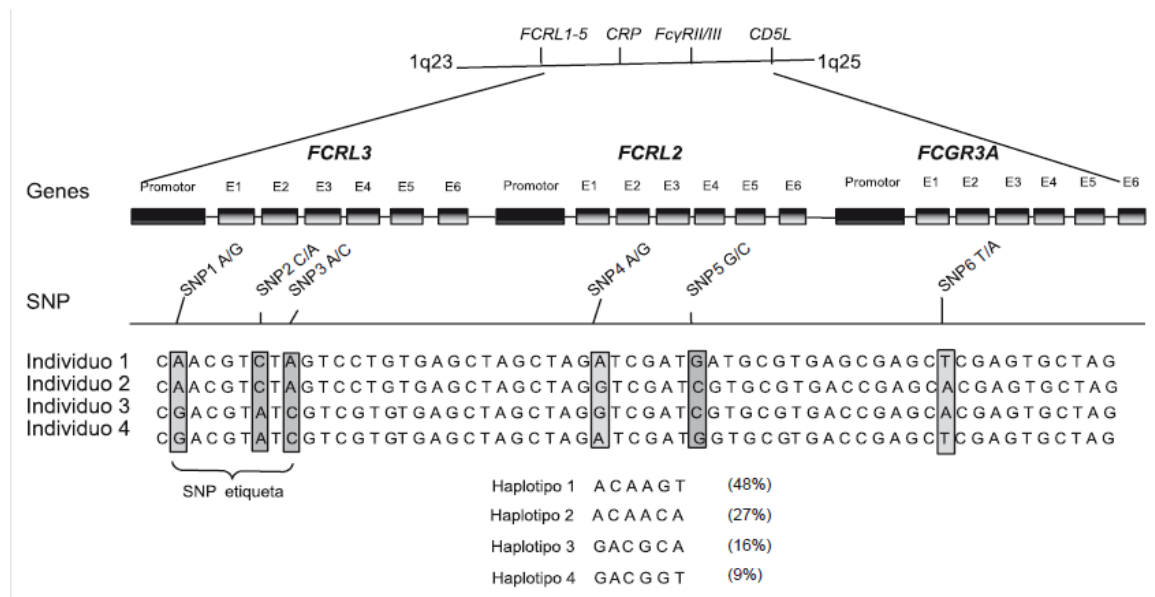


Figura 7. Distribución de SNP en varios genes, combinación de alelos de los SNP y TagSNP. Los SNP tienen una amplia distribución a través del genoma y de los genes. La combinación alélica de los SNP (haplotipos) comúnmente se asocian con diversas enfermedades. Cuando los alelos de los haplotipos están en alto desequilibrio de ligamiento ($r^2 > 0.9$) estos pueden servir como tagSNP, es decir; estos SNP predicen alelos de otros polimorfismos por lo que sólo es necesario analizar el tagSNP para obtener el haplotipo

1.1.10. Estrategias utilizadas en la identificación de genes y regiones genéticas involucradas con ARJ.

Debido a que el factor genético es fundamental en el desarrollo de la ARJ, tanto la la genética como la genómica se han enfocado en la identificación de genes y regiones genómicas involucradas con la enfermedad. Básicamente se han empleado tres estrategias para la identificación de nuevos genes involucrados con las entidades complejas: 1) análisis de ligamiento, 2) análisis de asociación y 3) análisis de expresión génica^{53,58-61}. Sin embargo, dos de las estrategias más ampliamente usadas en los estudios de epidemiología genética son los estudios de ligamiento genético y los de asociación alélica^{53,58-61}. Ambas estrategias son muy importantes para identificar genes involucrados con la ARJ y cada una de ellas presenta ventajas y desventajas, sin embargo, no son excluyentes.

1.1.11. Estudios de ligamiento en ARJ

Este tipo de estrategia representa un recurso muy valioso para identificar genes que tienen una asociación causal con la enfermedad de interés, se puede realizar en familias con múltiples afectados (pedigríes amplios) o pares de hermanos afectados (Figura 8) y se habla de ligamiento cuando los alelos de dos *loci* son cosegregados juntos o con la enfermedad⁶¹. En los primeros estudios de ligamiento se empleaban marcadores genéticos polimórficos altamente informativos distribuidos escasamente en todo el genoma (estudios de ligamiento amplios del genoma: *GWLS*), específicamente con los VNTR o STR; aunque actualmente se pueden emplear a los SNP para este mismo fin debido a su amplia distribución en todo el genoma⁶¹. Con esta estrategia es posible rastrear a un marcador encontrado estrechamente cercano al *locus* que produce la enfermedad, de tal manera que uno de sus alelos puede estar ligado a él (Figura 8). Así, los estudios de ligamiento con un *LOD score* (logarithm (base 10) of odds) mayor a 3 permiten determinar si un marcador genético y el gen predisponente de la enfermedad se encuentran físicamente ligados mediante el análisis de cosegregación del marcador y el fenotipo de la enfermedad^{58,62}. De esta manera, mediante este tipo de estrategia se identifican regiones genómicas involucradas con la ARJ. Hasta la fecha se ha publicado un artículo en pares de hermanos afectados con ARJ, en este se encontraron varias regiones ligadas a ARJ (Tabla 6)⁶³. En las enfermedades multifactoriales como la ARJ donde múltiples genes proporcionan un pequeño 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 estos estudios han sido muy exitosos, como por ejemplo, en la fibrosis quística donde mutaciones puntuales en el gen *CFTR* causan la enfermedad⁶². Cuando ocurre ligamiento genético, entonces se buscan genes candidato dentro del locus para la enfermedad en cuestión. Esta estrategia es compleja e involucra comúnmente regiones grandes y a veces es necesario identificar el o los genes implicados en una región de 20 – 30 millones de pb, la cual, dependiendo del cromosoma, puede contener entre 500 – 1000 genes⁵³. En esta región se buscan genes potencialmente involucrados con la etiología de la enfermedad y, en el caso de la ARJ, genes involucrados con inflamación e inmunidad.

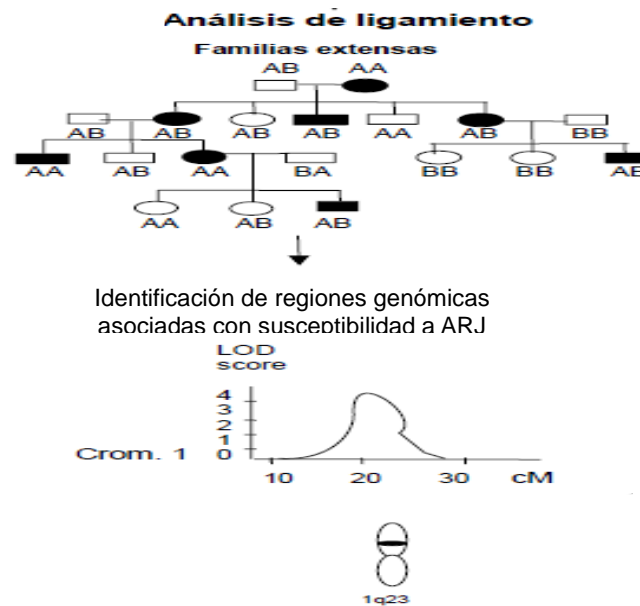


Figura 8. Los análisis de ligamiento en familias afectadas. Estos estudios son un recurso valioso para identificar regiones genómicas que tienen una asociación causal con un fenotipo o enfermedad de interés, estos análisis se realizan en familias extensas o en pares de hermanos afectados (Modificado de Velázquez-Cruz R, et al. 2012).

Tabla 6. Regiones ligadas a ARJ y posibles genes involucrados con su fisiopatología.

Banda citogenética	Gen (es)	Función
1p36	<i>TNFR2</i>	Está implicada en señalización intracelular, proliferación e inflamación
6p21	<i>HLA I, HLA II, TNF α</i>	Los HLA I y II actúan como moléculas presentadoras de antígenos intracelulares y extracelulares, respectivamente. TNF- α es la principal citocina inflamatoria involucrada con destrucción del cartílago y erosión del hueso.
19p13	<i>TNFSF9</i>	Involucrado en la presentación de antígenos y en la generación de linfocitos T citotóxicos.
Subtipo poliarticular		
Xp11	<i>TIMP1</i>	El inhibidor de las metaloproteasas regula la actividad de dichas proteínas
oligoarticular		
4q24	<i>NFKB1</i>	Es un importante factor de transcripción involucrado con la expresión de genes proinflamatorios, de proliferación, diferenciación, etc.,
19p13	<i>TNFSF9</i>	Involucrado en la presentación de antígenos y en la generación de linfocitos T citotóxicos.

TNFR2; Receptor 2 del factor de necrosis tumoral, HLA-I y II: Antígeno leucocitario humano I y II, CC3: Componente 3 del complemento, TNFSF9: Factor 9 de la superfamilia de TNF, TIMP1: Inhibidor 1 de TIMP, CFP: Properdina del factor del complemento, NFKB1; Factor nuclear kB1.

1.1.12. Estudios de asociación alélica

A diferencia de los análisis de ligamiento, en donde se escanea todo el genoma o una región grande del genoma, los estudios de asociación genética se pueden analizar de dos maneras:

a) Estudios de gen candidato: un gen que por su función biológica puede participar en la fisiopatología de la ARJ, este locus no necesariamente debe tener evidencia previa de ligamiento^{58,60}.

b) Análisis de asociación del genoma completo (GWAS): este abordaje permite analizar, dependiendo de la plataforma del microarreglo millones de SNP (Affymetrix e Illumina). Este método es libre de hipótesis y no hay un interés en un gen en particular.

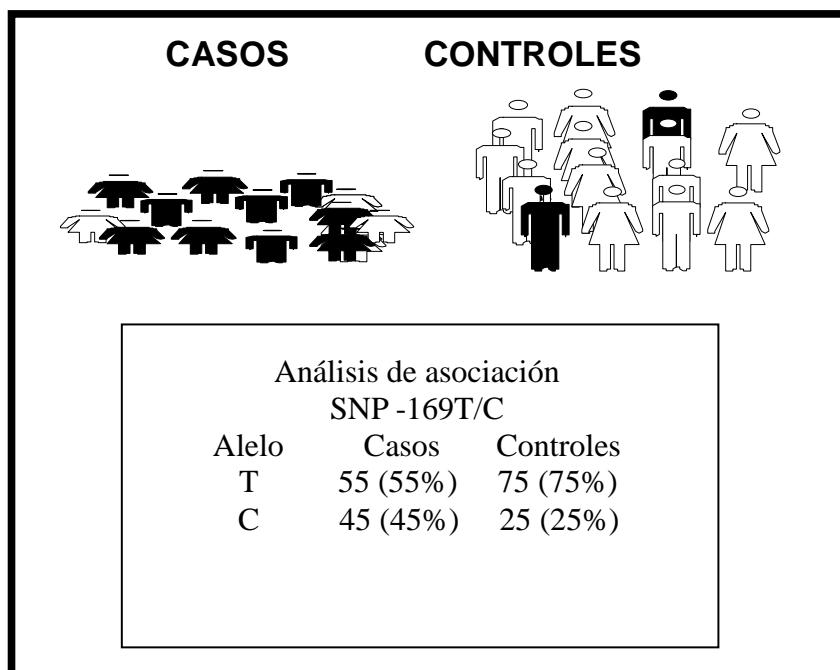


Figura 9. Estudios de asociación casos y controles. En esta imagen se compara la frecuencia alélica del alelo c (frecuencia del alelo menos común: MAF) del SNP -169T/C en casos y controles, como la diferencia en porcentaje es del 20%, este alelo se asocia con susceptibilidad a la enfermedad.

Además, los estudios de asociación se puede realizar en: a) casos y controles (individuos afectados con una patología en particular e individuos sanos no relacionados, sin antecedentes heredofamiliares de la enfermedad de interés y, b) en familias (padres e hijo afectado o pares de hermanos afectados). En los estudios de asociación casos y controles se compara la frecuencia de marcadores polimórficos en ambos grupos. Si el alelo específico del marcador se encuentra en mayor frecuencia en los casos comparado con los controles, con un poder estadístico mayor a 0.8, entonces decimos que el marcador está asociado con susceptibilidad a la enfermedad. Por otro lado, si uno de los alelos del polimorfismo es mayor en controles en comparación con los casos, entonces se sugiere una asociación con protección (Figura 9)⁵⁸⁻⁶⁰. La estrategia de asociación basada en familias elimina las falsas asociaciones debido a estratificación poblacional (subgrupos poblacionales que pueden tener un marcador más frecuente de lo esperado dando falsas asociaciones o rechazando asociaciones verdaderas), esta estrategia es excelente para identificar genes asociados con enfermedades complejas⁵⁸. Un método ampliamente utilizado en este tipo de estudios es la prueba de desequilibrio de transmisión (TDT por siglas en ingles), en ésta se compara la frecuencia con la cual los padres heterocigotos transmiten un alelo específico de un marcador bialélico o su forma alterna a su hijo afectado⁵⁸. Una desviación significativa de la frecuencia de transmisión esperada para cualquiera de los dos alelos (TDT positiva) sugiere que este polimorfismo está involucrado con la fisiopatología de la enfermedad (Figura 10)⁵⁸.

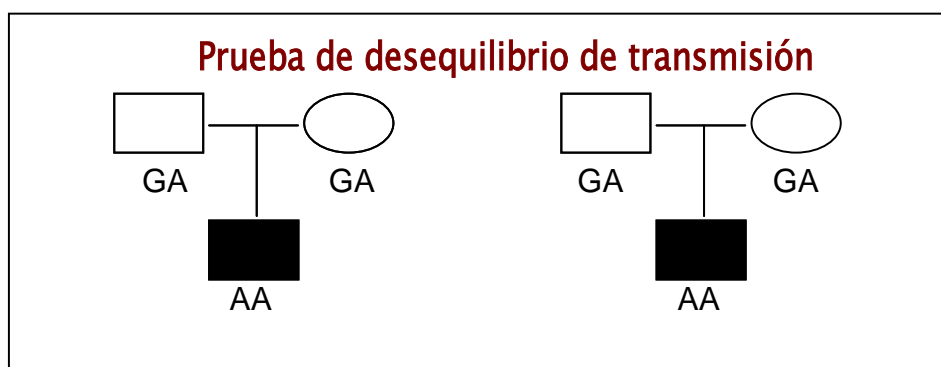


Figura 10. Prueba de desequilibrio de transmisión (TDT). Este estudio de asociación basado en familias (padres e hijo afectado) sirve para observar asociaciones genéticas entre un alelo de un polimorfismo y una enfermedad. Este estudio evita falsas positivas o negativas por estratificación poblacional

1.1.13. Causas de asociación

Las asociaciones se pueden deber al efecto directo del polimorfismo, al desequilibrio de ligamiento y a la estratificación de la población.

i) Efecto directo del marcador alélico en estudio. En algunas ocasiones el polimorfismo estudiado en ciertas enfermedades es la causa directa de asociación debido a que altera de manera funcional al gen (RNAm, splicing, estabilidad, traducción del RNAm) y a la estructura y función de las proteínas^{50,51}.

ii) Desequilibrio de ligamiento. La asociación puede ser debida a otro polimorfismo localizado de manera cercana al polimorfismo que se está estudiando, el cuál puede ser el verdadero causante de la susceptibilidad.

iii) Estratificación poblacional. Muchas poblaciones presentan subgrupos poblacionales que se mezclan comúnmente, esto puede condicionar a que tanto una determinada enfermedad como algunos marcadores alélicos podrían estar enriquecidos entre los individuos de alguno (s) subgrupo (s). Cuando se presenta este fenómeno los estudios pueden dar falsos positivos o falsos negativos⁵⁹.

1.1.14. Efecto directo de los SNP asociados a enfermedades complejas: implicaciones funcionales.

Los SNP puede clasificarse en funcionales y no funcionales, a su vez los funcionales comúnmente se subdividen en: a) SNP reguladores (rSNP) localizados en los promotores de los genes que codifican proteínas y en los no involucrados con la síntesis de proteínas, b) RNA estructurales (srSNP) y se encuentran en cualquier parte del los RNAm y, c) los codificantes (cSNP), localizados en los exones. Estos últimos se subdividen en sinónimos (cuando el cambio de nucleótido, no altera el aminoácido codificado) y no sinónimos (cuando el cambio de nucleótido cambia al aminoácido) (Figura 11)⁶⁴. Dada la amplia distribución de los SNP en el genoma humano, éstos pueden ser encontrados en cualquier parte de la estructura de los genes. Así, dependiendo de su ubicación, los SNP funcionales pueden afectar la expresión génica, la traducción de los RNAm a proteínas, el corte y empalme, la estabilidad de los RNAm y la estructura

y función de las proteínas (Figura 12)⁶⁴.

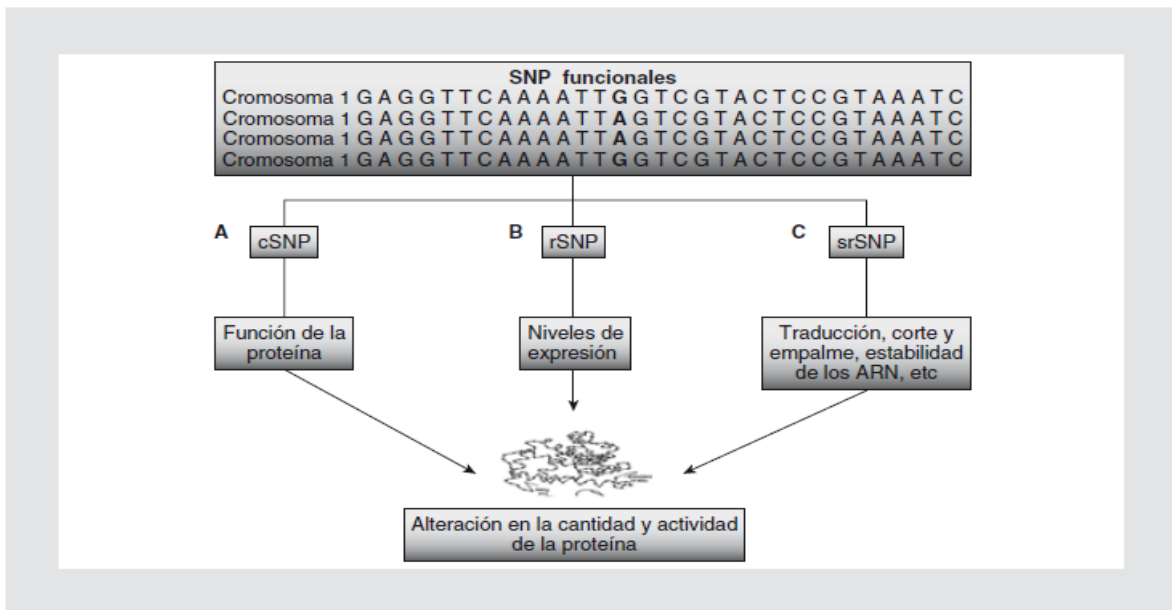


Figura 11. Clasificación de los SNP funcionales. El diagrama muestra la clasificación de los SNP funcionales: SNP reguladores (rSNP), SNP RNA estructurales (srSNP) y SNP codificantes (cSNP). Cada uno de ellos puede tener una implicación directa en la alteración del gen, RNA o proteína y asociarse con alguna enfermedad compleja. (Tomado de Ramírez Bello J, 2013)

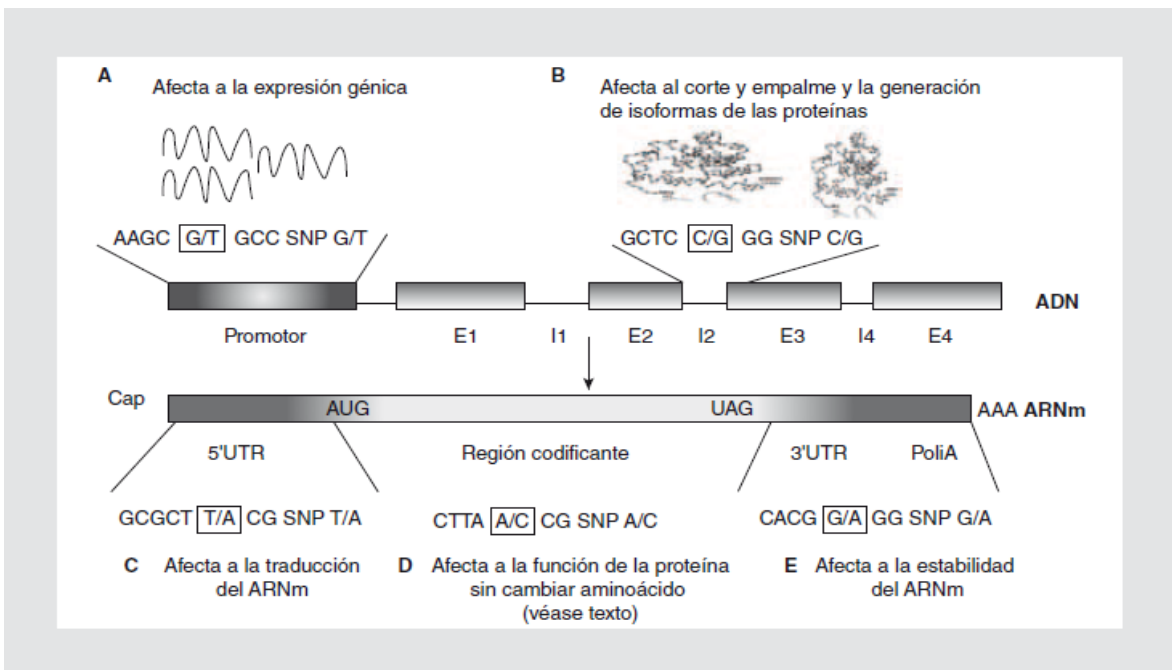


Figura 12. Implicaciones biológicas de los SNP funcionales en las enfermedades Dependiendo del lugar en donde se encuentren los SNP funcionales pueden afectar la expresión génica (rSNP), la traducción, splicing, los enhancer o inhibidores de splicing, la estabilidad de los RNAm (srSNP) y a la función de la proteína (cSNP). (Tomado de Ramírez Bello J, 2013)

1.1.15. La importancia de los rSNP

La expresión génica es un fenómeno biológico de vital importancia para el crecimiento, diferenciación, apoptosis y desarrollo de cada una de las células y de los organismos. Dicho proceso depende de elementos *cis* reguladores encontrados en las regiones promotoras, específicamente en el núcleo y en los elementos próximos del promotor de genes codificantes y no codificantes de proteínas⁶⁵⁻⁶⁷. Diversas secuencias consenso *cis* ubicadas en el promotor y distintas proteínas que actúan en *trans*, tales como factores de transcripción, proteínas reguladoras de la transcripción, RNA polimerasa II y otros elementos, modulan la expresión génica de manera tejido específica⁶⁵⁻⁶⁶. Diversos reportes han documentado que las diferencias inter-individuales en la expresión génica debido a la presencia de rSNP pueden modificar el fenotipo en enfermedades complejas⁶⁷. Un ejemplo de esto lo representa el rSNP -169T/C ubicado en el promotor del gen *FCRL3*, el cuál codifica para la proteína 3 parecida a la fracción cristalizable gamma (*FcyRL3*). Esta variante se encuentra asociada a AR, lupus eritematoso sistémico (LES) y tiroiditis autoinmune (TA)⁶⁸. Estudios *in silico* y funcionales demostraron el impacto del alelo C de éste rSNP en la modificación de la afinidad de unión al factor de transcripción NF-κB, resultando en una mayor expresión de este gen regulador de la inmunidad innata y adaptativa, de esta manera, una mayor expresión de *FCRL3* puede contribuir a la génesis de estas tres patologías autoinmunes⁶⁸. Por otro lado, el rSNP -376G/A del gen *TNF-α* (factor de necrosis tumoral alfa), crea un sitio de unión para el factor de transcripción Oct1 que afecta los niveles de expresión en monocitos e incrementa el riesgo a padecer malaria cerebral en Africanos⁶⁹. Este mismo rSNP afecta los niveles de expresión del gen cercano linfotóxina A, y ha sido asociado con infarto agudo al miocardio⁷⁰. Otro rSNP de *TNF-α* (-308 G/A) se ha asociado no sólo con

susceptibilidad, sino también con gravedad y respuesta al tratamiento en varias enfermedades autoinmunes, inflamatorias, tumorales e infecciosas⁷¹⁻⁷⁴. Aunque no se ha documentado cual factor de transcripción se una a alguno de los alelos (G/A) de este rSNP *in vitro*, si se ha documentado una mayor actividad transcripcional e incremento de esta citocina cuando está presente el alelo A⁷⁵.

1.1.16. Genes asociados a ARJ

Hasta la fecha, existen pocos estudios de asociación genética tanto en un diseño con genes candidato como por GWAS en pacientes con ARJ/JIA. Diversos genes que participan en inflamación, destrucción de cartílago y erosión del hueso han sido estudiados. En la tabla 7 se muestran algunos genes asociados y no asociados a ARJ⁷⁶⁻⁷⁷.

Tabla 7. Genes asociados y no asociados a ARJ

Genes asociados	Función	Genes no asociados	Función
> <i>4q27</i>	Sin función conocida	> <i>ADRB2</i>	Señalización intracelular
> <i>C12orf30</i>	Sin función conocida	> <i>CCL21</i>	Quimioatracción
> <i>CCL5</i>	Quimioatracción	> <i>CD40</i>	Molécula coestimuladora
> <i>CD14</i>	Regula respuesta inmune innata	> <i>CDK6</i>	Progresión del ciclo celular
> <i>CLEC16A</i>	Regula la actividad de la lectina	> <i>PRKCQ</i>	Señalización celular
> <i>IL2RA/CD25</i>	Regula la proliferación de las células B y T		
> <i>MBL2</i>	Activación del complemento		
> <i>STAT4</i>	Transducción de señales		
> <i>TNF-α</i>	Inflamación y autoinmunidad		
> <i>TNFAIP3</i>	Regula procesos inflamatorios		
> <i>TRAF1/C5</i>	Activación del complemento		

1.1.17. Genes incluidos en este estudio (implicadas en inflamación, destrucción del cartílago y erosión del hueso).

Los genes incluidos en este estudio de casos y controles fueron los siguientes: *TYK2*, *IL2*, *IL8*, *IL17*, *IL23R*, *CD40*, *CD80*, *GM-CSF*, *MCP1*, *FCRL3*, *TNF- α* , *TNFR1*, *TNFR2*, *TACE* y *NFKB1*, cada uno de ellos fue seleccionado bajo los siguientes criterios: 1) que codifiquen para proteínas involucradas en inflamación, autoinmunidad y destrucción del cartílago y erosión del hueso (*TNF- α* , *GM-CSF*, *IL-17*, *RANKL*, *PADI4*), 2) que regulen el sistema inmune a través de receptores (*IL-23R*, *FCRL3*, *TNFR1*, *TNFR2*, *CD40*, *CD80*), de señalización (*IL2*, *TYK2*, *NFKB1*, *TACE*), y de quimioatracción (*MCP1*, *IL-8*), 3) por evidencia previa de asociación en ARJ/JIA (*TNF- α*) o en AR (*TYK2*, *FCRL3*), 4) por su ubicación en regiones previamente ligadas a ARJ (*NFKB1* 4q24, *CD40* 20q12) y 5) porque son excelentes genes candidato, aunque no tienen evidencia previa de ligamiento y asociación a ARJ (*IL2*, *IL8*, *IL17*, *CD80*, *GMSCF*, *MCP1*, *TNFR1*, *TNFR2*, *TACE*).

1.1.18. *FCRL3* y su asociación con diversas enfermedades autoinmunes.

En 2005, Kochi y cols., reportaron en población Japonesa la primera evidencia fuerte de asociación entre el gen *FCRL3* y varias enfermedades autoinmunes, incluyendo AR, LES y TA⁶⁸. Los estudios funcionales mostraron *in vitro* que el alelo C del SNP -169T/C afecta los niveles de expresión de *FCRL3* a través de la modificación de la afinidad de unión del factor de transcripción NF- κ B.⁶⁸ Posteriormente, varios estudios epidemiológicos en caucásicos mostraron la ausencia de asociación de este SNP con AR o LES^{78,79}. Sin embargo, dos meta-análisis mostraron la asociación del SNP -169T/C con AR y LES en varias poblaciones asiáticas, específicamente en los del este de Asia^{80,81}. Por otra parte, otros estudios han mostrado una asociación con protección a desarrollar enfermedad autoinmune de Addison (AAD), esclerosis múltiple (EM), TA y LES⁸²⁻⁸⁶. Es necesario realizar más estudios en otras poblaciones para esclarecer el efecto de este gen en la susceptibilidad o protección en las diversas enfermedades autoinmunes.

1.1.19. Importancia de la vía señalización de TNF- α en la ARJ

El TNF- α es una citocina pleiotrópica Th1 (T helper o ayudadoras), la cuál es producida por diferentes tipos de células del cuerpo, incluyendo macrófagos, monocitos, linfocitos, fibroblastos sinoviales, sinoviocitos, etc. Al mismo tiempo TNF- α junto con sus receptores (TNFR1 y TNFR2; conocidos como p55 y p60, respectivamente) se expresan en el sinovium de la mayoría de pacientes con ARJ, este hallazgo los ha involucrado directamente en la patogénesis de la ARJ^{10,88,89}. El TNF- α se encuentra de dos formas en el cuerpo humano, la forma transmembranal (precursora) y la soluble; la primera es liberada de la membrana por la enzima convertidora de TNF- α (TACE)^{91,92}, mientras que la segunda activa varias vías de señalización celular y puede mediar diferentes funciones a través de TNFR1 o TNFR2⁹³. Parecido a TNF- α , TNFR2 también es escindido por TACE⁹⁴. El procesamiento enzimático responsable de escindir al TNFR1 aún no está definido⁹⁵. Algunas diferencias entre TNFR1 y TNFR2 radican en la estructura y función de ambos receptores, el primero tiene una expresión constitutiva, mientras que el segundo sólo se expresa en células del sistema inmune⁹⁶. TNF- α inicia la señalización celular ya sea a través de TNFR1 o TNFR2 que culmina con la activación del factor de transcripción NF- κ B a través de varias quinasas; este factor de transcripción se transloca al núcleo y comienza la transcripción de genes involucrados en la inflamación y en la ARJ (Figura 13)⁹⁵. Debido a la importancia que juega TNF- α y sus receptores en ARJ, se han desarrollado varias estrategias para inhibir sus efectos en la inflamación, en la degradación del cartílago y en la erosión del hueso. Una de estas estrategias consiste en inhibir a TNF- α a través de anticuerpos monoclonales^{96,97}, sin embargo, esta terapia sólo se emplea en los individuos sin mejoría con los fármacos tradicionales modificadores de la enfermedad, como son el metrotexato, la leflunomida, y la sulfasalazine^{98,99}. Actualmente se está evaluando la respuesta a determinados anticuerpos anti-TNF- α sobre el efecto de algunos alelos de este gen (por ejemplo el SNP -308G/A), se ha observado que el genotipo ancestral 308G/G responde significativamente mejor en comparación con los genotipos heterocigoto -308G/A y homocigoto -308A/A^{96,97}. Algunos estudios han analizado diversos tipos de polimorfismos en los genes *TNF- α* , *TNFR1* y *TNFR2* en pacientes con ARJ¹⁰⁰⁻¹⁰³. Sin embargo, los resultados no son consistentes, de hecho, solo los SNP -308G/A y -238G/A de *TNF- α* se han asociado con

susceptibilidad a ARJ en nuestro grupo de trabajo¹⁰³. Los otros genes no se han asociado a ARJ en ninguna población¹⁰⁰⁻¹⁰².

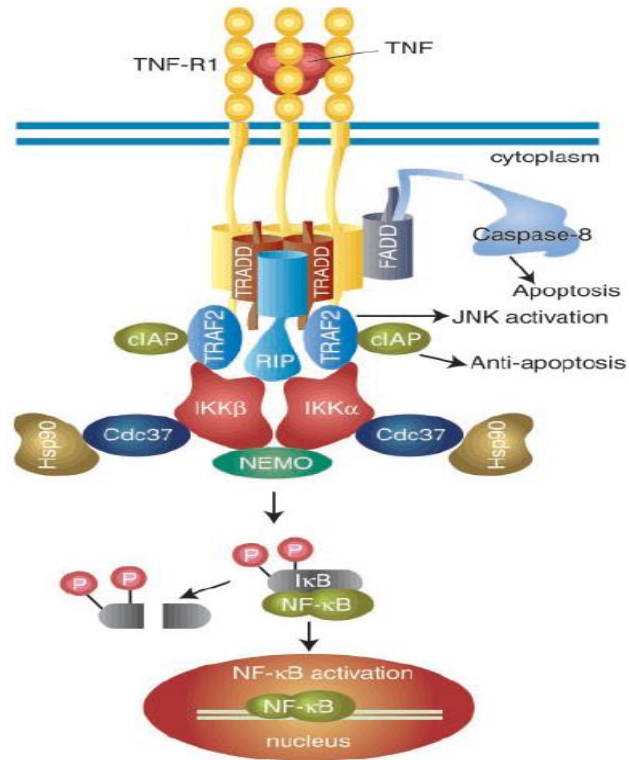


Figura 13. Señalización mediada por TNF- α . TNF- α se une a los receptores TNFR1 o TNFR2 e inicia un proceso de transducción de señales a través de proteínas asociadas, la participación de varias quinasas es determinante para la activación de NF- κ B, factor de transcripción involucrado en la activación de la expresión de genes que participan en inflamación, diferenciación, proliferación, apoptosis, pero también con destrucción del cartílago y erosión del hueso. (Tomado de Chen G, 2001)

2. Justificación

Las enfermedades autoinmunes representan aproximadamente el 5% de todas las patologías diagnosticadas que afectan a Estados Unidos de Norte América y afectan con mayor frecuencia al género femenino. La ARJ representa a la enfermedad reumática autoinmune más común que se presenta en la infancia, esto causa un serio problema de salud, lo cual conlleva a discapacidad funcional debido a la destrucción del cartílago y hueso de los individuos afectados, además esto representa a su vez un alto costo socio-económico para la familia y sociedad. Los estudios de susceptibilidad genéticos en ARJ son escasos en México y en el mundo, por este motivo es necesario analizar el efecto de las diversas variantes genéticas de genes que codifican para proteínas relacionadas con el sistema inmune y su relación con la fisiopatología de la enfermedad. El conocer la distribución de las variantes en la población Mexicana así como su impacto en el desarrollo de la ARJ nos permitirá dar un mejor diagnóstico, pronóstico y esquemas terapéuticos más individualizados.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Determinar si 41 SNP en genes 14 genes (*IL2, IL8, IL17, IL23R, TYK2, CD40, GMCSF, MCP1, TACE, TNFR1, TNFR2, IL23R, FCRL3* y *NFKB1*) candidatos se encuentran asociados con la fisiopatología de la ARJ en una muestra de pacientes mexicanos y evaluar si los genotipos asociados afectan los niveles de expresión de sus transcritos

3.2. Objetivos particulares

- Conocer la frecuencia alélica y genotípica de los SNP de los genes candidatos estudiados en población Mexicana.

- Identificar nuevos polimorfismos en los genes candidatos asociados al desarrollo de ARJ.

- Determinar si existen alelos de riesgo o protección a ARJ en los genes estudiados.

- Determinar si algunos polimorfismos asociados a ARJ tienen un impacto en la expresión de los genes.

4. Hipótesis

Si SNP de los genes *IL2, IL8, IL17, IL23R, TYK2, CD40, GMCSF, MCP1, TACE, TNFR1, TNFR2, IL23R, FCRL3* y *NFKB1* involucrados con inflamación, degradación del cartílago, erosión del hueso y autoinmunidad se encuentran en mayor frecuencia en casos que en controles entonces conferirán susceptibilidad a desarrollar ARJ en población Mexicana.

5. Diseño de estudio

> Observacional, transversal, retrospectivo, descriptivo y comparativo

6. Material

6.1. Población de estudio

En el estudio se incluyeron 215 niños con ARJ y 430 controles. Los pacientes fueron diagnosticados clínicamente con ARJ mediante los criterios que establece el ACR. Los casos fueron captados del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS y del Instituto Nacional de Pediatría (INP), SSa. Los controles fueron individuos sanos, libres de enfermedad y sin antecedentes de algún tipo de enfermedad crónica o cualquier enfermedad autoinmune. Los controles se obtuvieron del banco de sangre del INP, SSa. El protocolo fue aprobado por el comité de ética de cada institución y las muestras fueron tomadas previa firma de la carta de consentimiento informada por padres o tutores.

7. Método

7.1 Análisis molecular

De cada individuo, se extrajo el DNA genómico a partir de linfocitos de sangre periférica con el kit QIAamp DNA blood Maxi kit (Qiagen). El DNA fue cuantificado y diluido para su análisis molecular que incluyó el análisis de diversos SNP en diferentes genes que están relacionados con el sistema inmune. Para el análisis de expresión génica se empleó el RNAm extraído de leucocitos de individuos libres de cualquier enfermedad inflamatoria y autoinmune.

A cada participante se le tomó por venopunción una muestra de 5–10 ml de sangre periférica, la cuál fue almacenada en tubos vacutainer empleando EDTA como anticoagulante. Posteriormente, los tubos vacutainer se centrifugaron durante 15 min., a 2,500 revoluciones por min (r.p.m), la capa de leucocitos obtenida por la centrifugación se transfirió a un tubo de centrífuga de 50 ml y se procedió a colocar 500 µl de proteasa (Qiagen). Inmediatamente después se procedió a homogenizar la mezcla y se dejó incubar durante 5 min y se le agregaron 6 ml de buffer de lisis (AL) y se agitó fuertemente por al menos 1 min. La mezcla se incubó durante 10 min., a 70°C en un baño maría, se abrió la tapa del tubo y se dejó enfriar, después se colocaron 10 ml de alcohol etílico absoluto frío. Posteriormente, la mezcla se agitó fuertemente durante 1 min en un vórtex y se transfirió el sobrenadante a una columna de sílica de QIAGEN contenida en un tubo vacutainer de 50 ml, y se incubó durante 5 min. Una vez realizado esto se

procedió a centrifugar la mezcla encontrada en la columna por 3000 r.p.m., durante 3 min. Después de esto se decantó la solución y se le agregaron a la columna 5 ml de buffer AW1, se tapó el tubo y se centrifugó durante 1 min., a 5000 r.p.m. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se procedió a colocar 5 ml de buffer AW2 en la columna, inmediatamente después se procedió a centrifugar la mezcla a 5000 r.p.m., durante 15 min, se retiró el sobrenadante y se colocó la columna en un tubo vacutainer nuevo de 50 ml. Se agregó 500 μ l de TBE1X y se centrifugó la columna durante 5 min., a 5000 r.p.m., para obtener el DNA. Una vez obtenido el DNA de cada participante se procedió a cuantificarlo. Para esto se empleó el equipo NanoDrop 1000-ND espectrophotometer, el cual genera datos de la relación DNA/ proteínas (260/280 nm). Se realizaron diluciones de cada una de las muestras a una concentración final de 5 y 20ng/ μ l. Esta concentración es adecuada para realizar el análisis de genotipificación de cada polimorfismo y secuenciación, respectivamente.

7.2 Plaqueo de muestras para el análisis de SNP.

Se colocó cada muestra de los casos y controles en placas de 96 pozos denominadas “placas maestra”. Estas placas se caracterizan por tener un volumen de 100 μ l a una concentración de 5 ng/ μ l. De esta placa, se generaron 50 placas de 96 pozos, las cuales contenían en cada pozo una muestra de 10 ng de DNA (2 μ l de la solución original), la localización de cada muestra siempre fue en la misma posición para cada una de las placas (Figura 14).

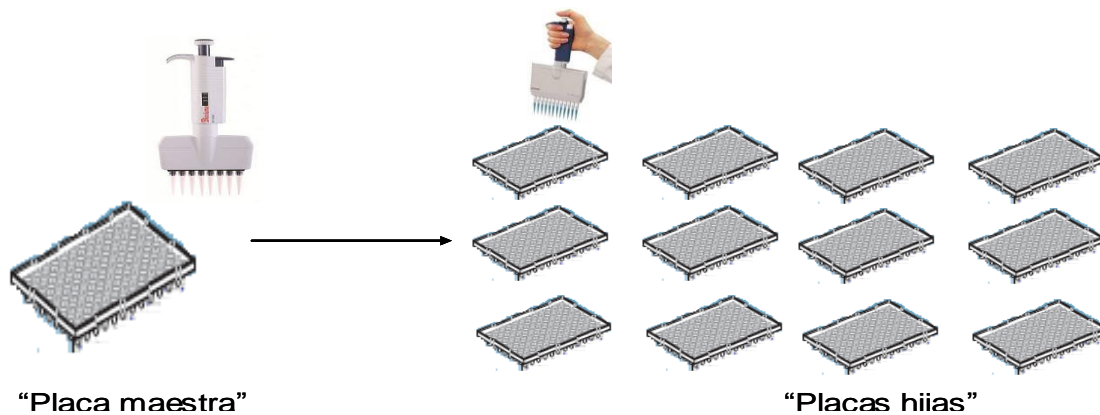


Figura 14. Preparación de placas para el análisis de los SNP. Se prepara una placa madre con 100 μ l, cada μ l lleva 5 ng, posteriormente se colocan 2 μ l a cada placa para el análisis de cada uno de los SNP analizados en este estudio.

Una vez vertida la solución en cada pozo de la placa, el DNA se deshidrata durante 3 horas a temperatura ambiente y se procedió a guardar las placas de 96 pozos hasta que cada SNP de los genes de interés del sistema inmune fueran analizados.

7.3. Discriminación alélica, mediante la técnica de 5' exonucleasa (TaqMan)

Esta metodología se emplea para analizar SNP bialélicos haciendo uso de la actividad 5' exonucleasa de la DNA polimerasa ampliTaq Gold de Applied Biosystems. Esta herramienta emplea un par de sondas para el análisis de cada alelo de los SNP. El par de sondas son específicas para cada alelo, y tienen en los extremos 5' un fluoróforo que emite a diferente longitud de onda, comúnmente, FAM y VIC. FAM se excita a 492 nm y emite a 515 nm, mientras VIC se excita a 528 nm y emite fluorescencia a una longitud de onda de 546 nm. Las sondas también tienen en su extremo 3' un apagador de la fluorescencia (Quencher) que evita la emisión de la fluorescencia cuando no hibridan con su secuencia complementaria. Así, la sonda 100% complementaria con su secuencia blanco se une de manera específica a ella. Al inicio de la reacción de amplificación, se une primero el par de sondas a cada alelo debido a su mayor T_m que el par de oligos específicos para la secuencia blanco. Una vez unida la (s) sonda (s) y los oligos, la ampliTaq Gold con su actividad DNA polimerasa comienza a polimerizar, pero cuando la enzima encuentra la sonda unida al alelo específico entonces comienza

a degradarse por la actividad 5' exonucleasa, liberando así la fluorescencia de VIC o FAM según sea el caso. La figura 15 muestra un ejemplo de la distribución de los genotipos T/T, T/C y CC del SNP FCRL3_6 G/A del gen *FCRL3* en un plot de discriminación alélica.

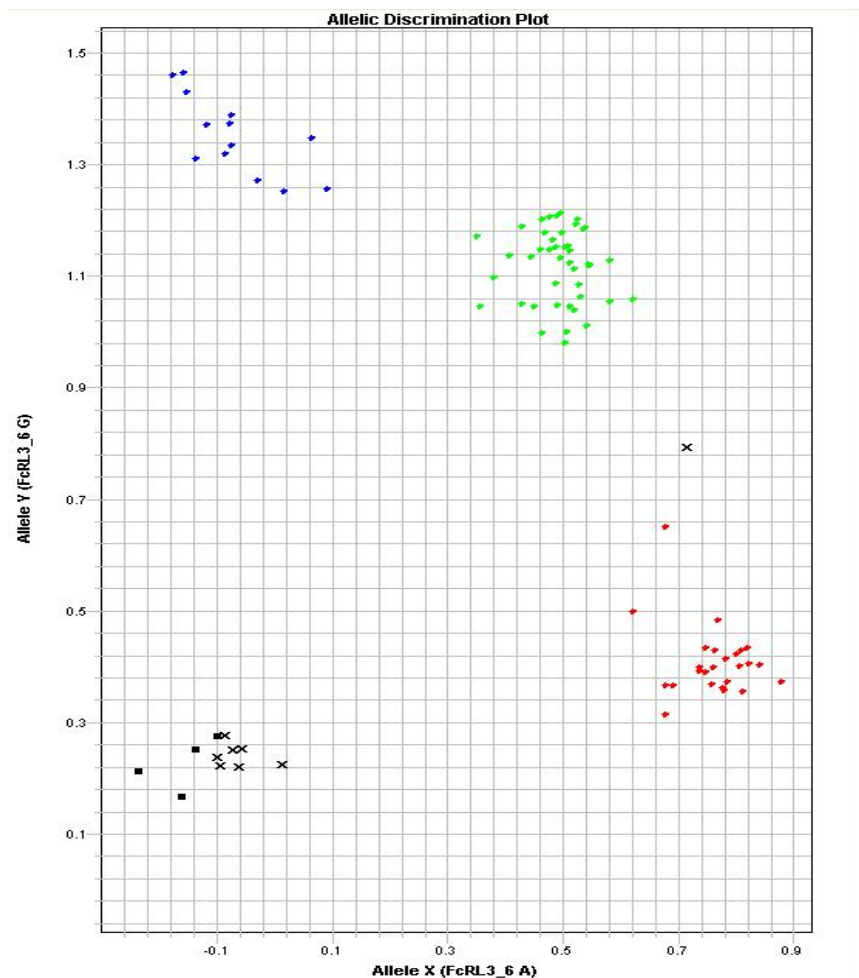


Figura 15. Plot de discriminación alélica. Ejemplo de plot de genotipos obtenidos del análisis de fluorescencia emitida por los alelos G y A del *SNP FCRL3_6*. En el eje de las X se muestran a los individuos con genotipo A/A, en el de la Y los genotipos G/G, mientras en el eje de la z se muestran los heterocigotos G/A.

Brevemente se resume el proceso metodológico de esta técnica. Se hizo una mezcla de reacción para cada muestra que contenía lo siguiente: 2.5 µl de agua libre de DNAsa, 0.065 µl del par de sondas para cada SNP a analizar (juntos con el par de primer, y 2.435 µl de mezcla de reacción (DNA polimerasa ampliTaQ Gold, Mg₂Cl, dNTPs, buffer). Posteriormente, se colocaron 5 µl de mezcla de

reacción en cada pozo de cada placa donde estuvo el DNA deshidratado de los casos y los controles (10 ng DNA en cada pozo). Inmediatamente después de esto se colocaron la (s) placa (s) en los termocicladores de punto final, bajo programas de pre-PCR y PCR que se describen abajo.

Pre-PCR (1 ciclo)

- a) 2 min a 50°C (temperatura a la cual se quita el anticuerpo unido a la enzima)
- b) 10 min a 95°C (Para lograr la activación del 20% de la enzima)

Nota: El Pre-PCR fue igual para todas las reacciones.

PCR (40 ciclos)

- a) 15 segundos a 95°C
- b) 1 min a 60°C

Post-PCR

- c) Infinito a 4°C

Después de finalizar los ciclos de PCR se procedió a leer la fluorescencia emitida de cada sonda que analizó cada alelo de los SNP. Así, la fluorescencia fue leída mediante el software SDS (sistema de detección de secuencia) 2.2.3., instalado en el equipo de PCR de tiempo real 7900HT Fast Real de Applied Biosystems.

7.4. Validación del SNP funcional -169T/C de *FCRL3*.

La genotipificación de los SNP de *FCRL3* mediante las sondas TaqMan fueron validados a través de secuenciación automática. Para lograr esto inicialmente se estandarizaron las condiciones de PCR con un par de oligos específicos para la región de *FCRL3* (Ver anexo: oligos *FCRL3*), que incluye el SNP -169T/C. Posteriormente se observó el producto de PCR en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Inmediatamente después se purificaron los productos de PCR (amplicón de 401 pb de *FCRL3*) y se analizaron mediante secuenciación automatizada por la técnica de Maxam-Gilbert^{104,105}. Los procedimientos se muestran a continuación. Se emplearon 60 ng/μl de DNA genómico de cada caso y control en una mezcla de reacción que contenía lo siguiente:

Mezcla de reacción 10X

Componente	Volumen 1X	Volumen 10X
a) Mg2Cl	2.5 µl (2.5mM)	25 µl
b) Buffer	2.5 µl (a 1X)	25 µl
c) dNTPs	0.4 µl (250mM)	4 µl
d) Primer forward*	0.2 µl (2.5mM)	2 µl
e) Primer reverse*	0.2 µl (2.5mM)	2 µl
f) DMSO	1.0 µl	25 µl
g) Agua	15.09 µl	150.9 µl
h) AmpliTaq Gold	0.11 µl (1.25 U)	1.1 µl
i) DNA**	3.0 µl (60 ng)	30 µl
	<hr/>	
	25 µl	250 µl

* Ver anexo

** 60 ng de DNA colocados en los 3 µl

Posteriormente se procedió a realizar la pre-PCR y la PCR para la obtención de millones de copias de la región donde se encontraba el SNP -169T/C de *FCRL3* bajo las siguientes condiciones:

Pre-PCR (1 ciclo)

a) 2 min a 50°C

b) 10 min a 95°C

PCR (35 ciclos)

a) 35 segundos a 94°C (desnaturalización del DNA)

b) 30 segundos a 58°C (alineación de primers al DNA)

c) 35 segundos a 72°C (extensión)

Post-PCR (1 ciclo)

a) 5 min a 72°C (Extensión final del templado)

b) Infinito a 4°C.

7.5. Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR (pPCR) se purificaron utilizando el Kit Qiagen (QIAquick Spin Handbook). Brevemente, se agregaron 5 volúmenes (200 µl) de buffer PB a un volumen (40 µl) de pPCR. Las muestras se transfirieron a una columna de purificación QIAquick (colocada en un tubo eppendorf de 2 ml) y se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó el tubo por 1 min a 13000 r.p.m., se decantó el sobrenadante, se volvió a colocar la columna al tubo eppendorf y se agregaron 750 µl de buffer PE. Posteriormente se procedió a centrifugar el tubo por 1 min a 13000 r.p.m. (este procedimiento se repitió dos veces). Después de esto se colocó la columna a un tubo nuevo de 2 ml y se le agregaron a la columna 30 µl de buffer TE1X (Ver anexo; reactivos), se dejó incubar por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó la columna a 13000 r.p.m., durante 1 min. Finalmente se cuantificó el DNA con el equipo NanoDrop 1000-ND, se hicieron las diluciones a 10 ng/ µl, cantidad requerida para la secuenciación del amplicón (Este procedimiento también se realizó para secuenciar un fragmento de aprox., 1,500 pb río arriba del sitio de transcripción de *TNFR1* bajo condiciones similares). La secuenciación del ADN se realizó a través de la secuenciación capilar en la unidad de secuenciación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

7.6. Análisis *in silico* de los alelos analizados en este estudio

Una gran parte de los SNP se encuentran en la región promotora de los genes. Se han identificado cerca de 500,000 mil SNP en los promotores de varios genes de la posición -1 a -5000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Se han calculado que 47, 832 SNP pueden afectar la unión a factores de transcripción y alterar los niveles de expresión génica¹⁰⁶. Existen diversos programas bioinformáticos para predecir el efecto de los alelos de los SNP ubicados en regiones promotoras de cientos de genes y como estos pueden afectar los niveles de expresión génica, entre ellos se encuentran los siguientes: FastSNP, SNP@Promoter, SNPlogic¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

7.7. Identificación de nuevos SNP en la región promotora de *TNFR1*

Aunque los análisis *in silico* sugieren que el SNP -329G/T asociado a ARJ afecta la expresión génica¹⁰⁷⁻¹⁰⁹, se desconoce si existen otros polimorfismos cercanos

con potenciales implicaciones en la expresión génica, por lo que se procedió a analizar un fragmento de aproximadamente 1000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *TNFR1* para identificar nuevos SNP y evaluar su frecuencia y su asociación de forma individual o como haplotipos con la ARJ y para evaluar el impacto en la expresión de este gen. Desde el inicio del proyecto hubo un interés especial en genes involucrados con la síntesis de proteínas que señalizan a través de la vía de TNF- α , así como de otros genes involucrados en inflamación, anti-inflamatorios, relacionados con quimiotracción, con destrucción del cartílago y erosión del hueso. Del interés de la vía de TNF- α , se procedió a secuenciar este fragmento de la región promotora de *TNFR1* en 100 individuos sanos, para esto se sintetizaron 4 pares de oligos (Ver anexo; oligos), y se estandarizaron las condiciones de PCR para cada par de primer (las condiciones de pre-PCR y PCR, así como del equipo de punto final fueron similares a las de *FCRL3*) (Ver anexo; condiciones de PCR). Posteriormente se observaron los productos de PCR en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, inmediatamente después se purificaron los productos de PCR de cada uno de los amplicones de *TNFR1* y se enviaron a secuenciación¹⁰³⁻¹⁰⁴.

7.8. Análisis del polimorfismo inserción/delección (ins/del) -94ATTG/- de *NFKB1*

Para el análisis de la ins/del de cuatro pares de bases (-94ATTG/-) de *NFKB1* se procedió a realizar la estandarización de la PCR (las condiciones se observan en el anexo 3): condiciones de PCR. La visualización del producto de PCR y el producto de restricción enzimática se visualizaron a través de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Las condiciones de Pre-PCR y PCR básicamente fueron similares a las de *FCRL3* (anexo de condiciones de PCR). Una vez obtenido el producto de PCR de 311 pb (donde se encontró la ins/del -94ATTG de *NFKB1*), se procedió a realizar la restricción enzimática. La diferencia entre los alelos de la inserción o delección fue de apenas 4 pb, debido a esto no se alcanzó a observar en el gel de agarosa, posteriormente se procedió a realizar la restricción enzimática con la enzima *Van91I*, la cual reconoce la siguiente secuencia de DNA palindrómica:

Ins/del AT T G A T T G
5'...C C A N N N N ↓ N T G G...3'
3'...G G T N ↑ N N N N A C C...5'

Las condiciones de restricción fueron las siguientes: 7.5 µl de agua libre de DNAsa, 2.0 µl de buffer R, 0.5 µl de enzima Van19I y 10 µl de producto de PCR. Una vez homogenizado tanto el producto de PCR como la mezcla de restricción enzimática se prosiguió con una incubación de la restricción enzimática del producto de PCR durante 16 hrs., a 37 °C.

7.9. Evaluación del efecto funcional de polimorfismos en la expresión de su transcrito.

7.9.1. Extracción del RNA de los leucocitos de sangre periférica

Para evaluar el efecto de los alelos G o T del SNP -329G/T de *TNFR1* (asociado con ARJ) en la expresión génica *in vivo* se realizó lo siguiente: se tomó una muestra de 75 individuos sanos sin antecedentes de enfermedades inflamatorias o autoinmunes. La primera muestra de sangre periférica (a partir de la capa de leucocitos) sirvió para extraer el DNA genómico y para genotipificar los SNP -995G/C, -980G/T, -329G/T, -300A/G, -102A/C de *TNFR1* mediante la tecnología de TaqMan. Una vez conocidos sus genotipos, se procedió a tomar una segunda muestra de 5 ml de sangre periférica con el objetivo de analizar el efecto de los genotipos (SNP -329G/T de *TNFR1* asociado a ARJ: específicamente se obtuvieron 19 individuos con los genotipos n=8 G/G, n=9 G/T, y n=4 T/T) en la expresión génica en individuos sanos (esto individuos no tuvieron antecedentes de enfermedades inflamatorias o autoinmunes, tampoco presentaron infecciones virales o bacterianas o estuvieron bajo tratamiento médico; especialmente estar tomando anti-inflamatorios. Estos 19 individuos fueron homocigotos para los alelos de comunes (995G/C, -980G/T, -300A/G, -102A/C), es decir, sólo se evaluó el impacto del SNP -329G/T en la expresión de *TNFR1* sin la combinación de otros alelos que pudieran afectar la expresión génica. Inmediatamente después se realizó la extracción del RNA total a partir de los leucocitos, siguiendo las

especificaciones indicadas por el proveedor.

La expresión constitutiva del gen *TNFR1* se evaluó en los leucocitos de sangre periférica mediante PCR de punto final. Posteriormente se analizó el efecto de ambos alelos del SNP -329G/T en la expresión génica mediante PCR de tiempo real, la extracción de RNA total se realizó con Trizol-LS (Invitrogen). El procedimiento fue el siguiente: En hielo, se colocaron 750 µl de Trizol LS a 250 µl de la capa de leucocitos (aproximadamente 10,000 leucocitos) en un tubo de centrifuga de 2 ml., y se homogenizó la muestra levemente con una pipeta durante 1 min. Posteriormente, se colocó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 5 min (esto permitió la disociación de las nucleoproteínas). Inmediatamente después, se agregaron 200 µl de cloroformo, y se agitó levemente en un vortex por 1 min. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 r.p.m., durante 15 min a 4°C. Durante este proceso, la mezcla se separó en tres fases, el RNA se encuentra en la parte superior (acuosa), esta fase fue extraída y colocada en un tubo eppendorf nuevo de 2 ml e inmediatamente después se agregaron 500 µl de isopropanol al 100% para precipitar el RNA se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 10 min y posteriormente se centrifugó a 12,000 r.p.m., durante 10 min a 4°C (el RNA total frecuentemente se ve visible en esta fase). Se decantó el sobrenadante del tubo y se procedió a lavar la pastilla de RNA para eliminar impurezas y restos de solventes. El lavado del RNA se hizo con 1 ml de etanol al 75%, después se centrifugó a 7,500 r.p.m, durante 5 min a 4°C y se decantó el sobrenadante. Finalmente se dejó secar el RNA a temperatura ambiente durante 20 min. El RNA se resuspendió en agua libre de RNAsas y se cuantificó en el equipo NanoDrop 1000 ND. El RNA se almacenó a -70°C hasta su uso.

7.9.2. Síntesis de la primera cadena del DNA complementario (cDNA)

Basándonos en el principio de que la mayoría de los RNAm comúnmente tienen colas de poliA de aproximadamente 200-300 nucleótidos, se procedió a generar cDNAs a partir de los genes que tienen cola de poliA, donde se incluye al RNAm del gen *TNFR1* utilizando oligonucleótidos dT^{110,111}.

El procedimiento para la síntesis de cDNA fue el siguiente; se tomó 1 µg de RNA total y se colocó en las siguientes volúmenes para obtener 8.7 µl de mezcla de reacción.

Componente	Volumen	
a) RNA 1 µg	5 µl*	
b) Oligo dT	0.5 µl	
c) Agua libre de RNasas	3.2 µl	* (200 ng/µl), pero el volumen varía, dependiendo de la concentración a la obtengamos el RNA.

	8.7 µl	

Posteriormente, la mezcla de los diferentes tubos se homogenizaron y se centrifugaron brevemente para posteriormente incubarlas a 70°C por 5 min, después se colocaron en hielo y nuevamente se centrifugaron brevemente en hielo. Posteriormente se le agregaron a la muestra la siguiente mezcla de reacción:

Componente	Volumen
a) Buffer de la enzima	2 µl
b) MgCl ₂	4.4 µl
c) dNTPs	4 µl
d) Inhibidor de RNasas	0.4 µl

Esta mezcla fue homogenizada, se les dio un spin, y se dejaron incubar a 25°C durante 10 min. Finalmente se le agregaron 0.5 µl de enzima MultiScript (Applied Biosystems) y se dejó incubar a 37°C durante 60 min. Después de esto se procedió a cuantificar el cDNA, se realizaron diluciones a 200ng/µl y fueron guardadas hasta su análisis a -20°C.

7.10. Análisis de la expresión génica de *TNFR1* mediante PCR de punto final y de tiempo real.

El gen *TNFR1* se expresa en todas las células nucleadas, de esta manera se decidió iniciar el análisis de expresión génica en leucocitos de sangre periférica sin tomar en cuenta la presencia de algún alelo (-329G o T), también se procedió a analizar la expresión génica del gen constitutivo *GAPDH*, el cuál sirvió también como gen endógeno y para normalizar los niveles de expresión génica (Esto sirvió en primer término para estandarizar las condiciones de RT-PCR). Posteriormente, se procedió a realizar el análisis de *TNFR1* y *GAPDH* (como control de carga) tomando en cuenta genotipos y alelos de controles en el gen *TNFR1* (el cuál mostró asociación con la ARJ en casos y controles). Las condiciones de la mezcla de reacción se describen abajo:

7.10.1. Análisis de expresión génica mediante PCR de punto final

Componente	Volumen	
a) Buffer	2.5 µl (a 1X)	
b) MgCl ₂	2.5 µl (2.5mM)	
c) dNTPs	0.8 µl (250mM)	
d) Primer TNFR1 F ♠	0.4 µl (2.5mM)	
e) Primer TNFR1 R ♠	0.4 µl (2.5mM)	
f) Primer GAPDH F	0.4 µl (2.5mM)	
g) Primer GAPDH R	0.4 µl (2.5mM)	
h) AmpliTaq Gold	0.11 µl (0.5 U)	
i) Agua libre de nucleasas	16.49 µl	
j) cDNA	1 µl (200 ng/µl)	♠ Ver apéndice

25 µl volumen final		

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes:

Pre-PCR (1 ciclo)

- a) 2 min a 50°C
- b) 8 min a 95°C

PCR (33 ciclos)

- a) 30 segundos a 94°C (desnaturalización del DNA)
- b) 30 segundos a 59°C (alineación entre los oligos y DNA)
- c) 35 segundos a 72°C (extensión del templado)

Post-PCR (1 ciclo)

- a) 5 min a 72°C (Extensión final del templado)
- b) Infinito a 4°C.

Inmediatamente después de terminar los ciclos de PCR, se procedió a colocar las muestras en los pozos de un gel de agarosa al 1% teñido de bromuro de etidio. Las bandas de DNA fueron visualizadas en un transiluminador.

7.10.2. Análisis de expresión génica mediante PCR de tiempo real

Los cálculos de la cuantificación relativa de la expresión génica están basados en la comparación de los valores Ct utilizando la eficiencia de reacción de la PCR como factor de corrección. Sin embargo, hay un modelo que no requiere la eficiencia de la reacción para realizar el factor de corrección. Este modelo supone una eficiencia óptima e idéntica (correspondiente al 100%) en la eficiencia de reacción en las PCR en tiempo real tanto del gen de estudio (*TNFR1*) como del gen de referencia (*GADPH*). Este modelo es el $2\Delta Ct$, el cuál se aplica para obtener una estimación rápida de la proporción relativa de la expresión génica en estudio. El método de $2\Delta Ct$ expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct de la muestra de interés y los valores Ct del control (genotipo ancestral). Por otro lado, para obtener el umbral de la curva estándar, el cDNA obtenido de los leucocitos de sangre periférica fue diluido. Dichas diluciones fueron seriales (1:2, 1:4, 1:8) comenzando con 1 µg de cDNA hasta alcanzar la condición óptima, que fue de 200 ng/µl de solución. Las eficiencias de la PCR en tiempo real se calculan a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas con las reacciones de la PCR en tiempo

real. El coeficiente de correlación para ser considerado de calidad, debe poseer un valor cercano a 0.9999, sin embargo se tomó un punto de corte mínimo de 0,94.

Por cada muestra se colocaron los siguientes reactivos para realizar el PCR en tiempo real tanto para *TNFR1* como para *GAPDH*:

Componente	Volumen
a) Sonda de expresión de <i>TNFR1</i> 20X	1 μ l
b) cDNA + agua libre de nucleasa	4.5 μ l
c) Master mix TaqMan universal 2X	5 μ l

	10 μ l

Componente	Volumen
a) Sonda de expresión de <i>GAPDH</i> 20X	1 μ l
b) cDNA + agua libre de nucleasa	4.5 μ l
c) Master mix TaqMan universal 2X	5 μ l

	10 μ l

Las dos mezclas se homogenizaron y se realizó un triplicado técnico para cada individuo a analizar. Las condiciones de PCR en tiempo real se colocan abajo:

Pre-PCR (1 ciclo)

- a) 2 min a 50°C
- b) 10 min a 95°C

PCR (40 ciclos)

- a) 15 segundos a 95°C
- b) 1 min a 60°C
- c) Infinito a 4°C

Finalmente, se procedió a analizar los datos de expresión génica.

La expresión de los genes *GAPDH* y *TNFR1* se analizó mediante sondas TaqMan y PCR en tiempo real. Antes de realizar esto se hizo la curva estándar para determinar la cantidad absoluta de un gen diana en una muestra. Para conseguir los resultados, se utiliza una curva estándar construida a partir de una dilución seriada de una cantidad conocida.

7.11. Análisis de datos

7.11.1. Estimación del tamaño de muestra y poder estadístico

Antes de iniciar los estudios genéticos se calculó el tamaño de muestra para obtener un poder estadístico >80%. El programa empleado 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, entre otros. 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.

7.11.2. Evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg

El equilibrio de Hardy-Weinberg (E-HW) fue analizado mediante tablas de 3X2 a través del programa Finetti (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Los valores de p menores a 0.05 en los genotipos de los controles se consideraron estar en desequilibrio de Hardy-Weinberg y fueron eliminados del estudio.

7.11.3. Análisis de asociación entre casos y controles

El riesgo (OR), intervalo de confianza (IC 95%) y valor de p fueron generados a través de la comparación de las frecuencias de los genotipos y de los alelos tanto de los casos como controles por tablas de contingencia de 3X2 y 2X2, respectivamente y usando la prueba de X^2 , respectivamente, implementada en el programa Epidat para datos tabulados (<http://dxsp.sergas.es>). El análisis de haplotipos y desequilibrio de ligamiento (LD) se analizaron mediante el programa Haploview.¹¹²

7.11.4. Evaluación de la expresión génica

Los datos de significancia estadística del análisis de la expresión génica fueron obtenidos a través del programa GraphPad 5 PRISM.

8. Resultados.

8.1 Número y porcentaje de casos y controles

Este estudio incluyó 215 pacientes con diagnóstico clínico de ARJ, de los cuales 126 fueron mujeres y 87 fueron varones, además se incluyeron 430 controles, 252 mujeres y 178 varones. La relación casos-controles mujeres-varones fue de 1:2 (Figura 16).

8.2 Genes y SNP incluidos en este estudio

Este estudio incluyó un total de 41 SNP distribuidos en 14 genes (Ver tabla 8). La información de los genes, SNP, alelos y otras propiedades como el número de identificación y su posición dentro del gen, así como sus posibles implicaciones funcionales *in silico* de cada uno de ellos se presentan en la tabla 8.

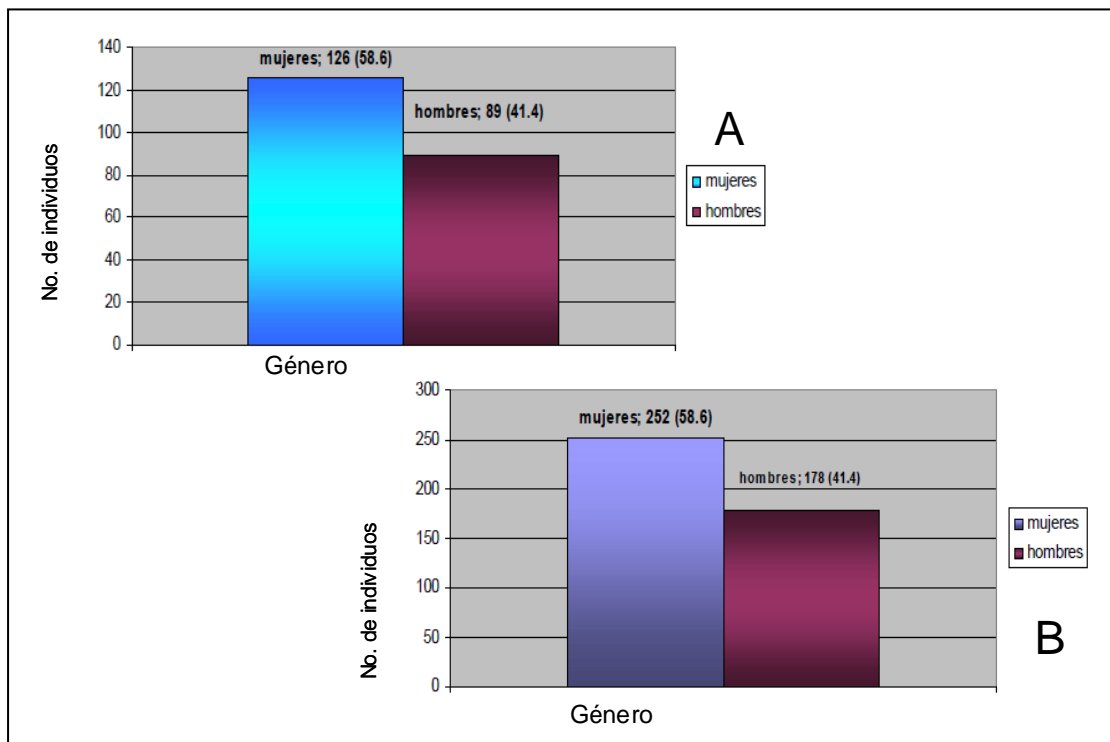


Figura 16. Distribución de casos (A) y controles (B) por género.

8.1.3 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Excepto el SNP (rs1524668) localizado en la posición -1455 del gen *TACE*, el resto de los genotipos de los SNP analizados en los genes candidato estuvieron en E-HW.

Tabla 8. Genes, SNP y posible función biológica de los alelos analizados en este estudio.

Gen	Posición del SNP en el gen	rs (ID del SNP)	Región en el gen	Posición cromosómica	Posible función**
<i>TYK2</i>	-1218A/G	rs280500	Promotor	Crom 9:10490402	El alelo A crea un sitio de unión al FT*** YY1
<i>IL2</i>	-100A/C	rs2069762	Promotor	Crom 4:123377980	El alelo A crea un sitio de unión al FT CdxA
<i>IL8</i>	-199T/A	rs4073	Promotor	Crom 4:4606024	El alelo A crea un sitio de unión al FT HNF-3b
<i>IL17</i>	-692T/C	rs8193036	Promotor	Crom 6:52050493	Mayor afinidad de unión del factor de transcripción GATA1 en el alelo C
<i>IL23R</i>	-907C/T	rs6682925	Promotor	Crom 1:67631262 67631431	El alelo T crea un sitio de unión al FT CdxA
	-738G/A	rs11465754			El alelo A crea un sitio de unión al FT Oct-1
	-463T/C	rs6683455			El alelo C crea un sitio de unión al FT CRE-BP
<i>CD40</i>	-552G/A	rs1800686	Promotor	Crom 20:44746403	Sin efecto conocido
<i>CD80</i>	-91G/C	rs16829984	Promotor	Crom 3:119278540	Sin efecto conocido
<i>GMCSF</i>	-641A/C	rs1469149	Promotor	Crom 5:131408842	El alelo C crea un sitio de unión al FT Sp1
<i>MCP1</i>	-2518A/G	rs1024611	Promotor	Crom 17:32579788	El alelo G destruye el sitio de unión para el FT GATA1
<i>FCRL3</i>	-169T/C	rs7528684	Promotor	Crom 1:157670816 157670757 157670290 157669278	El alelo C crea un sitio de unión al FT NF-kappa beta
	-110G/A	rs11264799			
	+358G/C	rs945635	5'UTR		Sin efecto conocido
	+1381G/A	rs3761959	IVS3		Sin efecto conocido

			Promotor		
<i>TNFR1</i>	-995G/C	rs41309818		Crom 12:	
	-980G/T	rs4149619		6452256	Sin efecto conocido
	-329G/T	rs4149570		6452256	Sin efecto conocido
		rs4149621		6451590	El alelo T crea un sitio de unión al FT IRF8
	-300A/G	rs55965699		6451561	El alelo A genera una mayor afinidad al FT cdxA
	-102A/C			6451371	
<i>TNFR2</i>	Lys56LysA/G	rs1061622	Exón 6	Crom 1:12252955	Sin efecto conocido
	40205G/A*	rs1061624		12267265	Sin efecto conocido
	40232T/C*	rs3397	3'UTR	12267292	Sin efecto conocido
	40939C/T*	rs1061628		12267999	Sin efecto conocido
<i>TACE</i>	-1455A/C	rs1524668		Crom 2:9614823	El alelo A afecta la expresión génica
	-647T/G	rs2177639	Promotor	9614015	Sin efecto conocido
	65686C/T	rs6705408	3'UTR	9630231	Sin efecto conocido
	65901A/G	rs1130094		9630016	Sin efecto conocido
<i>NFKB1</i>	-94ins/del ATTG	rs28720239	Promotor	Crom 4: 103 641 191	La delección resulta en la pérdida de unión a proteínas nucleares
	NFKB1_1(3853)C/ T	rs3774933	IVS1		Enhancer intrónico
	NFKB1_2(11767)C/T	rs3774937	IVS1	103 426 339	Enhancer intrónico
	NFKB1_3(15953)G/A	rs3774938	IVS1	103 653 283	Enhancer intrónico
	NFKB1_4(22047)C/T	rs1585214	IVS1	103 657 469	Enhancer intrónico
	NFKB1_5(21988)T/C	rs1584215	IVS1	103 663 563	Enhancer intrónico
	NFKB1_6C/TA1a380Ala	rs1609993	Exón 12	103 663 728	Sin función conocida
	NFKB1_7(92255)C/T	rs4648050	IVS12	103 733 696	Sin función conocida
	NFKB1_8Val506Met	rs4648072	Exón 17	103 733 779	Sin función conocida
	NFKB1_9(105390)T/C	rs4648095	IVS17	103 377 738	Sin función conocida
	NFKB1_10(112074)G/C	rs3817685	IVS22	103 746 914	Sin función conocida
	NFKB1_11(118294)T/C	rs7674640	3'UTR	103 753 606	Sin función conocida
	NFKB1_12G/C	rs17032996	Rio abajo del 3'UTR	103 759 828	Sin función conocida
				103 764 269	

* A partir del sitio de inicio de la transcripción

** Posible función *in silico* predicha por el software FastSNP¹⁰⁷.

*** Factor de transcripción

8.1.4 Genes no asociados a ARJ

La distribución de alelos y genotipos en casos y controles no mostró diferencias estadísticamente significativas para los SNP localizados en los genes *IL2* (-100A/C), *IL18* (-199T/A), *IL17* (-692T/C), *CD40* (-552G/A), *CD80* (-91G/C), *GMCSF* (-641A/C), *MCP1* (-2518A/G), *TACE* (-1455A/C, -647T/G, 65686C/T, 65901A/G), *TNFR1* (-995G/C, -980G/T, -329G/T, -300A/G, -103A/C), *TNFR2* (Lys56Lys, 40205G/A, 40232T/C, 40939C/T) (Tabla 9), aún después de la estratificación por género (datos no mostrado), excepto *TNFR1* (-329G/T) ($p=0.004$).

Tabla 9. Genes no asociados a ARJ.

Gen	Posición (SNP) en el gen	Región en el gen	MAF		OR	IC 95%	p
			Casos	Controles			
<i>IL2</i>	-100A/C	Promotor	31,1	29,1	1,1	(0.81-1.38)	0.70
<i>IL8</i>	-199T/A	Promotor	29,6	33,4	0,8	(0.65-1.09)	0.19
<i>IL17</i>	-692T/C	Promotor	21,8	16,6	1,2	(0.87-1.33)	0.22
<i>CD40</i>	-552G/A	Promotor	27,2	34,3	0.7	(0.47-1.03)	0.19
<i>CD80</i>	-91G/C	Promotor	5,6	6,8	0.8	(0.46-1.44)	0.48
<i>GM-CSF</i>	-641A/C	Promotor	15,2	15,4	1	(0.67-1.47)	0.97
<i>MCP1</i>	-2518A/G	Promotor	19,5	22,3	0.9	(0.71-1.22)	0.60
<i>TACE</i>	-1455A/C	Promotor	24,1	24,7	1	(0.74-1.27)	0.82
	-647T/G		7,6	9,0	0.84	(0.55-1.29)	0.42
	65686C/T	3'UTR	21,8	20,9	1.1	(0.79-1.39)	0.73
	65901A/G		20,0	19,4	1	(0.77-1.38)	0.83
<i>TNFR1</i>	-995G/C	Promotor	21,4	23	0.91	(0.69-1.20)	0.51
	-980G/T		6	6.7	0.89	(0.55-1.44)	0.63
	-329G/T		30.9	25.8	1.77	(1.20-2.63)	0.052
	-300A/G		5,8	7.6	0.76	(0.47-1.22)	0.25
	-103A/C		5.3	6.6	0.80	(0.48-1.31)	0.37
<i>TNFR2</i>	Lys56Lys	Exón 6	6,5	9,3	0.7	(0.43-1.06)	0.08
	40205G/A	3'UTR	42,0	43,2	0.95	(0.75-1.20)	0.70
	40232T/C		19,9	22,3	0.87	(0.65-1.15)	0.32
	40939C/T		14,6	14,5	1.00	(0.72-1.39)	0.98

*MAF: Frecuencia del alelo menor

8.1.5 Genes asociados a ARJ

De los genes estudiados, *TYK2*, *IL23R*, *FCRL3* y *FKB1* mostraron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles. Los alelos G y A de los SNP -1218A/G y -738G/A de los genes *TYK2* e *IL23R*, respectivamente, mostraron una mayor frecuencia en los casos en comparación con los controles (Tabla 10) mientras el alelo C del SNP -169T/C del gen *FCRL3* mostró una mayor frecuencia en controles respecto a los casos, así también varios polimorfismos de *NFKB1* mostraron una asociación con protección a ARJ (Tabla 10)

Tabla 10. Genes que mostraron asociación a ARJ

Gen	Posición (SNP)	Región	MAF		OR	IC 95%	p
			Casos	Controles			
<i>TYK2</i>	-1218A/G	Promotor	7,7	4,2	1,93	(1.80-3.15)	0.008
<i>IL23R</i>	-738G/A	Promotor	28.1	34.8	0.73	(0.56-0.95)	0.02
<i>FCRL3</i>	-169T/C	Promotor	42,6	49,4	0.76	(0.60-0.97)	0.03
	+1381G/A	IVS3	40,6	48,4	0.73	(0.57-0.93)	0.01
<i>NFKB1</i>	-94ATTG/-	Promotor	30.0	36.7	0.74	(0.58-0.95)	0.016
	NFKB1_1(3853)C/	IVS1	29.8	37.0	0.72	(0.56-0.93)	0.01
	NFKB1_2(11767)C/T		31.6	40.9	0.67	(0.52-0.85)	0.001
	NFKB1_3(15953)G/A		28.8	37.7	0.67	(0.52-0.86)	0.002
	NFKB1_4(22047)C/T		25.4	34.0	0.66	(0.51-0.86)	0.002
	NFKB1_5(21988)T/C		30.2	39.0	0.68	(0.53-0.87)	0.002
	NFKB1_7(92255)C/T	IVS7	33.0	39.7	0.75	(0.59-0.96)	0.02
	NFKB1_10(112074)G/C	IVS22	34.4	42.1	0.72	(0.57-0.92)	0.008
	NFKB1_11(118294)T/C	3'UTR	27.4	34.7	0.71	(0.55-0.92)	0.008

*MAF: Frecuencia del alelo menor

8.1.6 Genes asociados a ARJ dependiente de género.

El análisis de estratificación por género reveló varios SNP del gen *NFKB1* asociados con protección a desarrollar ARJ en mujeres. Los alelos de menor frecuencia de los SNP NFKB1_1C/T, NFKB1_2C/T, NFKB1_3G/A, NFKB1_4C/T, NFKB1_5T/C, NFKB1_6G/C y NFKB1_7T/C, respectivamente, del gen *NFKB1* se presentaron en mayor frecuencia en los controles comparados con los casos (Tabla 11). La tabla 12 muestra los genotipos de los SNP del gen *NFKB1* asociados con protección en mujeres con ARJ.

Tabla 11. Distribución de las MAF de los SNP *NFKB1*_1-5,10 y 11 del gen *NFKB1* en mujeres con ARJ.

Gen	Posición (SNP)	Región	MAF Casos	MAF Controles	OR	IC 95%	<i>p</i>
<i>NFKB1</i>	-94ATTG/-	Promotor	25.6	34.6	0.65	(0.46-0.91)	0.01
	NFKB1_1(3853)C/ T*	IVS1	26.4	34.8	0.67	(0.48-0.94)	0.018
	NFKB1_2(11767)C/T*		28.7	39.4	0.62	(0.45-0.86)	0.004
	NFKB1_3(15953)G/A*		26.4	36.0	0.64	(0.46-0.89)	0.008
	NFKB1_4(22047)C/T*		23.2	33.5	0.60	(0.43-0.85)	0.004
	NFKB1_5(21988)T/C*		26.4	37.6	0.60	(0.43-0.83)	0.002
	NFKB1_10(112074)G/C	IVS22	32.7	41.0	0.70	(0.51-0.96)	0.027
	NFKB1_11(118294)T/C	3'UTR	26.0	33.8	0.69	(0.49-0.96)	0.028

* MAF: Frecuencia del alelo menor

Tabla 12. Distribución de genotipos de los SNP *NFKB1_1-5* y *11* de *NFKB1* asociados en mujeres con ARJ

SNP ID	Población	Alelo	Genotipo			Genotipos		
			n (%)			OR	95% CI	<i>p</i>
			1 1	1 2	2 2			
<i>NF-kB1-94ATTG/-</i> (rs28720239)	Controles ARJ	Del/Ins	109 (42.9) 70 (55.1)	114 (44.9) 49 (38.6)	31 (12.2) 8 (6.3)	0.61	(0.40-0.94)	0.024
<i>NF-kB1_1</i> IVS1 (rs3774933)	Controles ARJ	C T	107 (42.1) 69 (54.3)	117 (46.1) 49 (38.6)	30 (11.8) 9 (7.1)	0.61	(0.40-1.94)	0.024
<i>NF-kB1_2</i> IVS1 (rs3774937)	Controles ARJ	C T	91 (35.8) 63 (49.6)	126 (49.6) 55 (43.3)	37 (14.6) 9 (7.1)	0.57	(0.37-0.87)	0.01
<i>NF-kB1_3</i> IVS1 (rs3774938)	Controles ARJ	G A	101 (39.8) 68 (53.5)	123 (48.4) 51 (40.2)	30 (11.8) 8 (6.3)	0.56	(0.37-0.88)	0.01
<i>NF-kB1_4</i> IVS1 (rs1585214)	Controles ARJ	C T	113 (44.5) 74 (58.3)	112 (44.1) 47 (37.0)	29 (11.9) 6 (4.7)	0.57	(0.37-0.88)	0.01
<i>NF-kB1_5</i> IVS1 (rs1585213)	Controles ARJ	T C	97 (38.2) 68 (53.5)	123 (48.4) 51 (40.2)	34 (13.4) 8 (6.3)	0.54	(0.35-0.83)	0.004
<i>NF-kB1_11</i> IVS1 (rs7476640)	Controles ARJ	T C	110 (44.0) 71 (56.0)	111 (44.4) 46 (36.2)	29 (11.6) 10 (7.8)	0.62	(0.40-0.95)	0.028

Por otro lado, las tablas 13 y 14 muestran la distribución y asociación alélica y genotípica de los SNP -1218G/A de *TYK2*, -169T/C, +358G/C, +1381G/A de *FCRL3*, el -329G/T de *TNFR1* asociados en varones. Los alelos A y T de los polimorfismos -1218G/A de *TYK2* y -309G/T de *TNFR1*, respectivamente, mostraron una mayor frecuencia en casos y controles. Mientras los MAF de los SNP -169T/C, +358G/C y +1381G/A de *FCRL3* mostraron una mayor frecuencia en controles comparado con los casos, estos resultados muestran una asociación de protección a ARJ.

Tabla 13. Distribución y asociación de las MAF del SNP -1218A/C del gen *TYK2*, de los SNP -169T/C, +358G/C, +1381G/A de *FCRL3* y -329T/G de *TNFR1* en varones con ARJ

Gen	Posición (SNP)	Región	MAF		OR	IC 95%	<i>p</i>
			Casos	Controles			
<i>TYK2</i>	-1218A/C	Promotor	7.6	4.6	3.7	(1.52-8.98)	0.002
<i>FCRL3</i>	-169T/C	Promotor	36.2	49.7	0.57	(0.40-0.88)	0.003
	+358G/C	5'UTR	34.5	48.7	0.55	(0.38-0.80)	0.002
	+1381G/A	IVS3	33.9	49.2	0.53	(0.36-0.76)	0.0007
<i>TNFR1</i>	-309T/G	Promotor	35.4	23.6	1.77	(1.20-2.63)	0.004

Tabla 14. Distribución y asociación de los genotipos de los SNP -1218A/C del gen *TYK2*, de los SNP -169T/C, +358G/C, +1381G/A de *FCRL3* y -309T/G de *TNFR1* en varones con ARJ

SNP ID	Población	Alelo 1 2	Genotipo			OR	Genotipos		<i>p</i>
			n (%)				95% CI	<i>p</i>	
			1 1	1 2	2 2				
TYK2-1218A/G (s280500)	Controles ARJ	A G	167 (95.4) 75 (85.2)	8 (4.6) 12 (13.6)	0 (0.0) 1 (1.2)	3.62	(1.44-9.10)	0.004	
FCRL3_3 (rs7528684)	Controles ARJ	T C	50 (25.0) 38 (43.7)	101 (50.5) 35 (40.2)	49 (24.5) 14 (16.1)	0.43	(0.25-0.73)	0.002	
FCRL3_4 (rs11264799)	Controles ARJ	G A	119 (59.5) 49 (56.3)	73 (36.5) 35 (40.2)	8 (4.0) 3 (3.5)	1.14	(0.69-1.90)	0.61	
FCRL3_5 (rs945635)	Controles ARJ	G C	53 (26.5) 39 (44.8)	99 (49.5) 36 (41.4)	48 (24.0) 12 (13.8)	0.44	(0.26-0.76)	0.002	
FCRL3_6 (rs3761959)	Controles ARJ	G A	50 (25.0) 39 (44.8)	103 (51.5) 37 (42.5)	47 (23.5) 11 (12.7)	0.41	(0.24-0.70)	0.0008	
TNFR1-329T/C (rs4149570)	Controles ARJ	T C	105 (59.0) 33 (37.0)	62 (34.8) 49 (55.1)	11 (6.2) 7 (7.9)	2.44	(1.45-4.12)	0.0007	

8.2 Datos de secuenciación de *TNFR1*

Después de encontrar una asociación entre el SNP -329G/T de *TNFR1* con ARJ y considerando la posibilidad de asociación de otros SNP no reportados cercanos al polimorfismo -329G/T, además de la posibilidad que tienen estos SNP en la expresión génica se decidió secuenciar un fragmento de aproximadamente 1000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción a través de 4 pares de oligos (Ver anexo; oligos). La figura 17 muestra un amplicón de 472 pb del promotor de *TNFR1* en 6 individuos, los cuatro amplicones obtenidos por medio de los 4 pares de oligos fueron secuenciados. La figura 18 muestra un electroferograma obtenido del amplicón 4 donde se encontraron los SNP -980C/A y -995G/C de *TNFR1*. El análisis de secuenciación de la región promotora permitió identificar 6 SNP con frecuencias alélicas del 7-42% (Figura 19). De ellos, los polimorfismos -980C/A y -995G/C no habían sido reportados en las bases de datos públicas. Mientras los polimorfismos -38G/A, -698G/A, las ins/del -852AG/- y -978 -/C no fueron informativos en nuestra población.

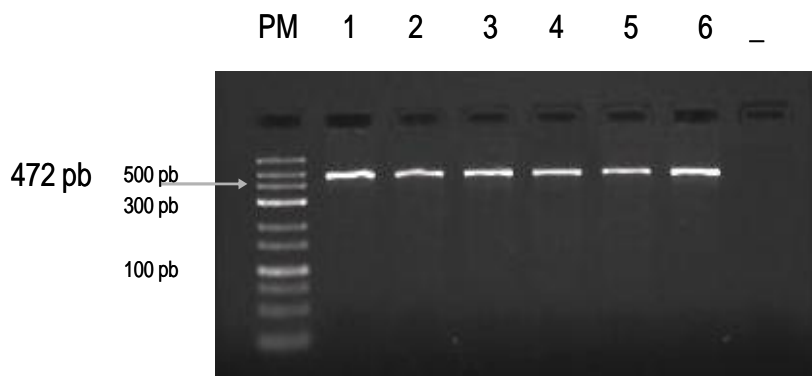


Figura 17. Evaluación de la expresión génica de *TNFR1*. Los amplicones obtenidos de seis muestras de individuos sanos de *TNFR1* de 472 pb (Ver anexo; oligos), estos amplicones fueron repurificados y secuenciados, el objetivo fue identificar SNP nuevos en este gen que mostró asociación con ARJ.

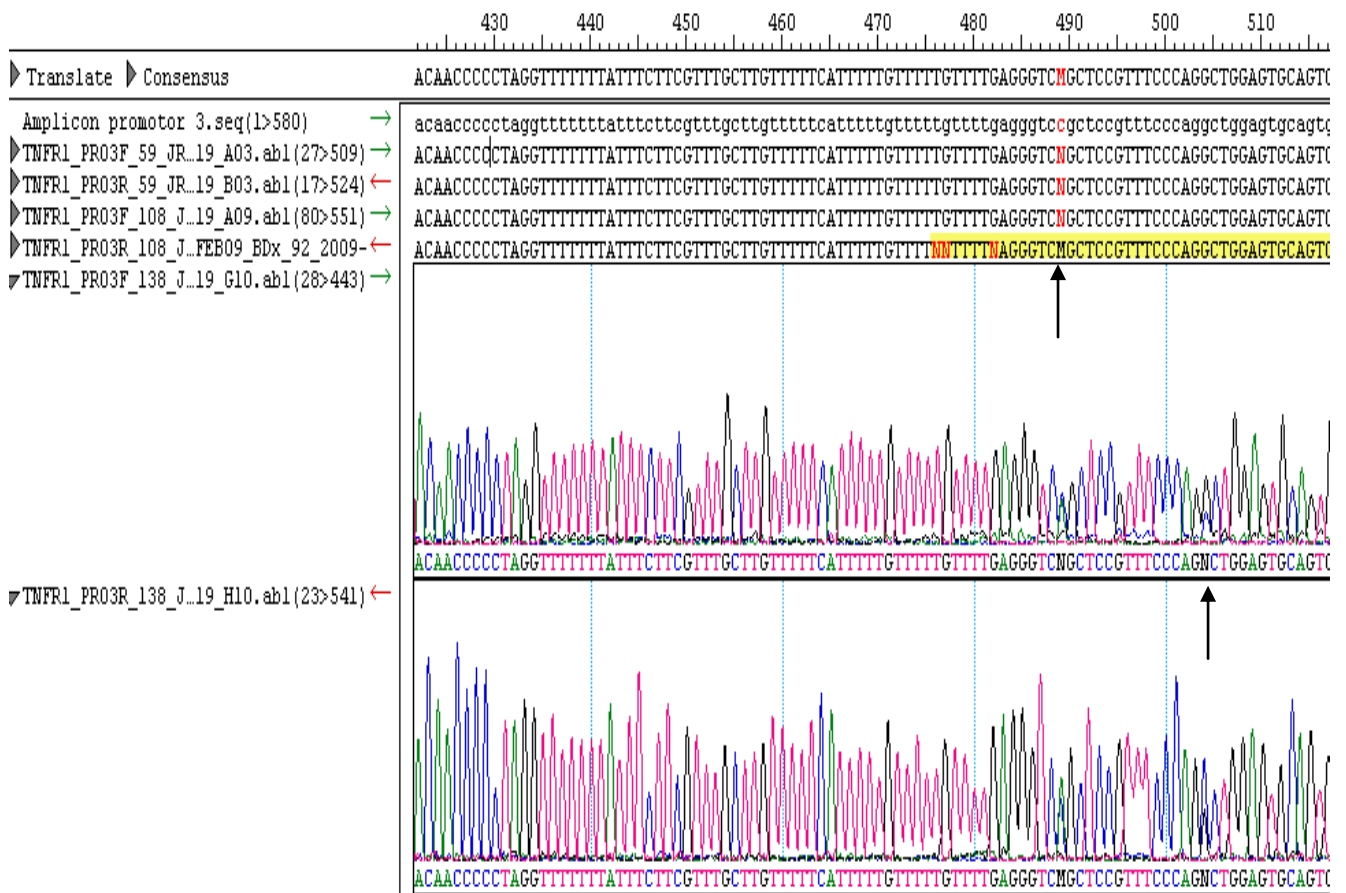


Figura 18. Secuencia de un individuo heterocigoto para los polimorfismos -980 y -995 en *TNFR1*. Esta imagen muestra una parte de la secuencia del promotor del gen *TNFR1* en tres individuos (parte superior). Las flechas indican dos polimorfismos cercanos (-980 y -995). El paciente 138 presenta heterocigocidad en ambos SNP.

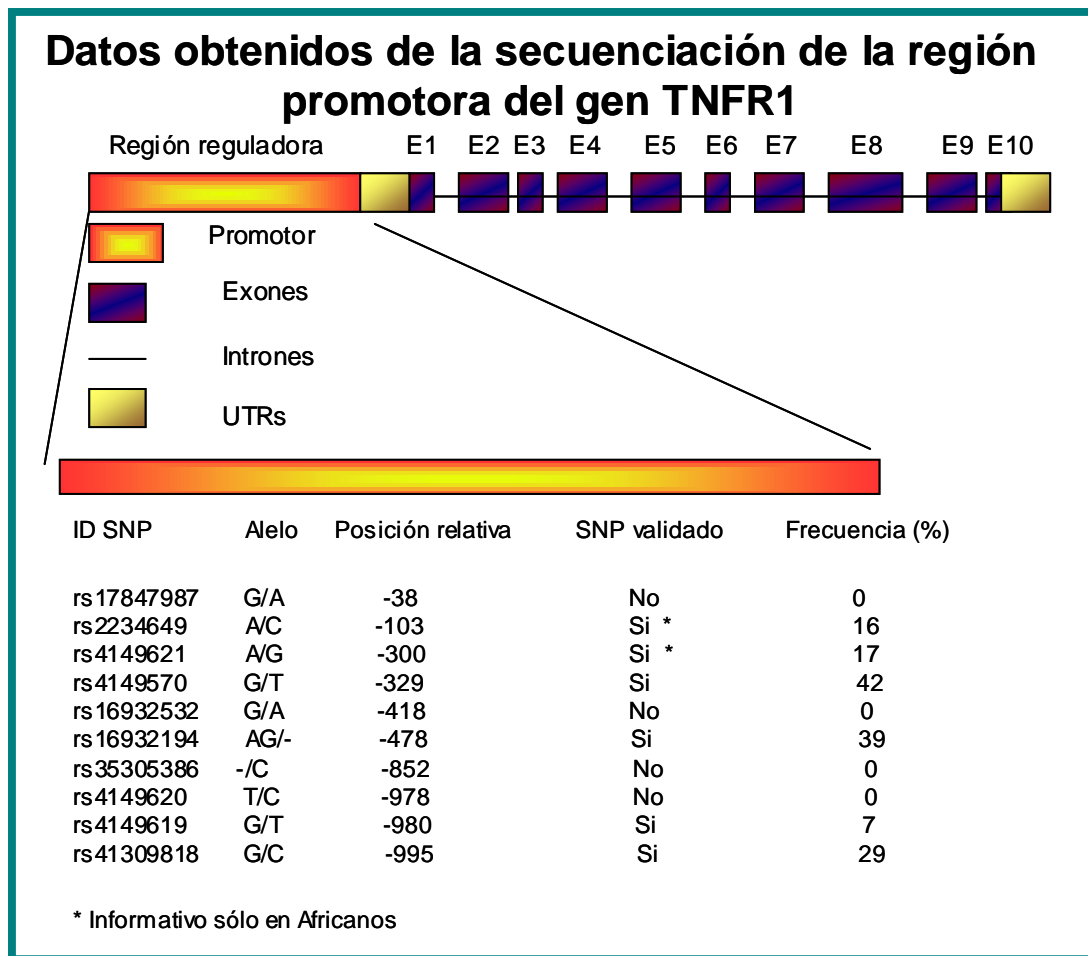


Figura 19. Resultados de la secuenciación de un fragmento de 1000 pb del promotor de *TNFR1*. En la imagen se muestra la frecuencia de los SNP encontrados en esta región en nuestra población de estudio.

8.2.1 Análisis de asociación de SNP en el promotor de *TNFR1*

El análisis de asociación de los 5 SNP encontrados al secuenciar un fragmento de 1000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *TNFR1* no mostró diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles, excepto el -329G/T, descrito en párrafos anteriores (Tabla 15).

Tabla 15. Análisis de asociación alélica de 5 SNP encontrados en la región promotora del gen *TNFR1*.

Gen	Posición (SNP)	Región	MAF		OR	95% IC	p
			Casos	Controles			
<i>TNFR1</i>	-995G/C	Promotor	21.4	23.0	0.91	(0.69-1.20)	0.51
	-980G/T		6.0	6.7	0.89	(0.55-1.44)	0.63
	-329G/T		30.9	25.8	1.29	(1.00-1.66)	0.052*
	-300A/G		5.8	7.6	0.76	(0.47-1.21)	0.25
	-103A/C		5.3	6.0	0.80	(0.48-1.31)	0.37

*Asociado en varones; OR 1.77, CI 95% 1.20-2.63, $p=0.004$

8.1.9 Análisis de haplotipos y LD en genes asociados a ARJ

Es común encontrar asociaciones genéticas entre una patología y la combinación de diversos marcadores genéticos (haplotipos) más que por la presencia de uno solo de ellos. Tomando como base esto, se procedió a realizar un análisis de haplotipos en los tres genes (*FCRL3*, *TNFR1* y *NFKB1*) asociados a ARJ género dependiente en nuestra población de estudio (Tabla 16). Para el gen *FCRL3* se incluyeron 4 SNP (*FCRL3_3*; -169T/C, *FCRL3_4* o -110G/A, *FCRL3_5* o +358G/C y *FCRL3_6* o +1381G/A). Los datos mostraron 4 haplotipos con una frecuencia mayor al 1%, de los cuales dos mostraron evidencia de asociación con ARJ, el haplotipo TGGG se asoció con riesgo (OR 1.78, 95% IC 1.21-2.60, y un valor de $p=0.005$). Por otro lado, el haplotipo CGCA, el cual llevaba el alelo de protección, mostró una disminución en el riesgo a desarrollar ARJ (OR 0.35, 95 IC 0.20-0.60, $p=0.00005$). Los SNP *FCRL3_3*, 5 y 6 del gen *FCRL3* mostraron un alto LD entre ellos (Figura 20). El análisis de haplotipos del gen *TNFR1* incluyó a 5 SNP (-995G/C, -980G/T, -329G/T, -300A/G y -103T/G). Los resultados mostraron 6 haplotipos de *TNFR1* con una frecuencia mayor al 1% presentes en controles. El haplotipo con el alelo de riesgo del polimorfismo -329G/T de *TNFR1* mostró asociación en varones con ARJ (OR 1.68, 95% IC 1.11-2.56, $p=0.011$). El análisis de LD de los 5 SNP analizados en *TNFR1* no refleja LD entre ellos (Figura 21). Finalmente, el análisis de haplotipos del gen *NFKB1* mostró 8 SNP presentes en mujeres con una frecuencia mayor al 1%, sólo el haplotipo que lleva la inserción del polimorfismo -94ATTG/- y los alelos T, T, A, T, C y C de los SNP *NFKB1_1-5*, y *NFKB1_11*, respectivamente, también mostraron asociación con protección a ARJ. Los alelos de los SNP -94ATTG/-, *NFKB1_1-5* mostraron alto LD entre ellos (Figura 22).

Tabla 16. Estructura y frecuencia de haplotipos de los genes *FCRL3*, *TNFR1* en varones, y *NFKB1* en mujeres.

ARJ	Haplotipos	Frecuencia		OR	95% IC	P
		Casos	Controles ^o			
(n=87)	FCRL3_3, 4, 5, 6					
	TGGG	0.62	0.48	1.78	(1.21-2.60)	0.005*
	CACA	0.21	0.20	1.06	(0.66-1.68)	NS
	CGCA	0.12	0.28	0.35	(0.20-0.60)	0.00005*
	TAGG	0.02	0.02	0.99	(0.20-4.32)	NS
(n=87)						
	<i>TNFR1</i>					
	-995 -980 -329 -300 -103					
	GGGAA	0.35	0.48	0.59	(0.40-0.88)	0.006*
	GGTAA	0.33	0.23	1.68	(1.11-2.56)	0.011*
	CGGAA	0.22	0.19	–	–	NS
	GTGGC	0.039	0.029	–	–	NS
	CGTAA	0.0	0.034	–	–	NS
	GGGGA	0.019	0.016	–	--	NS
(n=210)						
	<i>NFKB1</i>					
	-94Ins/Del NFKB1_1,2,3,4,5,6,7,9,10,11,12					
	DelCCGCTCCTGTG	0.61	0.54			NS
	InsTTATCCTTCCG	0.16	0.23			0.019*
	InsTTACCCTTCTC	0.012	0.024	–	–	NS
	InsTTATCCTTCTC	0.016	0.022	–	–	NS
	InsTTATCCTTCTC	0.016	0.014	–	–	NS
	DelCCGCTCCTCTG	0.026	0.008	–	–	NS
	DelCCGCTCTTCTC	0.005	0.015	–	–	NS
	DelCCGCTCCTGCG	0.004	0.014	–	–	NS
	InsTTATCCCTCCG					NS

* Todos los análisis fueron corregidos con 100,000 permutaciones.

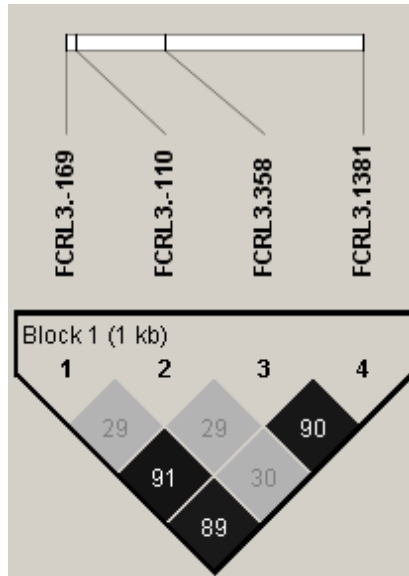


Figura 20. LD entre los SNP de *FCRL3*. En varones, el SNP -169T/C de *FCRL3* muestra un alto LD con los SNP +358 y +1381 en casos y controles, no así con el SNP -110. Los valores de LD fueron medidos con r^2 .

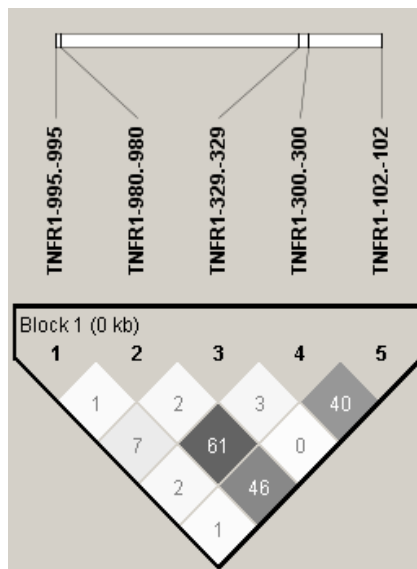


Figura 21. LD entre los SNP de *TNFR1*. Los cinco SNP de *TNFR1* no muestra LD entre ellos en casos y controles. Los valores de LD fueron medidos con r^2 .

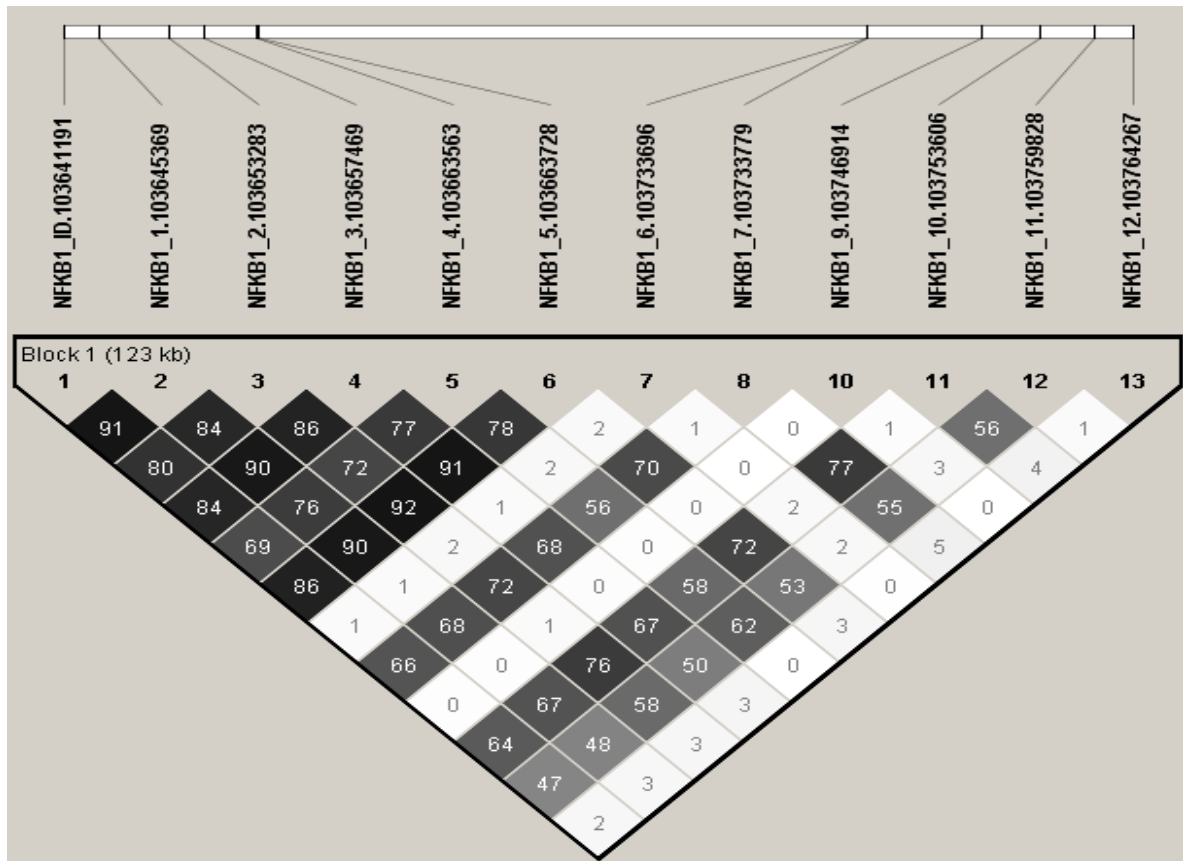


Figura 22. LD entre los 12 SNP de *NFKB1*. El análisis de los doce SNP de *NFKB1* muestra un alto LD entre los primeros 6 SNP (-94ATTG/- y *NFKB1*_1-5) en casos y controles. No así, el resto de polimorfismos.

8.4 Amplificación y restricción enzimática de la ins/del -94ATTG/- *NFKB1*

Las figuras 23 y 24 muestran los amplificados y la restricción enzimática de la ins/del -94ATTG del gen *NFKB1*. El producto de amplificación es de 311 pb. La generación de varias bandas por restricción enzimática confirman la presencia de la ins/del -94ATTG de *NFKB1* (Ver figura 24).

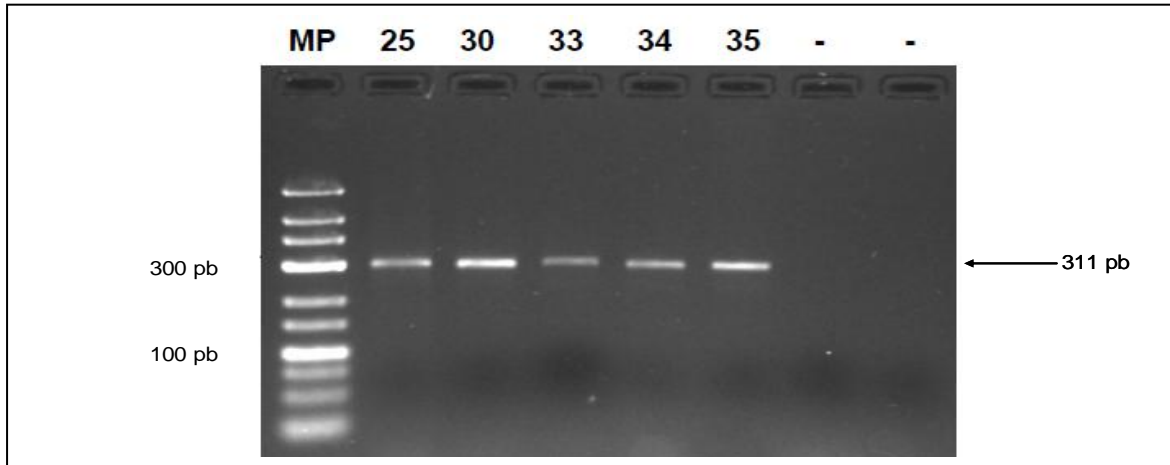


Figura 23. Amplicón de *NFKB1*. El gel de agarosa muestra 5 productos de PCR originados de la amplificación de un fragmento del promotor del gen *NFKB1*. El producto esperado de la amplificación fue de 311pb.

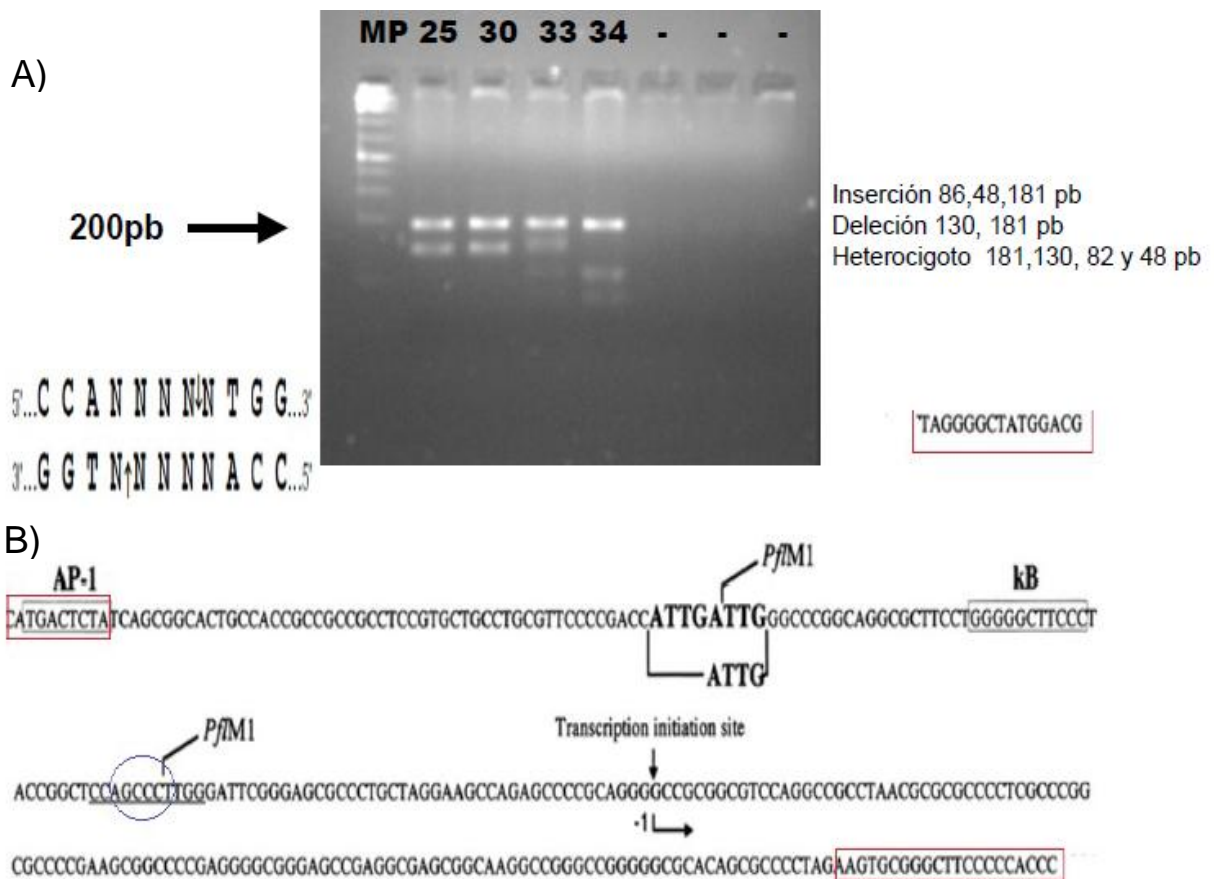


Figura 24. Restricción enzimática del amplicón de 311 pb de *NFKB1*. A) El gel de agarosa muestra bandas de DNA restringido con la enzima *Van19A1* en 4 individuos sanos. B) Se muestra la secuencia de ADN en donde corta la enzima de restricción, de esta manera se pueden observar diferentes bandas de DNA que representan a la delección (130 y 181 pb), inserción (86, 48, 181 pb) o el heterocigoto (181,130, 82 y 48 pb).

8.4.1 Interacción epistática entre los SNP -169T/C de *FCRL3* y la ins/del -94ATTG/- de *NFKB1*

Recientemente, Martínez y cols., reportaron una interacción genética entre los SNP -169T/C de *FCRL3* y la ins/del -94ATTG/- de *NF-KB1*. Nosotros realizamos este mismo análisis con nuestros datos y encontramos también una asociación, sin embargo, esta asociación es de protección a ARJ (Tabla 17).

Tabla 17. Asociación de interacción génica entre los polimorfismos de *FCRL3* y *NFKB1*.

<i>NFKB1</i>	del/del n (%)	ins/del n (%)	ins/ins n (%)
Controles			
<i>FCRL3</i> -169			
T T	44 (25.4)	46 (23.2)	15 (25.4)
T C	85 (49.2)	105 (53.0)	30 (50.9)
C C	44 (25.4)	47 (23.8)	14 (23.7)
Pacientes			
<i>FCRL3</i> -169			
T T	44 (39.7)	26 (33.3)	7 (28.0)
T C	45 (40.5)	36 (46.2)	12 (48.0)
T C	22 (19.8)	16 (20.5)	6 (24.0)
C C			

Los genotipos de *FCRL3*-169T/C fueron comparados para cada genotipo de la ins/del -94ATTG/- de *NFKB1*.

del/del; OR; 0.67, 95% IC, 0.48-0.94, p=0.02

ins/del; OR; 0.76, 95% IC, 0.53-1.11, p=0.16

ins/ins; OR; 0.96, 95% IC, 0.49-1.85, p=0.89

8.5 Análisis de expresión génica relativa de *TNFR1*

8.5.1 Número y porcentaje de individuos evaluados para el análisis de expresión génica.

El tamaño de muestra final para evaluar la expresión génica de *TNFR1* fue de 75 muestras, de ellas 42 fueron mujeres y 33 fueron varones. La distribución del género para hacer los ensayos de expresión génica se muestra en la figura 25.

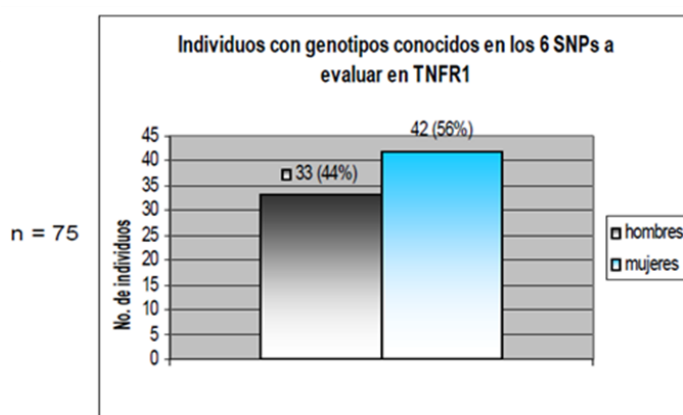


Figura 25. Distribución del número y porcentaje de individuos empleados para el análisis de expresión.

8.5.2 Expresión génica de *TNFR1* mediante PCR de punto final

Para estandarizar las condiciones de retrotranscripción-PCR se realizó un primer análisis de expresión génica por PCR de punto final, sin tomar en cuenta genotipos de *TNFR1* (-329G/T), los resultados se muestran en la figura 26.

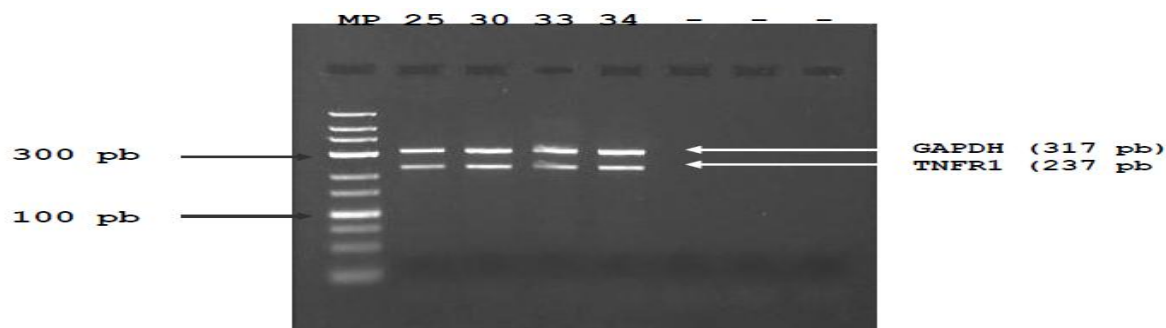


Figura 26. Análisis de expresión del gen *TNFR1*. El producto de PCR de punto final presenta la expresión génica de *TNFR1* de 5 muestras de individuos sanos, sin tomar en cuenta los genotipos del SNP -329G/T de dicho gen.

8.5.3 Curva estándar de la expresión génica relativa de los genes *GAPDH* y *TNFR1*

Inicialmente se hizo el análisis de curva estándar para establecer la dilución apropiada para el análisis de expresión génica y para observar la eficiencia de amplificación tanto para *GAPDH* como para el gen *TNFR1* (Figura 27).

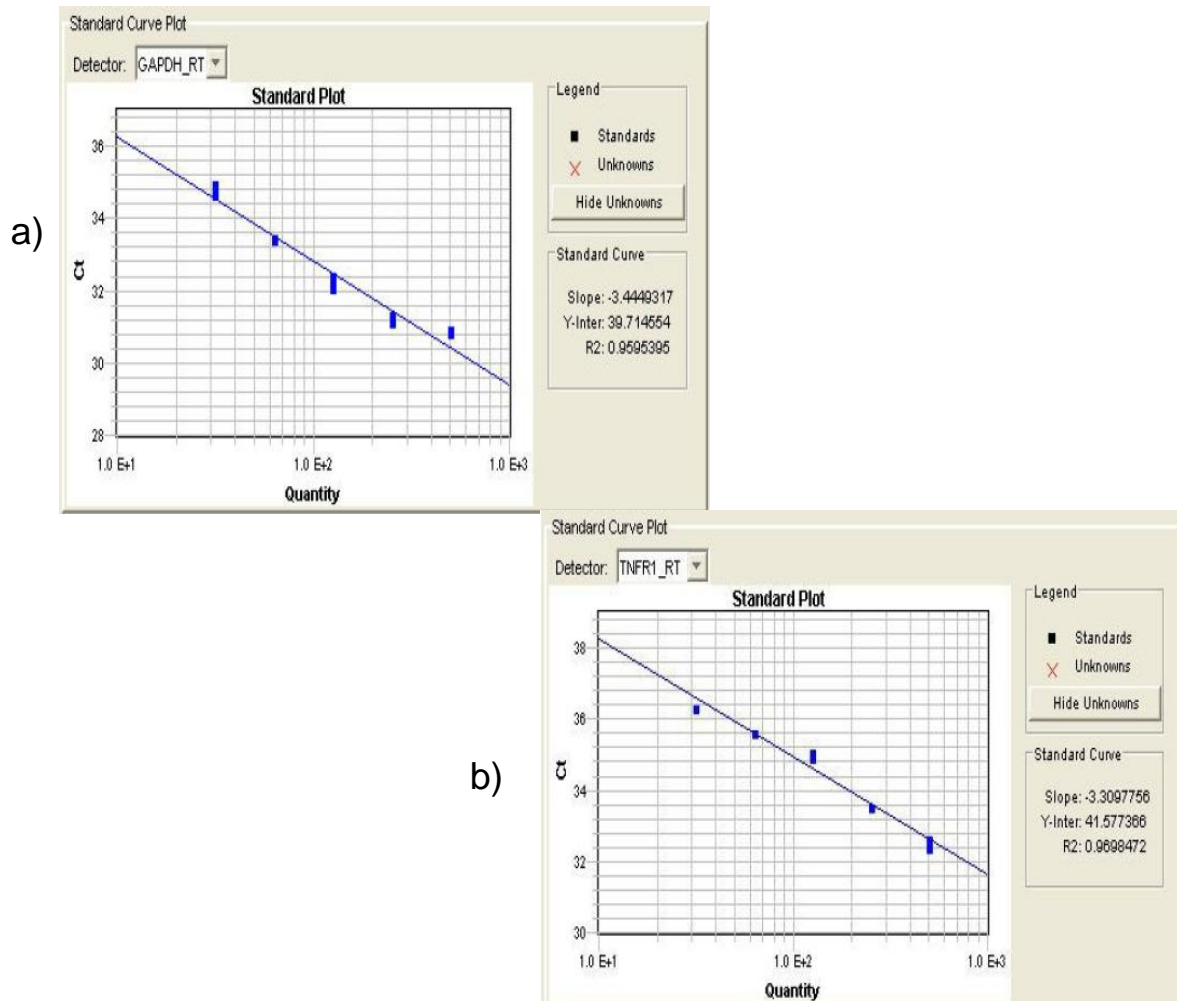
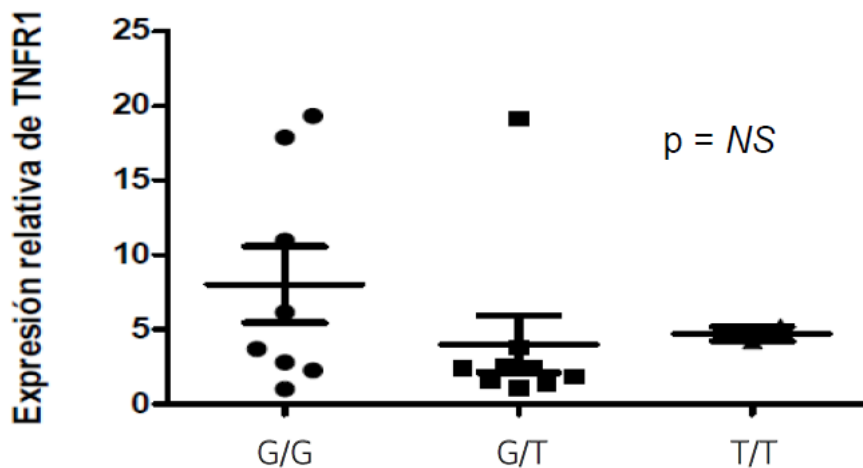


Figura 27. Curva estándar de los genes *GAPDH* y *TNFR1*. En ambos casos la curva estándar dio buenas eficiencias de amplificación; 0.96 y 0.97 para, a) *GAPDH*, y b) *TNFR1*, respectivamente.

8.5.4. Datos de la evaluación funcional del SNP -309G/T de *TNFR1* en la expresión génica

Del número total de individuos genotipificados para los 5 SNP ubicados en un fragmento de aproximadamente 1000 pb río arriba de la transcripción de *TNFR1*, sólo se tomó en cuenta a los individuos con los genotipos del SNP asociado a ARJ; G/G=8, G/T=9, T/T=2 del SNP -329G/T de *TNFR1*. Por otro lado, se analizó también diversas combinaciones de alelos (haplotipos) de estos 5 SNP para ver si tenían alguna influencia en la expresión diferencial de *TNFR1*, sin embargo, ninguno de ellos mostró diferencias en la expresión génica (información no mostrada), de esta manera, sólo se analizó la expresión génica de *TNFR1* tomando en cuenta a los tres genotipos del SNP -329G/T asociado a ARJ, como control se empleó a los individuos que presentaron los genotipos ancestrales G/G (Figura 28). Los resultados no mostraron ninguna diferencia estadística entre los tres genotipos. Estos datos sugieren que este polimorfismo bajo nuestras condiciones de estudio no está asociado con una expresión diferencial de *TNFR1*.



n = 19 G/G = 8, G/T = 9, T/T = 2

Figura 28. Análisis de la expresión génica relativa de *TNFR1* en 19 individuos sanos. La expresión génica relativa evaluó el efecto de los tres genotipos del SNP -329G/T de *TNFR1*, los resultados no mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre genotipos de este SNP.

9. DISCUSIÓN

La ARJ es una enfermedad caracterizada por una respuesta inmune desregulada principalmente del tipo Th1, la cuál ocasiona inflamación, destrucción del cartílago y erosión del huesos^{7,10}. Diversos SNP en genes codificantes para proteínas involucradas en estos procesos biológicos han sido analizados en diferentes poblaciones con AIJ en busca de marcadores de susceptibilidad, gravedad o protección^{71,76-86}. Nuestro estudio no mostró asociación de los genes *IL2*, *IL8*, *IL17*, *CD40*, *CD80*, *GM-CSF*, *MCP1*, *TACE*, *TNFR1* y *TNFR2* con ARJ. Aunque el gen *TNFR1* se asoció con susceptibilidad a ARJ después de la estratificación por género. De estos genes estudiados, sólo *TNFR1*, *TNFR2* y *CD40* han sido previamente analizados en ARJ/JIA. Un estudio realizado en población Alemana analizó diversos polimorfismos de varios genes en ARJ, entre ellos el -609G/T de *TNFR1* (el -329G/T es el mismo) y una delección de 15 nucleótidos localizada en el promotor de *TNFR2*¹⁰². Al igual que en ese estudio, nuestros resultados no mostraron asociación del SNP -329G/T de *TNFR1* (aunque nuestro estudio mostró una tendencia a la asociación, $p=0.052$) con ARJ. Además de este, nosotros evaluamos 4 SNP de *TNFR2*, distinto al polimorfismo previamente analizado en población Alemana¹⁰². Respecto al gen *CD40*, nosotros evaluamos el SNP -552G/A (rs1800686), que de forma similar a lo encontrado con el polimorfismo (rs4810485) analizado en JIA por otro grupo de investigadores, se encontró que estos polimorfismos y, por ende el gen no está asociado con susceptibilidad a desarrollar esta patología¹¹³. Estos resultados sugieren que los SNP de los genes antes mencionados y bajo nuestras condiciones de estudio no son importantes en la etiopatogénesis de la ARJ en población Mexicana, sin embargo, otros polimorfismos de estos mismos genes podrían estar asociados con ARJ o alguno de los subtipos o rasgos clínicos no evaluados en este estudio, por lo que es necesario evaluar un número mayor de marcadores genéticos en estos genes candidato del sistema inmune, así como los rasgos clínicos de la ARJ para determinar su importancia en esta entidad compleja.

Nuestros resultados mostraron que los genes *TYK2* (-1218A/G), *IL23R* (-738G/A), *TNFR1* (-329T/G: asociado cuando se estratificó por género), *FCRL3* (-169T/C), *NF-kB1* (-94ATTG/-, y *NF-kB1_1-5*, 7, 10 y 11) se asociaron con susceptibilidad o

protección a ARJ. Respecto a *TYK2*, algunos reportes han evaluado el impacto de los polimorfismos rs12720356 y rs2304256 en la susceptibilidad a AR, los resultados no muestran una asociación entre estos polimorfismos de este gen y la enfermedad^{114,115}. Otros SNP de *TYK2*, entre ellos el -1218A/G han sido evaluados en LES¹¹⁶. Nosotros analizamos este mismo polimorfismo en ARJ. Nuestros resultados mostraron una asociación entre el SNP -1218A/G de *TYK2* y susceptibilidad a ARJ en varones. Este gen codifica a la proteína TYK2, la cuál pertenece a la familia de las JAK quinasas y señala a través de los receptores de varias citocinas¹¹⁷. Se ha documentado que los receptores de la IL12 y la IL23 pueden señalar a través de Tyk2, dicha señalización activa al factor de transcripción STAT4¹¹⁸. Este factor de transcripción se localiza en el citoplasma de células del sistema inmune y a través de mecanismos de fosforilación que involucran a TYK2 puede dimerizarse y translocarse al núcleo en donde expresa diversos genes involucrados en diversos procesos biológicos de los linfocitos, tales como la diferenciación de células T y la síntesis de genes proinflamatorios¹¹⁹. El análisis *in silico* a través de los programas FastSNP y TF search predicen que el alelo G del SNP -1218A/G de *TYK2* crea un sitio de unión al factor de transcripción YY1, dicha proteína se ha asociado con tres procesos biológicos importantes: a) activación de la transcripción, b) inhibición de la transcripción y, c) inicio de la transcripción de diversos genes¹²⁰. La proteína YY1 puede regular la expresión génica de manera positiva de *RANKL*, una citocina involucrada con la diferenciación de los osteoclastos e involucrada con AR¹²¹. De esta manera, hay una gran probabilidad de que el alelo G del SNP -1218A/G de *TYK2* asociado con susceptibilidad pueda regular la unión del factor de transcripción YY1 y afectar la señalización en las células T, ya sea activando, suprimiendo o iniciando la expresión de TYK2 en células inflamatorias, es necesario realizar ensayos de gen reportero y super-retardamiento para analizar si este alelo afecta la expresión génica *in vitro* y para observar si se une YY1 a la secuencia consenso donde se predice que se puede unir este factor de transcripción.

Respecto a la asociación con susceptibilidad del gen *IL23R* que codifica al receptor 23 de la IL23, hasta ahora se han reportado algunas asociaciones de SNP con susceptibilidad a AR y AIJ subtipo psoriática juvenil¹²²⁻¹²⁴, sin embargo, no hay datos de asociación entre el SNP -738G/A y ARJ/AIJ en otras poblaciones.

Como se mencionó anteriormente, la unión ligando (IL23)- receptor (IL23R) inician procesos de señalización intracelularmente a través de TYK2, este proceso lleva a la activación del factor de transcripción STAT4, el cuál influye en la diferenciación de células T y de la síntesis de genes proinflamatorios (Figura 29)^{117,118}. Hasta hoy no hay datos reportados de asociación con susceptibilidad entre el SNP -738G/A y ARJ, aunque si se ha visto asociación con protección entre el SNP rs11209026 de la IL23R y artritis psoriática juvenil¹²². Nuestro estudio muestra una asociación entre el alelo A del SNP -738G/A de *IL23R* y susceptibilidad a ARJ, este gen no se asoció con género cuando se estratificaron los datos. De acuerdo a los análisis *in silico* el alelo A crea un sitio de unión a un factor de transcripción Oct-1, este factor de transcripción puede activar o reprimir la transcripción de diversos genes, por ejemplo, en el promotor de la proteína C reactiva reprime su expresión, modulando así el efecto biológico de este gen¹²³. Así, si el alelo A genera un sitio de unión al factor de transcripción, entonces este alelo puede ocasionar la sobreexpresión o inhibición de la expresión del IL23R, lo cuál debe confirmarse por estudios funcionales. La figura 29 muestra a los productos de los genes *IL23R* y *TYK2*, las proteínas IL23R y TYK2 asociadas a ARJ.

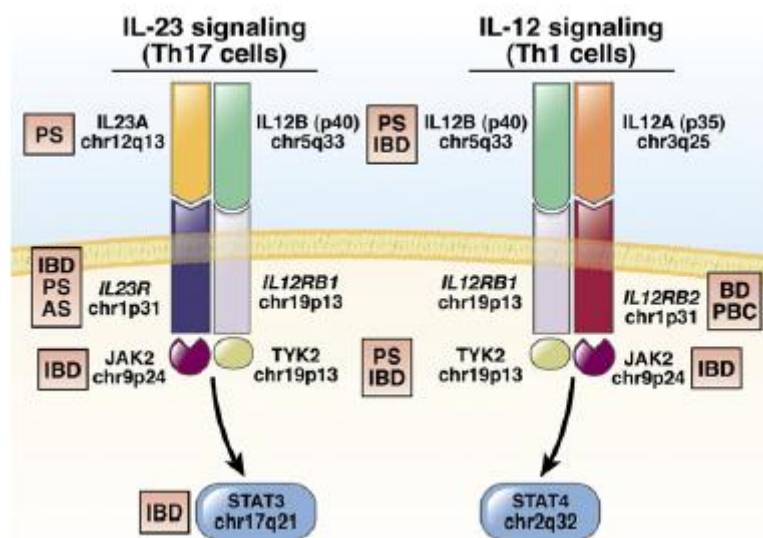


Figura 29. Activación de STAT3 y STAT4 mediada por IL23R y TYK2. Dos de las proteínas codificadas por genes asociados a ARJ fueron IL23R TYK2 (Tomado de Cho JH, 2011)¹²⁴.

En 2005, Kochi y cols., reportaron una asociación entre el alelo C del SNP -169T/C (FCRL3_3) de *FCRL3* con tres enfermedades autoinmunes (AR, LES y TA)⁶⁸. El alelo C del SNP -169T/C se encontró en alto LD con otros tres alelos (CACA) de otros SNP ubicados en el mismo gen (promotor -110G/A, 5'UTR +358G/C localizado en el extremo 5'UTR del exón 2, y el +1381G/A ubicado en el intrón 3). Este mismo haplotipo CACA mostró una fuerte asociación con susceptibilidad a las tres enfermedades autoinmunes⁶⁸. Estos mismos SNP han sido analizados en diversas poblaciones y en diversas enfermedades, los resultados muestran la influencia de este SNP (-169T/C) en la AR y LES en Asiáticos, específicamente con los del Oeste de Asia, sin embargo, en individuos Europeos con ambas patologías no se ha observado ninguna evidencia de asociación^{80,81}. Otros autores han reportado una asociación entre el alelo C de *FCRL3_3* y protección a AAD, TA y EM, recientemente un genotipo de este mismo SNP fue asociado con protección con rasgos clínicos de LES⁸²⁻⁸⁶. Estos hallazgos sugieren un patrón de herencia complejo entre este SNP y varias enfermedades autoinmunes. Nuestros datos concuerdan con estos últimos datos, nosotros encontramos que el alelo C del SNP *FCRL3_3* confiere protección a ARJ en una manera dependiente de género (varones) (Ver tablas 12 y 13). El análisis de haplotipos también mostró una asociación con protección a ARJ en varones (CGCA) (Ver tabla 15). Kochi y cols., mostraron a través de estudios funcionales la importancia del alelo C del SNP -169T/C en la creación de una secuencia consenso con mayor afinidad de unión para el factor de transcripción NF-κB que al alelo T. El factor de transcripción NF-κB expresa genes pro-inflamatorios, involucrados con la destrucción del cartílago y la erosión del hueso en AR y ARJ^{95,125,126}. *FCRL3* codifica para la proteína 3 parecida a los receptores de la fracción cristalizable gamma, la cuál es la única de los receptores Fc con dos motivos: De activación basado en tirosina (ITAM) y de inhibición (ITIM), ambos motivos de *FCRL3* sugieren un papel dual regulatorio en el sistema inmune (Figura 30)^{127,128}.

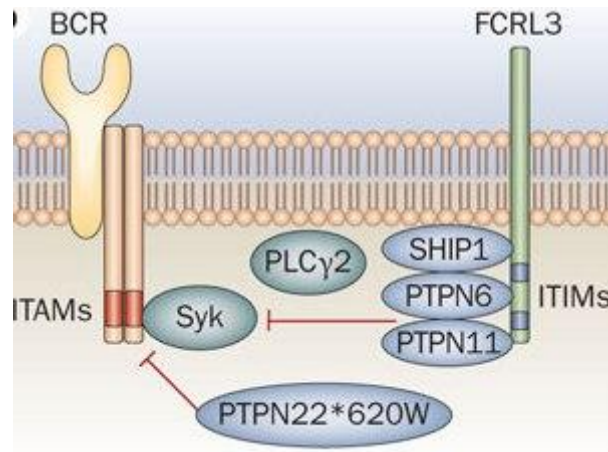


Figura 30. Transducción de señales mediada por FCRL3. La proteína FCRL3 debido a la presencia de los dos motivos ITIM e ITAM puede regular tanto la activación como inhibición de la respuesta autoinmune en células B (Tomado de Kochi Y, 2010)¹²⁸.

La mayoría de evidencias experimentales han mostrado el papel del alelo C o el genotipo CC de este SNP (-169T/C) en el riesgo a desarrollar diversas enfermedades autoinmunes, e incluso otro estudio mostró en pacientes con LES e individuos sanos que la presencia del genotipo -169CC se asocia con una mayor cantidad de proteína en la membrana en comparación con los individuos que presentan los genotipos T/C ó T/T¹²⁹. Aunque hay una relación clara entre los estudios funcionales que muestran el efecto del alelo C asociado con mayores niveles de expresión génica, y el genotipo C/C con mayores niveles de proteína FCRL3 en pacientes con LES, uno esperaría lo siguiente: si hay mayor cantidad de proteína en individuos con el genotipo C/C, entonces este receptor podría actuar a través de uno de sus dos motivos (ITAM e ITIM), como activador o inhibidor de una respuesta autoinmune. Un estudio reciente publicado también por Kochi y cols, mostró el papel de FCRL3 en la inhibición de la señalización en las células B a través del receptor de células B¹³⁰. A pesar de la robustez de estos estudios funcionales, varios autores han mostrado la importancia del alelo C en la protección a desarrollar AAD, TA, EM, LES y ARJ (donde se incluye a nuestro estudio)⁸²⁻⁸⁶. Esto contradice al primer estudio publicado por Kochi y cols., donde no sólo mostraron la asociación del gen con la susceptibilidad a tres enfermedades autoinmunes, además se demostró el efecto del alelo funcional C con una mayor expresión génica de *FCRL3*⁶⁸. Hasta la fecha no hay un sólo reporte donde se muestre una asociación entre el SNP -169T/C con protección a AR, varios estudios muestran al alelo C asociado con susceptibilidad a AR en

Asía, específicamente en el Oeste de Asia^{68,80}. Aunque no hay datos de asociación entre este SNP y artritis juvenil, un estudio publicado por Eike y cols., mostró una tendencia de asociación de este SNP con susceptibilidad a AIJ¹³¹. Debido a los datos contradictorios entre este SNP y la susceptibilidad o protección a varias enfermedades autoinmunes, nosotros proponemos lo siguiente; 1) es probable que dependiendo de la patología autoinmune, FCRL3 actúe de manera diferente debido a su papel dual (ya que tiene ambos dominios; ITAM o ITIM), b) este alelo este en LD con otro alelo de otro SNP ubicado en la región 1q21-23 (en esta región se encuentran varios genes de la familia FCRLs) donde hay alto LD entre genes y entre SNP a través de varios genes, y c) este alelo puede interactuar con otros alelos de otros polimorfismos, como ocurre con *NFKB1* (-94ATTG/-), *PTPN22* (1858C/T) o *HLB-DRB1* (*0103) y como nosotros también lo demostramos (Tabla 17)¹³²⁻¹³⁴.

Respecto a los genes codificantes para proteínas que señalizan a través de TNF- α , nosotros encontramos a tres de ellos involucrados con esta patología autoinmune (*TNF- α* publicado previamente, *TNFR1* y *NFKB1*). TNF- α es una citocina de suma importancia en la AR y ARJ debido a su papel pleiotrópico en diversos tipos celulares, tales como macrófagos, monocitos, linfocitos, fibroblastos sinoviales y junto con sus receptores (TNFR1 y TNFR2) se han involucrado en la patogénesis de la ARJ^{25,89,90}. TNF- α se encuentra de forma natural unida a la membrana, sin embargo, existe una forma soluble que regula diversas funciones del TNF- α (TNF- α soluble), esta forma soluble es liberada por la TACE⁹¹⁻⁹⁵. De esta manera, la forma soluble puede activar varias vías de señalización y mediar muchas funciones a través de TNFR1 o TNFR2⁹¹⁻⁹⁵. De hecho, la vía de TNF- α es tan importante en la AR, que existen terapias con anticuerpos (etanercept, infliximab, adalimumab) dirigidos contra esta citocina, incluso algunos estudios no toman en cuenta genotipos del SNP -308G/A de TNF- α , mientras que otros si toman en cuenta a los genotipos^{96,97}. Las evidencias muestran una mejoría en pacientes con ARJ y el genotipo -308G/G de *TNF- α* , respecto a los individuos que tienen los genitipo A/A y G/A⁹⁷. Este alelo se ha asociado con mayores niveles de expresión en comparación del alelo G, de hecho, se ha observado que el alelo A aumenta varias veces la actividad transcripcional y ha sido asociado con niveles incrementados de *TNF- α* *in vitro* y con una pobre respuesta al tratamiento^{75,96,97}.

Nosotros encontramos una fuerte asociación entre el SNP -308G/A de *TNF- α* y susceptibilidad a ARJ en mujeres, nuestros datos indican que el alelo A se asocia con susceptibilidad en mujeres mexicanas con ARJ (datos ya publicados).¹⁰³ Los datos obtenidos también muestran que la MAF de este SNP (-308A) es la más baja reportada en ARJ/JIA de todas las poblaciones analizadas. Otro estudio realizado en nuestra población mostró a este polimorfismo asociado con gravedad a ARJ⁷¹. Un meta-análisis publicado recientemente, mostró una asociación negativa de este polimorfismo (junto con el -238G/A) con ARJ/AIJ en población Europea u otras poblaciones, de hecho, nuestros datos son de los pocos publicados donde se muestra una asociación entre el SNP -308G/A y ARJ¹³⁵.

Siguiendo con los estudios de asociación en genes que sintetizan proteínas y que participan en esta vía, nosotros encontramos que el SNP -329G/T de *TNFR1* se asoció con susceptibilidad a desarrollar ARJ en varones, de hecho, nosotros evaluamos si el alelo T de este SNP afecta los niveles de expresión *in vivo* en leucocitos de sangre periférica de individuos sanos, los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica tomando en cuenta los tres genotipos de este SNP, sin embargo, hay una tendencia a una disminución en la expresión génica con el alelo T (Figura 28). Un estudio publicado por Sainz y cols en 2009, mostró una asociación entre este SNP y susceptibilidad a la aspergilosis pulmonar, además, también mostró una relación directa entre el alelo T con una disminución de la expresión génica de este gen *in vivo*¹³⁶. Nosotros no observamos este mismo hallazgo, aunque los datos muestran una tendencia a la disminución en la expresión génica de este gen en individuos con genotipos G/T o T/T en comparación con G/G. Recientemente Kim y cols, publicaron el efecto del alelo T del SNP -329G/T en la expresión génica *in vitro*¹³⁷, sus resultados mostraron que el alelo T disminuyó la expresión génica del gen reportero β -lactamasa en líneas celulares de hepatocarcinoma¹³⁷, esta proteína tiene diversas funciones biológicas fundamentales para el bien funcionamiento celular, entre estas funciones se encuentra la regulación de la apoptosis, Kim y cols, propusieron que la disminución de la expresión génica debido a la presencia del alelo T podría en los hepatocarcinomas desregular la apoptosis, fenómeno biológico comúnmente alterado en las líneas tumorales y en los diversos cánceres. Tratando de extrapolar la hipótesis del efecto funcional del alelo T de

este polimorfismo en la apoptosis de tumores hepáticos, en ARJ este alelo pudiera afectar la apoptosis, lo cuál ha sido observado en esta patología, incluso diversos tipos celulares no experimentan apoptosis provocando en última instancia que las células hiperproliferen (por ejemplo de células T y células del sinovium) y produzcan más citocinas proinflamatorias¹³⁸⁻¹⁴⁰. Al respecto, nuestros resultados no alcanzaron una significancia estadística en los individuos sanos sin antecedentes de enfermedades inflamatorias, autoinmunes o concomitantes, aunque si se muestra una tendencia a la disminución en la expresión génica. Es necesario evaluar a este mismo polimorfismo en individuos afectados con la enfermedad, que no estén en tratamiento farmacológico, ya que uno de los principales problemas de este estudio es la ausencia de la enfermedad, recordando que esta es un patología multifactorial y que para que se desarrolle se requiere de factores genéticos (el SNP evaluado) y ambientales, faltando está última (la enfermedad) para observar el efecto real de ambos alelos en la expresión génica. Finalmente, nosotros encontramos una asociación genética de protección a ARJ y varios SNP (con alto LD entre ellos) en *NFKB1*, tanto en mujeres como en varones. NF-κB puede ser activado a través de TNF-α, TNFR1 y TNFR2 y otras proteínas (Figura 31)⁹⁵. NF-κB1 pertenece a la familia de factores de transcripción que regula varios procesos biológicos, incluyendo la respuesta inmune innata y adaptativa, reacciones de fase aguda y apoptosis.¹⁴⁰ Este factor de transcripción está formado por un heterodímero (p50/p105) que regula la expresión de diversos genes^{93,95,125,140}. El gen *NFKB1* se encuentra localizado en la banda citogenética 4q24 que ha sido ligada a ARJ en pares de hermanos afectados.⁶³ Anormalidades de TNF-α, TNFR1 y NF-κB1 pueden alterar la síntesis de citocinas proinflamatorias, las cuales están relacionadas con un gran número de enfermedades crónicas inflamatorias donde se incluyen a la AR y a la ARJ^{10,88-90}. En 2005, Karban AS y cols., analizaron una ins/del ubicada en la región promotora de este gen (-94ATTG/-) en colitis ulcerativa, ellos encontraron a esta ins/del asociada con susceptibilidad a esta patología, además, demostraron *in vitro* en las líneas celulares HeLa o HT-29 que la inserción podía generar una secuencia que sirvió para unir a diversas proteínas nucleares a la región del promotor de *NFκB1*, de esta manera la delección se asoció con una disminución de la actividad del promotor de este gen¹⁴². Este mismo polimorfismo ha sido analizado en AR y LES en población española, sin embargo, no se observó

ninguna asociación con estas patologías¹⁴³. Por otro lado, el genotipo ATTG₁/ATTG₂ (heterocigoto) ha sido asociado con protección con rasgos clínicos de LES en población China¹⁴⁴. Aunque no se ha observado una relación directa con AR, si se ha reportado una asociación entre esta ins/del y algunas comorbilidades de AR¹²³. En población española se ha observado una interacción entre la ins/del -94ATTG y el SNP -169T/C de *FCRL3*.¹⁴³ Nosotros encontramos una asociación con protección a desarrollar ARJ con la ins/del (ATTG/-) de *NFKB1* y el polimorfismo -169T/C de *FCRL3*. Estos resultados contradictorios a los previamente publicados pueden ser explicados por los mismos mecanismos de *FCRL3* y su asociación con ARJ: a) es probable que dependiendo de la patología autoinmune, el producto de *NFKB1* actúe de manera diferente, b) este alelo presente alto LD con otro (s) alelo (s) de otro (s) u otros SNP ubicados en la región 4q24 o que estén dentro del mismo gen (varios SNP analizados en este estudio están en LD, ó c) este alelo interaccione con otros alelos de otros polimorfismos, como ocurre con *NFKB1* (-94ATTG/-) y *FCRL3* (-169T/C). De hecho, nosotros hicimos la interacción génica entre alelos y genotipos funcionales de *NFKB1* (-94ATTG/-) y *FCRL3_3* (-169T/C), y nuestros resultados sugieren una asociación entre esta interacción y protección a ARJ, sin embargo, los datos muestran una asociación dependiente de *FCRL3* más que de *NFKB1* (Ver tabla 22). Posteriormente, analizamos 12 SNP distribuidos a través de todo el gen, 8 de ellos mostraron asociación genética con ARJ, 5 de los cuales se encuentran en el intrón 1 (*NFKB1_1C/T*, *NFKB1_2C/T*, *NFKB1_3G/A*, *NFKB1_4C/T*, *NFKB1_5T/C*), los otros tres se encuentran en los intrones 12 (rs4648050), 22 (rs3817865) y en la región 3'UTR (rs7674640). El análisis *in silico* predice el efecto de los alelos T de los SNP *NFKB1_1C/T* y *NFKB1_2C/T*, respectivamente, creando un enhancer intrónico para C/EBP. La base de datos de emsemble (www.ensemble.org) reporta hasta el día de hoy 12 transcritos, 8 de ellos producen proteínas, pero sólo tres de ellos producen proteínas funcionales, 5 más producen proteínas truncas, dos transcritos no se traducen y los dos transcritos restantes retienen intrones. Es probable que alguno de los alelos de los SNP asociados con protección a ARJ que predice crear un sitio similar a enhancer intrónico (secuencias consenso adicionales que se encuentran en los intrones y que potencian la eficiencia de corte y empalme, y que se han asociado con la inclusión de exones, retención de intrones y con la generación de proteínas truncas no funcionales¹⁴⁵⁻¹⁴⁷) ubicados

en el intrón 1 pueda retener el intrón, por lo que el transcrito sea degradado en la célula donde se expresa este gen y por lo tanto, esta variante no sería funcional. Es probable también, que alguno de estos alelos de los SNP asociados potencien el splicing y se incluya el exón 1 en una variante de splicing que no ocupe el exón 1 y por lo tanto esta variante no sea funcional. Si esto pasará con la presencia de las MAF de los SNP NFKB1_1(3853)C/T, NFKB1_2(11767)C/T, NFKB1_3(15953)G/A, NFKB1_4(22047)C/T o NFKB1_5(21988)T/C asociados con protección a ARJ, entonces *NFKB1* no se traduciría a proteína y no habría inflamación mediada por NF-κB1, de esta manera estos alelos (ambos en LD) asociados con ARJ podrían proteger al desarrollo de ARJ como lo muestran nuestros datos epidemiológicos, sin embargo, habría que realizar estudios funcionales para confirmar o descartar este hallazgo. Hasta ahora no hay estudios donde se muestre una asociación entre estos polimorfismos de *NFKB1* y AR o ARJ¹⁴⁸, aunque algunos de los SNP analizados aquí han mostrado asociación con otras patologías como la enfermedad arterial coronaria (NFKB1_1), dependencia a alcohol (NFKB1_4), y linfoma de Hodgkin (NFKB1_5)¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Por otro lado, otros SNP no incluidos en este estudio de este gen han sido asociados con otras patologías como linfoma de Hodgkin, glioma o cirrosis biliar primaria¹⁵²⁻¹⁵⁴. Este es el primer reporte donde se muestra una asociación entre SNP de *NFKB1* y protección a ARJ. La figura 31 muestra la vía de señalización de TNF-α y los productos de los genes *TNF-α* (previamente publicado), *TNFR1* y *NFKB1* asociados a ARJ.

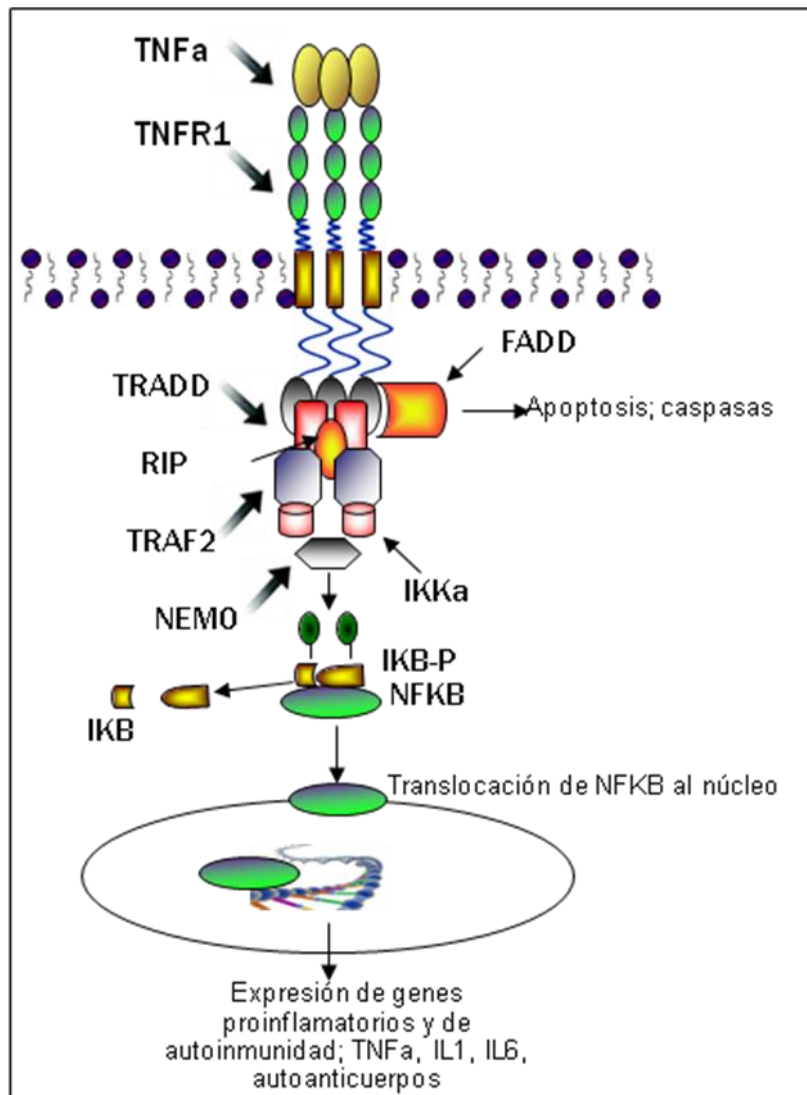


Figura 31. Vía de señalización de TNF- α y proteínas asociadas a ARJ. Los productos de los genes *TNF- α* , *TNFR1* y *NFKB1* mostraron asociación con ARJ en población Mexicana (Tomado de Frago JM, 2013)¹⁵⁵.

Nuestros hallazgos muestran diversas asociaciones genéticas entre ARJ y estratificación por género: en varones el polimorfismo -1218A/G de *TYK2*, el -169T/C de *FCRL3*, el -329T/G de *TNFR1* y los polimorfismos NFKB1_1-5 y 7 de *NF-kB1*), mientras que en mujeres los polimorfismos asociados fueron NFKB1_1-5, 10 y 11 de *NF-kB1*. Las asociaciones dependientes de género han sido reportadas desde hace varios años, siendo incluso comunes en enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes, algunos ejemplos de genes con asociación género dependiente son la *IL13*, *HLA*, *IL4*¹⁵⁶⁻¹⁵⁹. Diversas evidencias experimentales

muestran el papel de género como una variable “ambiental” diferencial entre varones y mujeres, y el factor ambiental “género” puede interactuar con diversos genotipos en una manera similar a otros factores ambientales, sin embargo, dependiendo del género pueden causar susceptibilidad o protección a diversos rasgos incluyendo enfermedades¹⁶⁰.

En resumen, de los 14 genes evaluados en este estudio, 5 mostraron asociación con ARJ (*FCRL3*, *TYK2*, *IL23R*, *TNFR1* y *NFKB1*). Un estudio anterior mostró que la vía de señalización de TNF- α es importante en el desarrollo de la ARJ en población Mexicana, de esta manera tres genes de esta vía fueron asociados con esta patología (*TNF- α* , *TNFR1* y *NFKB1*), y aunque se requiere de más estudios para confirmar estos datos, nuestros hallazgos fortalecen los datos donde se demuestra la importancia de esta vía en la fisiopatología de la ARJ. *FCRL3* es otro de los genes importantes en la fisiopatología de la ARJ (ver artículo anexo)¹⁶¹ en nuestra población. Sin duda, la identificación de los factores genéticos involucrados en la patogénesis de la ARJ contribuirá al entendimiento de la enfermedad y al desarrollo de nuevos blancos terapéuticos y a una medicina genómica individualizada, preventiva y predictiva.

10. Conclusiones

- Los polimorfismos analizados de los genes *IL2* (-100A/C), *IL8* (-199T/C), *IL17* (-692TC/), *CD40* (-552G/A), *CD80* (-91G/C), *GMCSF* (-641A/C), *MCP1* (-2518A/G), *TNFR2* (Lys56Lys, 40205G/A, 40232T/C y 40939C/T) y *TACE* (-1455A/C y -647T/G) no mostraron asociación con ARJ en población Mexicana. Sin embargo, esto no descarta que estos mismo alelos si estén asociados con rasgos clínicos de la enfermedad no evaluados en este estudio.
- Los polimorfismos -1218A/G de *TYK2*, -308G/A de *TNF- α* , -329G/T de *TNFR1* se asociaron con susceptibilidad de manera dependiente de género.
- El polimorfismo -738G/A de *IL23R* se asoció con protección en casos y controles, mientras que los SNP -169T/C de *FCRL3*, y la ins/del -94ATTG/- de *NFKB1* se asociaron con protección en mujeres con ARJ.
- Los análisis de interacción génica entre los polimorfismos -169T/C de *FCRL3* y -94ATTG/- de *NFKB1* se asociaron con protección a ARJ.
- Los análisis de expresión génica muestran que el SNP -329G/T asociado con susceptibilidad a ARJ no altera los niveles de expresión génica.
- Con estos datos estamos contribuyendo en la identificación de factores genéticos de protección y susceptibilidad asociados a la ARJ en población Mexicana.

11. Perspectivas

- > Aumentar el tamaño de muestra de pacientes con ARJ (n=500) y controles (n=500)

- > Analizar estos mismo SNP por subtipo clínico.

- > Evaluar el efecto de los alelos G/T del SNP -309G/T de *TNFR1* en sangre periférica de varones con ARJ y compararlos con los datos obtenidos de los individuos sanos.

- > Evaluar mediante estudios de gen reportero el efecto del alelo -309T de *TNFR1* en la expresión génica del receptor.

- > Evaluar si el alelo T del SNP -309G/T de *TNFR1* asociado a ARJ causa una disminución en la abundancia (por disminución de su expresión) de la proteína en la membrana sinovial de pacientes con ARJ.

- > Evaluar el impacto funcional de los SNP *NKB1_1_5* (localizados en el intrón 1 del gen *NFKB1*) en la eficiencia de splicing alternativo.

12. Referencias

1. Bultink IE, Vis M, van der Horst-Bruinsma IL, et al. Inflammatory rheumatic disorders and bone. *Curr Rheumatol Rep* 2012; 14: 224-30.
2. Sociedad Española de Reumatología. Manual SER de las Enfermedades Reumáticas. Sociedad Española de Reumatología. 4.^a ed. Madrid: Panamericana; 2004
3. Phelan JD, Thompson SD, Glass DN. Susceptibility to JRA/JIA: complementing general autoimmune and arthritis traits. *Genes Immun* 2006; 7: 1-10.
4. McBurney CA, Vina ER. Racial and ethnic disparities in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2012; 14: 463-71.
5. Jacob N, Jacob CO. Genetics of rheumatoid arthritis: an impressionist perspective. *Rheum Dis Clin North Am* 2012; 38: 243-57.
6. Kaipianen SO, Savolainen A. Changes in the incidence of juvenile rheumatoid arthritis in Finland. *Paediatric Rheumatol* 2001; 40: 928-32.
7. Schneider R, Passo M. Juvenile rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin N Am* 2002; 28: 503-530.
8. Rhodes VJ. Physical therapy management of patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Phys Ther* 1991;71: 910-9.
9. Hahn YS, Kim JG. A clinical study on pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis. *J Korean Pediatr Soc* 1995; 38: 386-96.
10. Hahn YS, Pathogenesis and clinical manifestation of juvenile rheumatoid arthritis. *Korean J Pediatr* 2010; 53: 921-30.
11. Hahn YS, Park JS, Kim JG. A clinical study on polyarticular juvenile rheumatoid: III. Polyarticular type. *J Korean Rheum Assoc* 1997; 4: 70-81.

12. Laiho K, Savolainen A, Kautianen H, et al. The cervical spine in juvenile chronic arthritis. *Spine J* 2002; 2: 89-94.
13. Brevier EJ Jr, Bass J, Baum J, et al. Current proposed revision of JRA criteria. *Arthritis Rheum* 1977; 20: 95-9.
14. European League Against Rheumatism: EULAR bulletin No 4: nomenclature and classification of arthritis in children. Basel, national zeitung AG, 1997.
15. Weiss JE, Liowite NT. Juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Clin N Am* 2005; 52: 413-42.
16. Kim JG, Jung JY, Yoon BY, Hahn YS. Clinical observations on juvenile rheumatoid arthritis: I. Systemic type. *J Korean Rheum Assoc* 1994; 1: 175-82.
17. Principios de anatomía y fisiología. Tortora GJ. Edit. Panamericana, 11a edición, 2011: pag 411-14.
18. Wedderburn LR, Robinson N, Patel A, Varsani H, Woo P. Selective recruitment of polarized T cells expressing CCR5 and CXCR3 to the inflamed joints of children with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Reum* 2000; 43: 765-74.
19. Ritchlin C. Fibroblast biology. Effector signals released by synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res.* 2000; 2: 356-60.
20. Weyand CM, Seyler TM, Goronzy JJ. B cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7 Suppl 3: S9-12.
21. Müller-Ladner U, Pap T, Gay RE, et al. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2005; 1: 102-10.

22. Choi Y, Arron JR, Townsend MJ. Promising bone-related therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5: 543-8.
23. Díaz-González JF, Ferraz Amaro I. The B cell in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Clin* 2007; 3: 176-82.
24. Edwards JC, Cambridge G. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 394-403.
25. Shi FD, Van Kaer L. Reciprocal regulation between natural killer cells and autoreactive T cells. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 751-60.
26. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 30-7.
27. Thomson W, Donn R. Juvenile idiopathic arthritis-what's new? What's next? *Arthritis Res* 2002; 4: 302-6.
28. Moroldo MB, Chaudhari M, Shear ES, et al. Juvenile rheumatoid arthritis affected sibpairs. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1962-6.
29. Savolainen A, Saila H, Kotaniemi K, et al. Magnitude of the genetic component in juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 1001.
30. Prahalad S. Genetic analysis of juvenile rheumatoid arthritis: approaches to complex traits. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2006; 36: 86-90.
31. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 30-7.
32. Anseel BM, Bywaters EG, Lawrence JS. Familial aggregation and twin studies in Still's disease. Juvenile chronic polyarthritis. *Rheumatology* 1969; 2: 37-61.

33. Baum J, Finc C. Juvenile rheumatoid arthritis in monozygotic twins: a case report and review of the literature. *Arthritis Rheum* 1968; 11: 33-6.
34. 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: 2335-8.
35. Phelan J, Thompson S. Genomic progress in pediatric arthritis: recent work and future goals. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18: 482-9.
36. Murray K, Thompson SD, Glass DN. Pathogenesis of juvenile chronic arthritis: genetic and environmental factors. *Arch Dis Child* 1997; 77: 530-4.
37. Zak NA, Shifman S, Shalom A, et al. Genetic dissection of common disease. *IMAJ* 2002; 4: 438-43.
38. Schork NJ, Murray SS, Frazer KA, et al. Common vs. rare allele hypotheses for complex diseases. *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19: 212-9.
39. 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.
40. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
41. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-51.
42. International Human Genome sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431: 931-45.
43. Makalowski W. The human genome structure and organization. *Acta Biochem Pol* 2001; 48: 587-98.
44. International HapMap Project. *Nature* 2003; 426: 789-96.

45. Lui T, Johnson JA, Caella G, et al. Sequencing complex diseases with HapMap. *Genetics* 2004; 168: 503-11.
46. Lin M, Aquilante C, Johnson JA, et al. Sequencing drug response with HapMap. *Pharmacogenomics J* 2005; 5: 149-56.
47. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005; 437: 1299-320.
48. International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNP. *Nature* 2007; 449: 851-61.
49. 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010; 467: 1061-73.
50. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, et al. Silent polymorphisms speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 9609-12.
51. Sadee W, Wang D, Papp AC, et al. Pharmacogenomics of the RNA world: structural RNA polymorphisms in drug therapy. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 89: 355-65.
52. Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP1-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259: 344-8.
53. Mathew C. Science, medicine, and the future: postgenomic technologies: hunting the genes for common disorders. *BMJ* 2001; 322: 1031-4.
54. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Genet* 2006; 7: 85-97.
55. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444: 444-54.

56. Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 2005; 307: 1434-40.
57. Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, et al. Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and human. *Nature* 2006; 439: 851-5.
58. Wright AF, Hastie ND. Complex genetic diseases: controversy over the Croesus code. *Genome Biology* 2001; 2.
59. Velázquez Cruz R, Jiménez Morales S, Ramírez Bello J, et al. Lupus eritematoso sistémico: genómica de la enfermedad. *Gac Med Mex* 2012; 148: 371-80.
60. Baron M. The search for complex disease genes: fault by linkage or fault by association? *Mol Psychiatry* 2001; 6: 143-9.
61. Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease. *Science* 2008, 322: 881-8.
62. Mayeux R. Mapping the new frontier: complex genetic disorders. *J Clin Invest* 2005; 115: 1404-7.
63. 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 Rheum* 2004; 50: 2920-30.
64. Ramírez Bello J, Vargas Alarcón G, Tovilla Zárata C, Fragoso JM. Single nucleotide polymorphisms (SNP): functional implications of regulatory-SNP (rSNP) and structural (srSNP) in complex disease. *Gac Med Mex* 2013; 149: 220-8.
65. Kininis M, Kraus WL. A global view of transcriptional regulatory by nuclear

- receptors: gene expression, factor localization, and DNA sequence analysis. *Nucl Recept Signal* 2008; 6: e005.
66. Näär AM, Lemon BD, Tjian R. Transcriptional coactivator complexes. *Ann Rev Biochem* 2001; 70: 475-501.
67. Hernández-Romano J, Martínez-Barnetche J, Valverde-Garduño V. Polymorphisms in gene regulatory regions and their role in the physiology of complex disease in post-genomic era. *Salud Pública Mex* 2009; 51 Suppl 3: S455-62.
68. Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, et al. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nat Genet* 2005; 37: 478-85.
69. Knight JC, Udalova I, Hill AV, et al. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet* 1999; 22: 145-50.
70. Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A, et al. Functional SNP in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet* 2002; 32: 650-4.
71. Rodríguez-Carreón AA, Zuñiga J, Hernández Pacheco G, et al. Tumor necrosis factor-alpha -308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. *J Autoimmun* 2005; 24: 63-8.
72. Witte JS, Palmer LJ, O'Connor RD, et al. Relation between tumour necrosis factor polymorphism TNFalpha -308 and risk of asthma. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 82-5.
73. Ding B, Fu S, Wang M, Yue C, et al. Tumor necrosis factor -308G>A

- polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis. *Int J Gynecol Cancer* 2012; 22: 213-9.
74. Pujhari SK, Ratho RK, Prabhakar S, et al. TNF-alpha promoter polymorphism: a factor contributing to the different immunological and clinical phenotypes in Japanese encephalitis. *BMC Infect Dis* 2012; 12: 23.
75. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, et al. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997; 94: 3195-9.
76. Glossop JR, Dawes PT, Nixon NB, et al. Polymorphism in the tumour necrosis factor receptor II gene is associated with circulating levels of soluble tumour necrosis factor receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R1227-34.
77. Angeles-Han S, Prahalad S. The genetics of juvenile idiopathic arthritis: what is new in 2010? *Curr Rheumatol Rep* 2010; 12: 87-93.
78. Hu X, Chang M, Saiki RK, Cargill MA, et al. The functional -169T-->C single-nucleotide polymorphism in FCRL3 is not associated with rheumatoid arthritis in white North Americans. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1022-5.
79. Eyre S, Bowes J, Potter C, et al. Association of the FCRL3 gene with rheumatoid arthritis: a further example of population specificity? *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R117.
80. Lee YH, Woo JH, Choi SJ, et al. Fc receptor-like 3-169C/T polymorphism and RA susceptibility: a meta-analysis. *Rheumatol Int* 2010; 30: 947-53.
81. Mao C, Pan H, Chen Q, et al. Association between Fc receptor-like 3 C169T polymorphism and risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2010; 37: 191-6.

82. Owen CJ, Kelly H, Eden JA, et al. Analysis of the Fc receptor-like-3 (FCRL3) locus in Caucasians with autoimmune disorders suggests a complex pattern of disease association. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1106-11.
83. Martínez A, Mas A, de las Heras V, et al. FCRL3 and multiple sclerosis pathogenesis: role in autoimmunity?. *J Neuroimmunol* 2007; 189: 132-6.
84. Matesanz F, Fernández O, Milne RL, et al. The high producer variant of the Fc-receptor like-3 (FCRL3) gene is involved in protection against multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2008; 195: 146-50.
85. Wellcome Trust Case Control Consortium; Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC), Burton PR, Clayton DG, Cardon LR et al. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNP in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet* 2007; 39: 1329-37.
86. Chen JY, Wang CM, Wu YJ, et al. Disease phenotypes and gender association of FCRL3 single-nucleotide polymorphism -169T/C in Taiwanese patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2001; 38: 264-70.
87. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *TRENDS in Cell Biology* 2001; 9:372-7
88. Grom AA, Murray KJ, Luyrink L, et al. Patterns of expression of tumor necrosis factor alpha, tumor necrosis factor beta, and their receptors in synovia of patients with juvenile rheumatoid arthritis and juvenile spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1703-10.
89. Kutukculer N, Caglayan S, Aydogdu F. Study of pro-inflammatory (TNF- α , IL-1 α , IL-6) and T-cell-derived (IL-2, IL-4) cytokines in plasma and synovial

- fluid of patients with juvenile chronic arthritis: correlations with clinical and laboratory parameters. *Clin Rheumatol* 1998; 17: 288-92.
90. Gattorno M, Facchetti P, Ghiotto F, et al. Synovial fluid T cell clones from oligoarticular juvenile arthritis patients display a prevalent Th1/Th0-type pattern of cytokine secretion irrespective of immunophenotype. *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 4-11.
91. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells. *Nature* 1997; 385: 729-73.
92. Moss ML, Jin SL, Milla ME, et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature* 1997; 385: 733-6.
93. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2010; 20: 87-103.
94. Solomon KA, Pesti N, Wu G, et al. Cutting edge: a dominant negative form of TNF- α converting enzyme inhibits proTNF and TNFRII secretion. *J Immunol* 1999; 163: 4105-8.
95. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003; 10: 45-65.
96. Basic J, Pavlovic D, Jevtovic-Stoimenov T, et al. Etanercept reduces matrix metalloproteinase-9 level in children with polyarticular juvenile idiopathic arthritis and TNF- α -308GG genotype. *J Physiol Biochem* 2010; 66: 173-80.
97. Schmeling H, Horneff G. Tumour necrosis factor alpha promoter polymorphisms and etanercept therapy in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatol Int* 2007; 27: 383-6.

98. Plosker GL, Croom KF. Sulfasalazine: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs* 2005; 65: 1825-49.
99. Dale J, Alcorn N, Cappel H, et al. Combination therapy for rheumatoid arthritis: methotrexate and sulfasalazine together or with other DMARDs. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007; 3: 450-8.
100. Ozen S, Alikasifoglu M, Bakkaloglu A, et al. Tumour necrosis factor alpha G-->A -238 and G-->A -308 polymorphisms in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41: 223-7.
101. Zeggini E, Thomson W, Alansari A, Oet al. British Paediatric Rheumatology Study Group. Tumour necrosis factor receptor II polymorphism and juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41: 462-5.
102. Milterski B, Drynda S, Böschow G, et al. Complex genetic predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis. *BMC Genet* 2004; 5: 2
103. Jiménez Morales S, Velázquez Cruz R, Ramírez Bello J, et al. Tumor necrosis factor-alpha is a common genetics risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population. *Hum Immunol* 2009; 70: 251-6.
104. Gilbert W, Maxam A. The nucleotide sequence of the lac Operator. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1973; 70: 3581-4.
105. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 560-4.
106. Kim BC, Kim WY, Park D, et al. SNP@Promoter: a database of human SNP (single nucleotide polymorphisms) within the putative promoter regions. *BMC Bioinformatics* 2008; 9: Suppl 1: S2.

107. Yuan HY, Chiou JJ, Tseng WH, et al. FASTSNP: an always up-to-date and expendable service for SNP function analysis and prioritization. 2006; 34: W635-41.
108. Kim BC, Kim WY, Park D, et al. [SNP@Promoter](#): a database of human SNP (single nucleotide polymorphisms) within the putative promoter regions. BMC Bioinformatics 2008; Suppl 1: S2.
109. Pico AR, Smirnov IV, Chang JS, et al. SNPLogic: an interactive single nucleotide polymorphism selection, annotation, and prioritization system. Nucleic Acids Res 2009; 37: D803-9.
110. Chan S, Choi EA, Shi Y. Pre-mRNA 3' - end processing complex assembly and function. Wiley Interdiscip Rev RNA 2011; 11: 321-35.
111. Loetscher H, Pan YC, Lahm HW, et al. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. Cell 1990; 20: 351-9.
112. Haploview: visualization and analysis of SNP genotype data. Barrett JC. Cold Spring Harb Protoc 2009; pdb.ip71
113. Hinks A, Eyre S, Ke X, et al. Overlap of disease susceptibility loci for rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. Ann Rheum Dis 2010; 69: 1049-53.
114. Sigurdsson S, Padyukov L, Kurreeman FA, et al. Association of haplotype in the promoter region of the interferon regulatory factor 5 gene with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2007; 56: 2202-10.
115. Suarez-Gestal M, Calaza M, Dieguez-Gonzalez R, et al. Rheumatoid arthritis does not share most of the newly identified systemic lupus erythematosus genetic factors. Arthritis Rheum 2009; 60: 2558-64.
116. Sigurdsson S, Nordmark G, Göring HH, et al. Polymorphisms in the

- tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 528-37.
117. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, et al. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002; 285: 1-24.
118. Paradowska-Gorycka A, Grzybowska-Kowalczyk A, Wojtecka-Lukasik E, et al. IL-23 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 2010; 71: 134-45.
119. Strobl B, Stoiber D, Sexl V, et al. Tyrosine kinase 2 (TYK2) in cytokine signalling and host immunity. *Front Biosci* 2011; 16: 3214-32.
120. Thomas MJ, Seto E. unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatic modifying enzymes the key? *Gene* 1999; 236: 197-208.
121. Shi Z, Silveira A, Patel P, et al. YY1 in involved in RANKL-induced transcription of the tartrate-resistant acid phosphatase gene in osteoclast differentiation. *Gene* 2004; 343: 117-26.
122. Hinks A, Martin P, Flynn E, et al. Subtype specific genetic associations for juvenile idiopathic arthritis:ERAP1 with the enhesitis related arthritis subtype and IL23R with juvenile psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: R12.
123. Voleti B, Hammond DJ Jr, Thirumalai A, et al. Oct-1 acts as a transcriptional repressor on the C-reactive protein promoter. *Mol Immunol* 2012; 52: 242-8.
124. Cho JH, Brant SR. recent insights into genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2011; 140: 1704-12.
125. Brown KD, Claudio E, Siebenlist U. The roles of the classical and

- alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: 212.
126. Sioud M, Mellbye O, Førre O. Analysis of the NF-kappa B p65 subunit, Fas antigen, Fas ligand and Bcl-2-related proteins in the synovium of RA and polyarticular JRA. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 125-34.
127. Barrow AD, Trowsdale J. You say ITAM and say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of immunoreceptor signalling. *Eur J Immunol* 2006; 136: 1646.
128. Kochi Y, Suzuki A, Yamada R, et al. Ethnogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis-implications for pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 5: 290-5.
129. Gibson AW, Li FJ, Wu J, et al. The FCRL3-169CT promoter single-nucleotide polymorphism, which is associated with systemic lupus erythematosus in a Japanese population, predicts expression of receptor protein on CD19+ B cells. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 3510-2.
130. Kochi Y, Myouzen K, Yamada R, et al. FCRL3, an autoimmune susceptibility gene, has inhibitory potential on B-cell receptor-mediated signaling. *J Immunol* 2009; 183: 5502-10.
131. Eike MC, Nordang GB, Karlsen TH, et al. The FCRL3-169T>C polymorphism is associated with rheumatoid arthritis and shows suggestive evidence of involvement with juvenile idiopathic arthritis in a Scandinavian panel of autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 1287-91.
132. Martínez A, Sánchez E, Valvidia A, et al. Epistatic interaction between FCRL3 and NfkappaB1 gene in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 1188-91.

133. Newman WG, Zhang Q, Liu X, et al. Rheumatoid arthritis association with the FCRL3-169C polymorphism is restricted to PTPN22 1858T-homozygous individuals in a Canadian population. *Arthritis Rheum* 2006; 54:3820-7.
134. Martínez A, Núñez C, Martín MC, et al. Epistatic interaction between FCRL3 and MHC in Spanish patients with IBD. *Tissue Antigens* 2007, 69: 313-7.
135. Lee YH, Bae SC, Song GG. TNF promoter -308A/G and -238A/G polymorphisms and juvenile idiopathic arthritis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 8497-503.
136. Sainz J, Salas-Alavarado I, López-Fernández E, et al. TNFR1 mRNA expression level and TNFR1 gene polymorphisms are predictive markers for susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010; 23: 423-36.
137. Kim S, Moon SM, Kim YS, et al. TNFR1 promoter -329G/T polymorphism results in allele-specific repression of TNFR1 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 368: 395-401.
138. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002; 296: 1634-5.
139. Harjacek M, Diaz-Cano S, De Miguel M, et al. Expression of galectins-1 and -3 correlates with defective mononuclear cell apoptosis in patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2001; 28: 1914-22.
140. Krause A, Scaletta N, Ji JD, et al. Rheumatoid arthritis synoviocyte survival is dependent on Stat3. *J Immunol* 2002; 169: 6610-6.
141. Wong ET, Tergaonkar V. Roles of NF-kappaB in health and disease:

- mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)* 2009; 116: 451-65.
142. Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CI, et al. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 35-45.
143. Orozco G, Sánchez E, Collado MD, et al. Analysis of the functional NFKB1 promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2005; 65: 183-6.
144. Gao M, Wang CH, Sima X, et al. NFKB1 -94 insertion/deletion ATTG polymorphism contributes to risk of systemic lupus erythematosus. *DNA Cell Mol* 2012; 31: 611-5.
145. McCarthy EM, Phillips JA 3er. Characterization of an intron splice enhancer that regulates alternative splicing of human GH pre-mRNA. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1491-6.
146. Hui J. Regulation of mammalian pre-mRNA splicing. *Sci China C Life Sci* 2009; 52: 253-60.
147. Seth P, Miller HB, Lasda EL, et al. Identification of an intronic splicing enhancer essential for the inclusion of FGFR2 exon IIIc. *J Biol Chem* 2008; 283: 10058-67.
148. Dieguez-Gonzalez R, Akar S, Calaza M, et al. Genetic variation in the nuclear factor kappaB pathway in relation to susceptibility to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 579-83.
149. Edenberg HJ, Xuei X, Wetherill LF, et al. Association of NFKB1, which encodes a subunit of the transcription factor NF-kappaB, with alcohol dependence. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 963-70.
150. Chang ET, Birmann BM, Kasperzyk JL, et al. Polymorphic variation in

- NFKB1 and other aspirin-related genes and risk of Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 976-86.
151. Mallik S, Majumder PP. A two-step genetic study on quantitative precursors of coronary artery disease in a homogeneous Indian population: case-control association discovery and validation by transmission-disequilibrium test. *J Biosci* 2011; 36: 857-68.
152. Cerhan JR, Liu-Mares W, Fredericksen ZS, et al. Genetic variation in tumor necrosis factor and the nuclear factor-kappaB canonical pathway and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 3161-9.
153. Rajaraman P, Brenner AV, Butler MA, et al. Common variation in genes related to innate immunity and risk of adult glioma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 1651-8.
154. Mells GF, Floyd JA, Morley KI, et al. Genome-wide association study identifies 12 new susceptibility loci for primary biliary cirrhosis. *Nat Genet* 2011; 43: 329-32.
155. Fragoso JM, Vargas Alarcón G, Jimenez Morales S, et al. El papel del factor de necrosis tumoral alfa en las enfermedades autoinmunes: Biología molecular y genética. *Gac Med Mex* 2013: En Prensa
156. Shiels MS, Engels EA, Shi J, et al. Genetic variation in innate immunity and inflammation pathways associated with lung cancer risk. *Cancer* 2012; 118: 5630-6.
157. Yamada R, Tanaka T, Unoki M, et al. Association between a single-nucleotide polymorphism in the promoter of the human interleukin-3 gene and rheumatoid arthritis in Japanese patients, and maximum-likelihood

- estimation of combinatorial effect that two genetic loci have on susceptibility to the disease. *Am J Hum Genet* 2001, 68: 674-85.
158. Fisher SA, Hampe J, Macpherson AJ, et al. Sex stratification of an inflammatory bowel disease genome search shows male-specific linkage to the HLA region of chromosome 6. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 259-65.
159. Akkad DA, Arning L, Ibrahim SM, et al. Sex specifically associated promoter polymorphism in multiple sclerosis affects interleukin 4 expression levels. *Genes Immun* 2007; 8: 703-8.
160. Ober C, Loisel DA, Gilad Y. Sex-specific genetic architecture of human disease. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 911-22.
161. Ramírez Bello J, Jiménez Morales S, Espinoza Rosales F, Gómez Vera J, Gutiérrez A, Velásquez Cruz R, et al. Juvenile rheumatoid arthritis and asthma, but not childhood-onset systemic lupus erythematosus are associated with FCRL3 polymorphisms in Mexicans. *Mol Immunol* 2013; 53: 374-8.

ANEXO I. Lista de oligos de los genes *FCRL3*, *TNFR1* y *NFKB1* para amplificar diversos fragmentos de estos genes.

<i>FCRL3</i>	<i>FCRL3</i> primer upper 5'CATATGGGAAACCCCTTCACTACC 3' <i>FCRL3</i> Primer lower 5'GAAGACACGAAAGCAATCAAGGAA 3'
<i>TNFR1</i>	+ <i>TNFR1</i> prom 1 primer forward 5'CAGCGGCAGCAGCAGGTCA3' + <i>TNFR1</i> prom 1 primer reverse 5'GGTTGGGAGTGGTCCGATTGGT 3' ⊗ <i>TNFR1</i> prom 2 primer forward 5'CCCAGATCTGGCTGCCTTGTGC 3' ⊗ <i>TNFR1</i> prom 2 primer reverse 5'CACCCAGTCAGGGCAGAAAACGAG 3' * <i>TNFR1</i> prom 3 primer upper 5'CTGTCTCCTGGGGTTCCTGTAAGG 3' * <i>TNFR1</i> prom 3 primer lower 5'GGCATCACTTTCCCCATGTAGGTG 3' ☼ <i>TNFR1</i> prom 4 primer upper 5'CCTCGTTTTCTGCCCTGACTGG 3' ☼ <i>TNFR1</i> prom 4 primer lower 5'AAACGGAGCGGACCCTCAAAAC 3' ♣ <i>TNFR1</i> expres primer forward 5'AGGCCCGGGCAGGATACG 3' ♣ <i>TNFR1</i> expres primer reverse 5'GAGGCTGCAATTGAAGCACTGGA 3'
<i>NFKB1</i>	<i>NFKB1</i> prom primer upper 5'AGGGGCTATGGACCGCATGACTCTA3' <i>NFKB1</i> prom primer lower 5'GGGTGGGGGAAGCCCGCACTT3' <i>NFKB1</i> intr I primer forward 5'CTTAAGGCCCTTGACATGCTTCCT 3' <i>NFKB1</i> intr I primer reverse 5'AGACAAAGTTTCCCTGCAAATCTGC 3'

ANEXO 2. Condiciones de PCR para generar amplicones de *TNFR1* y de secuenciación.

***TNFR1* prom 1**

- ⤴ Se procedió a emplear **3 µl de DNA genómico (20 ng/µl) de cada caso y control en una mezcla de reacción que contenía lo siguiente:

Para una mezcla de 10X para el amplicón *TNFR1* prom 1 de 472 pb.

Componente	Volumen 1X	Volumen 10X
a) Mg2Cl	2.5 µl (2.5mM)	25 µl
b) Buffer	2.5 µl (a 1X)	25 µl
c) dNTPs	0.4 µl (250mM)	4 µl
d) Primer forward+	0.2 µl (2.5mM)	2 µl
e) Primer reverse+	0.2 µl (2.5mM)	2 µl
f) DMSO	1.0 µl	25 µl
g) Agua	15.09 µl	150.9 µl
h) AmpliTaq Gold	0.11 µl (0.5 U)	1.1 µl
i) DNA**		
	-----	-----
	22 µl	220 µl

- ⤴ Ver anexo; primers

⤴

***Pre-PCR* (1 ciclo)**

- 2 min a 50°C
- 10 min a 95°C

***PCR* (35 ciclos)**

- 35 segundos a 94°C (desnaturalización del DNA)
- 30 segundos a 60°C (alineación entre primers y DNA)
- 35 segundos a 72°C (extensión del templado)

***Post-PCR* (1 ciclo)**

- 5 min a 72°C (Extensión final del templado)

b) Infinito a 4°C.

TNFR1 prom 2

- ▲ Se procedió a emplear **3 µl de DNA genómico (20 ng/µl) de cada caso y control en una mezcla de reacción que contenía lo siguiente:

Para una mezcla de 10X para el amplicón *TNFR1* prom 2 de 487 pb.

Componente	Volumen 1X	Volumen 10X
a) Mg2Cl	2.5 µl (2.5mM)	25 µl
b) Buffer	2.5 µl (a 1X)	25 µl
c) dNTPs	0.4 µl (250mM)	4 µl
d) Primer forward ^α	0.2 µl (2.5mM)	2 µl
e) Primer reverse ^α	0.2 µl (2.5mM)	2 µl
f) DMSO	1.0 µl	25 µl
g) Agua	15.09 µl	150.9 µl
h) AmpliTaq Gold	0.11 µl (0.5 U)	1.1 µl
i) DNA**		
	-----	-----
	22 µl	220 µl

^α Ver anexo; primers

Pre-PCR (1 ciclo)

- 2 min a 50°C
- 8 min a 95°C

PCR (35 ciclos)

- 35 segundos a 94°C (desnaturalización del DNA)
- 35 segundos a 60°C (alineación entre primers y DNA)
- 40 segundos a 72°C (extensión del templado)

Post-PCR (1 ciclo)

- 5 min a 72°C (Extensión final del templado)
- Infinito a 4°C.

TNFR1 prom 3

- ▲ Se procedió a emplear **3 µl de DNA genómico (20 ng/µl) de cada caso y control en una mezcla de reacción que contenía lo siguiente:

Para una mezcla de 10X para el amplicón *TNFR1* prom 3 de 403 pb.

Componente	Volumen 1X	Volumen 10X
a) Mg2Cl	2.5 µl (2.5mM)	25 µl
b) Buffer	2.5 µl (a 1X)	25 µl
c) dNTPs	0.4 µl (250mM)	4 µl
d) Primer forward*	0.4 µl (2.5mM)	2 µl
e) Primer reverse*	0.4 µl (2.5mM)	2 µl
h) Agua	15.29 µl	152.9 µl
i) AmpliTaq Gold	0.11 µl (0.5 U)	1.1 µl
j) DNA**		
	-----	-----
	22 µl	220 µl

* Ver anexo; primers

Pre-PCR (1 ciclo)

- 2 min a 50°C
- 10 min a 95°C

PCR (35 ciclos)

- 35 segundos a 94°C (desnaturalización del DNA)
- 30 segundos a 58°C (alineación entre primers y DNA)
- 35 segundos a 72°C (extensión del templado)

Post-PCR (1 ciclo)

- 5 min a 72°C (Extensión final del templado)
- Infinito a 4°C.

TNFR1 prom 4

- ▲ Se procedió a emplear **3 µl de DNA genómico (20 ng/µl) de cada caso y control en una mezcla de reacción que contenía lo siguiente:

Para una mezcla de 10X para el amplicón *TNFR1* prom 4 de 472 pb.

Componente	Volumen 1X	Volumen 10X
a) Mg2Cl	2.5 µl (2.5mM)	25 µl
b) Buffer	2.5 µl (a 1X)	25 µl
c) dNTPs	0.4 µl (250mM)	4 µl
d) Primer forward☼	0.2 µl (2.5mM)	2 µl
e) Primer reverse☼	0.2 µl (2.5mM)	2 µl
f) DMSO	1.0 µl	25 µl
g) Agua	15.09 µl	150.9 µl
h) AmpliTaq Gold	0.11 µl (0.5 U)	1.1 µl
i) DNA**		
	-----	-----
	22 µl	220 µl

+ Ver anexo; primers

Pre-PCR (1 ciclo)

- 2 min a 50°C
- 10 min a 95°C

PCR (35 ciclos)

- 35 segundos a 94°C (desnaturalización del DNA)
- 30 segundos a 60°C (alineación entre primers y DNA)
- 35 segundos a 72°C (extensión del templado)

Post-PCR (1 ciclo)

- 5 min a 72°C (Extensión final del templado)
- Infinito a 4°C.

Anexo 3. *NFKB1* prom (-94ATTG/-)

- ▲ Se procedió a emplear **3 µl de DNA genómico (20 ng/µl) de cada caso y control en una mezcla de reacción que contenía lo siguiente:

Para una mezcla de 10X para el amplicón de *NFKB1* prom ins/del -94ATTG/-de311 pb.

Componente	Volumen 1X	Volumen 10X
a) Mg2Cl	2.5 µl (2.5mM)	25 µl
b) Buffer	2.5 µl (a 1X)	25 µl
c) dNTPs	0.4 µl (250mM)	4 µl
d) Primer forward+	0.2 µl (2.5mM)	2 µl
e) Primer reverse+	0.2 µl (2.5mM)	2 µl
f) DMSO	1.0 µl	25 µl
g) Agua	15.09 µl	150.9 µl
h) AmpliTaq Gold	0.11 µl (0.5mM)	1.1 µl
i) DNA**		
	-----	-----
	22 µl	220 µl

+ Ver anexo; primers

Pre-PCR (1 ciclo)

- 2 min a 50°C
- 10 min a 95°C

PCR (35 ciclos)

- 35 segundos a 94°C (desnaturalización del DNA)
- 30 segundos a 64°C (alineación entre primers y DNA)
- 35 segundos a 72°C (extensión del templado)

Post-PCR (1 ciclo)

- 5 min a 72°C (Extensión final del templado)
- Infinito a 4°C.

Anexo 3. Reactivos

TBE10X

- > Trizma base: 108 grs.
- > Ácido bórico: 55 grs.
- > EDTA: 40 ml 0.5 M, pH 8.0

Se mezcla con un agitador magnético a temperatura ambiente y se agrega H₂O a un volumen final de 1 Lt.

TE10X

- > Trizma base
- > EDTA

Se mezcla con un agitador magnético a temperatura ambiente y se agrega H₂O a un volumen final de 1 Lt.

PBS10X

- > Fosfatos
- > Ácido bórico

Se mezcla con un agitador magnético a temperatura ambiente y se agrega H₂O a un volumen final de 1 Lt.

Bromuro de etidio

- > 100 mg de bromuro de etidio
- > 10 ml de agua destilada

Se mezcla a temperatura ambiente con un agitador magnético por varias horas hasta asegurar la total disolución.

Buffer de corrida

- > Tris-HCl 1 M pH 6,8 (0.6 ml)
- > Azul de bromofenol al 1% (1 ml)
- > Glicerol al 50% (5 ml)
- > SDS 10% (5ml)
- > 2 Mercaptoetanol 0.5 ml

Mezclar bien y colocar agua bidestilada hasta 10 ml



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Molecular Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molimm

Juvenile rheumatoid arthritis and asthma, but not childhood-onset systemic lupus erythematosus are associated with *FCRL3* polymorphisms in Mexicans[☆]

J. Ramírez-Bello^{a,b}, S. Jiménez-Morales^a, F. Espinosa-Rosales^c, J. Gómez-Vera^d, A. Gutiérrez^c,
R. Velázquez Cruz^a, V. Baca^e, L. Orozco^{a,b,*}

^a Immunogenomics laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica, SS, Mexico City, Mexico

^b Genomics Sciences Program, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Mexico City, Mexico

^c Department of Immunology, Instituto Nacional de Pediatría, SS, Mexico City, Mexico

^d Allergy Service, Hospital Regional "Lic. Adolfo López Mateos", Mexico City, Mexico

^e Department of Rheumatology, Pediatric Hospital, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 August 2012

Accepted 5 September 2012

Available online 13 October 2012

Keywords:

FCRL3 SNPs

Juvenile rheumatoid arthritis

Asthma

Systemic lupus erythematosus

Association study

ABSTRACT

A regulatory single nucleotide polymorphism located in the 5' region (−169T/C) of the *Fc receptor-like 3* (*FCRL3.3*) gene has been associated with both susceptibility and protection in immune diseases. This case-control study aimed to evaluate the association between *FCRL3* polymorphisms and juvenile rheumatoid arthritis (JRA), asthma, and childhood-onset systemic lupus erythematosus (SLE) in a Mexican population. We performed PCR-based genotyping to identify four *FCRL3* single nucleotide polymorphisms (*FCRL3.3* to *FCRL3.6*) in patients with JRA ($n = 202$), asthma ($n = 239$), or childhood-onset SLE ($n = 377$), and healthy controls ($n = 400$). The case-control analysis showed a male-gender dependent association between the *FCRL3.3C*, *FCRL3.5C*, and *FCRL3.6A* alleles and either JRA (OR = 0.57, $p = 0.003$; OR = 0.55, $p = 0.002$; OR = 0.53, $p = 0.0007$, respectively) or asthma (OR = 0.72, $p = 0.04$; OR = 0.74, $p = 0.05$; OR = 0.70, $p = 0.02$, respectively). As expected, minor alleles of these SNPs with the CGCA haplotype were also significantly associated with JRA (OR = 0.35, $p = 0.00005$) and asthma (OR = 0.61, $p = 0.007$). We found no association between *FCRL3* SNPs or haplotypes and childhood-onset SLE. These results supported the notion that *FCRL3* is involved in the etiology of several immune diseases. Our results also suggested that SNPs located in the *FCRL3* gene were protective against JRA and asthma in male Mexican patients.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Immune disorders involve complex etiologies, but many have a strong genetic component in their pathogenesis (Becker et al., 1998; Phelan et al., 2006; Moser et al., 2009; Lee et al., 2011). Genome-wide linkage studies have identified a group of genetic factors that are shared among many autoimmune and other immune-mediated diseases (Becker et al., 1998; Lee et al., 2011). One of the regions implicated in susceptibility to multiple autoimmune diseases is the cytoband 1q21–23. This region harbors the *FcγR* II/III and *Fc* receptor-like family genes (*FCRL1* through *FCRL5*) (Davis et al., 2001). The ligands and function of

the FCRLs remain unknown; however, some studies have suggested that FCRL proteins may contribute to the pathogenesis of chronic immune diseases, because they affect B-Cell receptor-mediated signaling, growth, and proliferation (Ehrhardt et al., 2003, 2007; Leu et al., 2005; Kochi et al., 2009). Several association studies have supported the hypothesis that FCRLs play an important role in immune-mediated pathologies, either as risk or protection factors (Kochi et al., 2005; WTCCC, 2007; Owen et al., 2007; Martínez, 2007; Matesanz et al., 2008; Chen et al., 2011). Furthermore, meta-analysis studies have shown that the *FCRL3.3C* allele was a significant risk factor for rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE) in Asians, but not in Caucasians (Lee et al., 2010; Mao et al., 2010). On the other hand, *FCRL3* SNPs have been reported to have a protective effect against autoimmune thyroid disease (AITD), Addison's disease (AAD) and multiple sclerosis (MS) (WTCCC, 2007; Owen et al., 2007; Martínez, 2007; Matesanz et al., 2008). These findings have suggested that FCRLs have differential effects on different populations.

We investigated whether *FCRL3* SNPs were associated with juvenile rheumatoid arthritis (JRA), asthma, and childhood-onset SLE in Mexican pediatric patients.

[☆] This study was submitted in partial fulfillment of the PhD requirements for RBJ at Posgraduate in Genomics Sciences, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Mexico City, Mexico.

* Corresponding author at: Immunogenomics laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica, SS, Periférico Sur No. 4124, Torre Zafiro II, Piso 6 Col. Ex Rancho de Anzaldo, Álvaro Obregón, Mexico City, Mexico. Tel.: +52 55 5350 1957; fax: +52 55 5350 1968.

E-mail address: lorozco@inmegen.gob.mx (L. Orozco).

2. Patients and methods

2.1. Study subjects for genetic analysis

This study included 818 patients with JRA ($n=202$), asthma ($n=239$), or SLE ($n=377$). All cases were under 16 years of age and were recruited from five tertiary level Institutions in Mexico City. The diagnosis of asthma was based on criteria published by the American Thoracic Society and the Global Initiative for Asthma. The diagnosis of JRA and SLE were based on criteria published by the American College of Rheumatology. We also included 400 unrelated, healthy control subjects, ethnically matched to the patients, with no history of autoimmune or inflammatory diseases. No previous studies have shown a correlation between the *FCRL3* alleles and age; therefore, the controls were older than 18 years of age. Additionally, allelic frequencies of *FCRL3* polymorphisms were not different between genders; therefore, we used the same control group for all analyses. Patients and controls were descended from parents and grandparents born in Mexico. Ethics and Research Committee approvals were obtained from all participating Institutions, and informed consent was obtained from each individual. Parents provided consent for child participation, and all children assented.

2.2. Analysis of genetic polymorphisms

We obtained genomic DNA from peripheral blood leukocytes with a standard salt precipitation technique (QIAGEN Systems, Inc., Valencia, CA, USA). Ethnic matching between cases and controls was previously evaluated with a panel of 10 ancestry informative markers (AIMs: rs4884, rs2695, rs17203, rs2862, rs3340, rs722098, rs203096, rs223830, rs1800498, and rs281478) (Jiménez-Morales et al., 2009). These AIMs mainly identify Amerindian and European ancestry in Mexican population. We performed genotyping to reveal *FCRL3.3* (−169T/C or rs7528684), *FCRL3.4* (−110G/A or rs11264799), *FCRL3.5* (+358G/C or rs945635), and *FCRL3.6* (+1381G/A or rs3761959) polymorphisms. The PCR assay used to identify these four SNPs was performed with TaqMan MGB chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Each PCR reaction contained 10 ng of DNA, 2.5 μl of TaqMan Master Mix, 0.065 μl of 40× assay mixture, and 2.435 μl of distilled, DNase free water in a final volume of 5 μl. The amplification protocol included denaturing at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturing at 95°C for 15 s and annealing and extension at 60°C for 1 min. Genotypes were assigned by detecting allele-specific fluorescence with SDS 2.2.3 software for allelic discrimination (Applied Biosystems, Foster City, CA). The overall genotype call rate was 99.9%, and 30% of randomized samples showed 100% reproducibility in duplicate assays for the four polymorphisms. Genotyping accuracy was confirmed by direct sequencing of PCR products in 50 randomly chosen samples. The PCR products were sequenced directly with a DNA Sequencing Kit and the Big Dye Terminator on an automated ABI PRISM 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primer sequences used to recognize the *FCRL3* were 5'-GAAGACACGAAAGCAATCAAGGAA-3' and 5'-CATATGGGAAACCCCTTCACTACC-3'. PCR was performed in a 50 μl reaction mixture that contained 60 ng of genomic DNA, 2.5 mM MgCl₂, 1.25 units of AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), 2.5 mM of each primer, 250 mM dNTPs mixed (Takara), and 1X PCR buffer (Applied Biosystems). The amplification protocol included denaturing at 95°C for 10 min, followed by 35 cycles of denaturing at 94°C for 30 s, annealing at 58°C for 30 s, and extending at 72°C for 35 s; with a final extension at 72°C for 5 min.

3. Statistical analysis

The FINETTI program (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) was used to test for Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) in genotype distributions for the cases and controls. Association between *FCRL3* SNPs and the three diseases were analyzed with χ^2 tests on 2×2 and 2×3 contingency tables for allele and genotype frequencies, respectively. Statistical analysis was performed with a standard statistical package (Epic Info 2005 V.3.2; Centers of Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). Odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (95% CI) were calculated with the same software. Haplotype frequencies and linkage disequilibrium (LD; r^2) were calculated with the Haploview software (Barrett et al., 2005). The p -value was corrected by applying a permutation test based on 100,000 permutations. The ADMIXMAP program (McKeigue et al., 2000; Hoggart et al., 2003) was used to test the possible effect of population stratification, as described previously (Bonilla et al., 2004; Choudhry et al., 2006), in the two primary parental populations of the Mexican–Mestizo (Amerindian and European).

4. Results

The mean (\pm SD) age at onset of JRA, asthma, and SLE were 8.7 ± 2.46 , 8.4 ± 2.8 , and 11.62 ± 2.46 years, respectively. The female/male gender distribution was 115/87 (57/43%) for JRA, 92/147 (38/62%) for asthma, and 312/65 (83/17%) for SLE. The control population comprised 200 (50%) females and 200 (50%) males. We used the same control group for all analyses, because no differences between genders were found in the allele frequencies of *FCRL3.3*, *FCRL3.4*, *FCRL3.5*, and *FCRL3.6* SNPs. Genotype distributions of polymorphisms were in HWE for both cases and controls. The AIM distributions were not significantly different between cases and controls.

When the JRA, asthma, and childhood-onset SLE cohorts were compared to controls, only the JRA population exhibited significant differences, and only in the *FCRL3.3* and *FCRL3.6* minor allele frequencies (MAF) ($p=0.03$ and $p=0.01$, respectively). After gender stratification, the *FCRL3.5C* allele exhibited a male gender-dependent association with JRA. The *FCRL3.3C*, *FCRL3.5C*, and *FCRL3.6A* allele frequencies were higher in the control group than in the JRA group (OR=0.57, 95% CI 0.40–0.83, $p=0.003$; OR=0.55, 95% CI 0.38–0.80, $p=0.002$; and OR=0.53, 95% CI 0.36–0.76, $p=0.0007$, respectively). Similarly, the same alleles were higher in the control group than in the asthma group (OR=0.72, 95% CI 0.54–0.98, $p=0.04$; OR=0.74, 95% CI 0.55–1.00, $p=0.05$; and OR=0.70, 95% CI 0.52–0.95, $p=0.02$, respectively). Homozygosity for the *FCRL3.3C* minor allele conferred higher protection from JRA (OR=0.38, 95% CI 0.18–0.78, $p=0.007$) and asthma (OR=0.54, 95% CI 0.29–0.99, $p=0.05$) compared to the other genotypes. However, after applying the Bonferroni correction test, statistical significance persisted only for homozygous *FCRL3.3C* protection against JRA (Table 1).

On the other hand, the haplotype analysis showed that *FcRL3.3*, *FcRL3.5*, and *FcRL3.6* were in high LD, but not *FcRL3.4* (pair-wise r^2 values > 0.9) (Fig. 1). We identified a total of four haplotypes with frequencies > 0.01 (Table 2). The haplotype CGCA, which carried the three minor alleles, *FcRL3.3C*, *5C*, and *6A*, and the major allele, *FcRL3.4G*, showed male gender-dependent protection to JRA and asthma (OR=0.35, 95% CI 0.20–0.60, $p=0.00005$; OR=0.61, 95% CI 0.41–0.89, $p=0.007$, respectively). This significant association between the CGCA haplotype and protection from both diseases remained after 100,000 permutations.

A comparative analysis between healthy individuals from different populations showed that the frequency of the *FCRL3.3C* allele was higher in Mexicans (49.7%) than in Japanese (37%) and

Table 1
Allele and genotype distributions of the four *FCRL3* SNPs in males with JRA, asthma and childhood-onset SLE.

SNP ID	Population	Allele 1,2	Genotype						Genotypes			Alleles		P	
			n (%)		OR		95% CI	P	n (%)	OR	95% CI				
			1,1	1,2	2,2	11 vs. (12+2,2)						1	2		
FCRL3_3 (rs7528684)	Controls	T C	50(25.0)	101(50.5)	49(24.5)				201(50.3)	199(49.7)					
	JRA		38(43.7)	35(40.2)	14(16.1)	0.43	(0.25–0.73)	0.002 ^a	111(63.8)	63(36.2)	0.57	(0.40–0.88)	0.003 ^a		
	Asthma		51(34.9)	68(46.6)	27(18.5)	0.62	(0.39–0.99)	0.04	170(58.2)	122(42.8)	0.72	(0.54–0.98)	0.04		
FCRL3_4 (rs11264799)	Controls	G A	15(23.1)	43(66.2)	7(10.7)	1.11	(0.57–2.15)	0.75	73(56.2)	57(43.8)	0.79	(0.53–1.17)	0.24		
	JRA		119(59.5)	73(36.5)	8(4.0)	1.14	(0.69–1.90)	0.61	311(77.8)	89(22.2)	1.08	(0.71–1.64)	0.73		
	Asthma		49(56.3)	35(40.2)	3(3.5)	0.88	(0.57–1.36)	0.56	133(76.4)	41(23.6)	0.95	(0.66–1.37)	0.80		
FCRL3_5 (rs945635)	Controls	G C	40(62.5)	21(32.8)	3(4.7)	0.88	(0.49–1.57)	0.67	101(78.9)	27(21.1)	0.93	(0.58–1.52)	0.78		
	JRA		53(26.5)	59(49.5)	48(24.0)	0.44	(0.26–0.76)	0.002 ^a	205(51.3)	195(48.7)	0.55	(0.38–0.80)	0.002 ^a		
	Asthma		39(44.8)	36(41.4)	12(13.8)	0.66	(0.41–1.05)	0.08	114(65.5)	60(34.5)	0.74	(0.55–1.00)	0.05		
FCRL3_6 (rs3761959)	Controls	G A	14(21.5)	42(64.6)	9(13.9)	1.31	(0.67–2.57)	0.42	70(53.8)	60(46.2)	0.90	(0.61–1.34)	0.61		
	JRA		50(25.0)	103(51.5)	47(23.5)	0.41	(0.24–0.70)	0.0008 ^a	203(50.8)	197(49.2)	0.53	(0.36–0.76)	0.0007 ^a		
	Asthma		39(44.8)	37(42.5)	11(12.7)	0.59	(0.37–0.93)	0.02	115(66.1)	59(33.9)	0.70	(0.52–0.95)	0.02		
	SLE		53(36.3)	68(46.6)	25(17.1)	1.02	(0.53–1.95)	0.95	174(56.6)	118(40.4)	0.78	(0.52–1.16)	0.22		
			16(24.6)	42(64.6)	7(10.8)			74(56.9)	56(43.1)						

OR: odds ratio; CI: confidence interval; p: p value.

^a Statistical significance after Bonferroni correction test.

Brazilian (36.8%) populations ($p < 1 \times 10^{-4}$) (Kochi et al., 2005; Teles et al., 2011), but similar to those reported for Caucasian populations (Martínez, 2007; Hu et al., 2006) (44.8–48%). The *FCRL3_5C* and *FCRL3_6C* frequencies reported here were also different than those reported for other populations, including Chinese and Dutch (Thabet et al., 2007; Li et al., 2008).

5. Discussion

The complete etiology of immune-mediated diseases has not been clarified. One of the most important loci for susceptibility to immune diseases is at the 1q21–q23 chromosome, which harbors the *FCRL3* gene. Several studies have suggested that the *FCRL3* exhibited a complex pattern of association with immune diseases, because it appeared to be either a risk (RA and SLE), protective (AITD, AAD, and MS) or modifier factor. In particular, in a Taiwanese population the *FCRL3_3C* allele, was associated with a protective effect against the development of specific phenotypes, like SLE leucopenia, but it was also related with RA disease severity (Chen et al., 2011).

In this case-control study, which included patients with SLE, JRA, and asthma, we found that *FCRL3_3C*, *FCRL3_5C*, and *FCRL3_6A*, but not *FCRL3_4G* alleles, were significantly associated with protection to JRA and asthma in males, although this last did not remain after Bonferroni correction. It is known that *FCRL3_3C* is a functional variant that promotes the *FCRL3* mRNA transcription (Kochi et al., 2005). This functional variant was in LD with the *FCRL3_5C* and *FCRL3_6A* alleles; thus, as expected, the haplotype that carried these three alleles (CCA) was also significantly associated with protection to JRA and asthma in males.

These data suggested that *FCRL3* SNPs conferred protection against both diseases in a gender-dependent manner (Table 1). Gender-dependent associations are frequently found in immune pathologies. In a previous study, we documented an association between *TNF α* SNPs and JRA and asthma in females (Jiménez-Morales et al., 2009). This phenomenon was also reported for several other immune entities, including MS, RA, asthma (*IL4*, *IL13*, and *COX-2* SNPs), and inflammatory bowel disease (HLA SNPs) (Yamada et al., 2001; Fisher et al., 2002; Szczeklik et al., 2004; Akkad et al., 2007).

Some studies have suggested that a common pathogenic mechanism may exist between immune diseases; for example, the presence of autoantibodies is characteristic of autoimmune diseases, but these have also been identified in patients with non-allergic asthma (Hahm et al., 2002; Yim et al., 2006; Kwon et al., 2009).

In this study, we found no association between *FCRL3* and childhood-onset SLE, as has been reported to European-derived populations and some Asian-descendant groups. (Matesanz et al., 2008; Mao et al., 2010; Choi et al., 2006; You et al., 2008)

Controversial findings in association studies involving the same allele in different populations might be explained by the following: (1) a dual function of the protein since *FCRL3* contains both immunoreceptor tyrosine-based activation and inhibition motifs; (2) the susceptibility allele may lie within a LD block that could be different among populations; (3) interactions between this allele and other genetic or environmental factors, as in Canadian and Spanish populations, where it was shown that interactions between *FCRL3_3* and (*PTPN22*), *-94ATTG/- (NFKappa1)*, or *HLA-DRB1*0103* increased the risk for Grave's disease, RA, or inflammatory bowel disease, respectively (Newman et al., 2006; Martínez et al., 2006, 2007); and (4) variations with an ethnic-specific effect (Kochi et al., 2010), in fact, our population exhibited the highest frequency of *FCRL3_3C*.

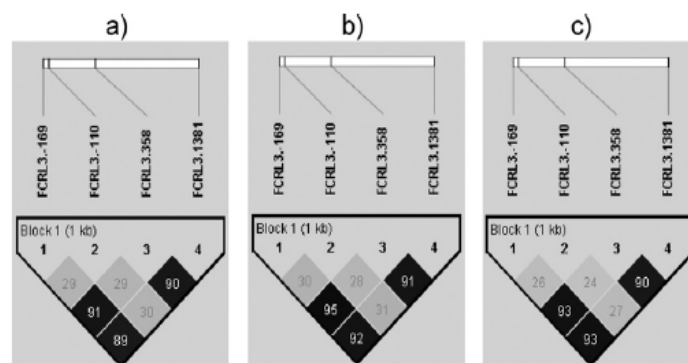


Fig. 1. Location and pair-wise linkage disequilibrium values of four FCRL3 SNPs in Mexican pediatric patients. Values of the pair-wise (r^2) are shown to JRA (a), asthma (b) and SLE (c).

Table 2
FCRL3 haplotypes structure and frequencies in male groups of patients and controls.

Pathology	Haplotype FCRL3.3, 4, 5, 6	Frequency		OR	95% CI	p
		Cases	Control (n=200)			
JRA (n=87)	TGGG	0.62	0.48	1.78	(1.21–2.60)	0.005 ^a
	CACA	0.21	0.20	1.06	(0.66–1.68)	1.00
	CGCA	0.12	0.28	0.35	(0.20–0.60)	0.00005 ^a
Asthma (n=147)	TAGG	0.02	0.02	0.99	(0.20–4.32)	1.00
	TGGG	0.58	0.48	1.48	(1.08–2.03)	0.01 ^a
	CACA	0.21	0.20	1.07	(0.73–1.58)	1.00
SLEp (n=65)	CGCA	0.19	0.28	0.61	(0.41–0.89)	0.007 ^a
	TGGG	0.53	0.48	1.21	(0.80–1.84)	0.81
	CACA	0.19	0.20	0.95	(0.56–1.61)	1.00
	CGCA	0.23	0.28	0.78	(0.48–1.27)	0.86
	TAGG	0.01	0.02	0.77	(0.11–3.95)	1.00

OR: odds ratio; CI: confidence interval.
^a Statistical significance after 100,000 permutation.

Other genes and cohorts should be genotyped in the future to investigate differences in the effects of FCRL3 variants on immune diseases among different populations.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We would like to thank the patients and their parents for their collaboration in this project. This study was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT: SALUD-2006-1-14238 and -2011-1-161936). JRB gratefuls Universidad Autónoma de la Ciudad de México for the scholarship.

References

Akkad, D.A., Arming, L., Ibrahim, S.M., Epplen, J.T., 2007. Sex specifically associated promoter polymorphism in multiple sclerosis affects interleukin 4 expression levels. *Genes Immunology* 8, 703–706.
 Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J., 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21, 263–265.
 Becker, K.G., Simon, R.M., Bailey-Wilson, J.E., Freidlin, B., Biddison, W.E., McFarland, H.F., et al., 1998. Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9979–9984.
 Bonilla, C., Parra, E.J., Pfaff, C.L., Dios, S., Marshall, J.A., Hamman, R.F., et al., 2004. Admixture in the Hispanics of the San Luis Valley, Colorado, and its implications for complex trait gene mapping. *Annals of Human Genetics* 68, 139–153.

Chen, J.Y., Wang, C.M., Wu, Y.J., Kuo, S.N., Shiu, C.F., Chang, S.W., et al., 2011. Disease phenotype and gender association of FCRL3 single-nucleotide polymorphism –169T/C in Taiwanese patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 38, 264–270.
 Choi, C.B., Kang, C.P., Seong, S.S., Bae, S.C., The, Kang, C., 2006. –169C/T polymorphism in FCRL3 is not associated with susceptibility to rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematosus in a case-control study of Koreans. *Arthritis and Rheumatism* 54, 3838–3841.
 Choudhry, S., Coyle, N.E., Tang, H., Salari, K., Lind, D., Clark, S.L., et al., 2006. Population stratification confounds genetic association studies among Latinos. *Human Genetics* 118, 652–664.
 Davis, R.S., Wang, Y.H., Kubagawa, H., Cooper, M.D., 2001. Identification of a family of Fc receptor homologs with preferential B cell expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9772–9777.
 Ehrhardt, G.R., Leu, C.M., Zhang, S., Aksu, G., Jackson, T., Haga, C., et al., 2007. Fc receptor-like proteins (FCRL): immunomodulators of B cell function. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 596, 155–162.
 Ehrhardt, G.R., Davis, R.S., Hsu, J.T., Leu, C.M., Ehrhardt, A., Cooper, M.D., 2003. The inhibitory potential of Fc receptor homolog 4 on memory B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13489–13494.
 Fisher, S.A., Hampe, J., Macpherson, A.J., Forbes, A., Lennard-Jones, J.E., Schreiber, S., et al., 2002. Sex stratification of an inflammatory bowel disease genome search shows male-specific linkage to the HLA region of chromosome 6. *European Journal of Human Genetics* 10, 259–265.
 Hahn, D.H., Lee, Y.E., Yim, E.J., Park, H.S., Yim, H., Kang, Y., et al., 2002. Identification of cytokeratin 18 as a bronchial epithelial autoantigen associated with non-allergic asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165, 1536–1539.
 Hoggart, C.J., Parra, E.J., Shriver, M.D., Bonilla, C., Kittles, R.A., Clayton, D.G., et al., 2003. Control of confounding of genetic association in stratified populations. *American Journal of Human Genetics* 72, 1492–1504.
 Hu, X., Chang, M., Saiki, R.K., Cargill, M.A., Begovich, A.B., Ardlie, K.G., et al., 2006. The functional –169T/C single-nucleotide polymorphism in FCRL3 is not associated with rheumatoid arthritis in white North Americans. *Arthritis and Rheumatism* 54, 1022–1025.

- Jiménez-Morales, S., Velázquez-Cruz, R., Ramírez-Bello, J., Bonilla-González, E., Romero-Hidalgo, S., Escamilla-Guerrero, G., et al., 2009. Tumor necrosis factor- α is a common genetic risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population. *Human Immunology* 70, 251–256.
- Kochi, Y., Yamada, R., Suzuki, A., Harley, J.B., Shirasawa, S., Sawada, T., et al., 2005. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nature Genetics* 37, 478–485.
- Kochi, Y., Myouzen, K., Yamada, R., Suzuki, A., Kurosaki, T., Nakamura, Y., et al., 2009. FCRL3, an autoimmune susceptibility gene, has inhibitory potential on B-cell receptor-mediated signaling. *Journal of Immunology* 183, 5502–5510.
- Kochi, Y., Suzuki, A., Yamada, R., Yamamoto, K., 2010. Ethnogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis-implications for pathogenesis. *Nature Reviews Rheumatology* 6, 290–295.
- Kwon, B., Lee, H.A., Choi, G.S., Ye, Y.M., Nahm, D.H., Park, H.S., 2009. IgG antibody-induced cytotoxicity against airway epithelial cells in patients with nonallergic asthma. *Journal of Clinical Immunology* 29, 517–523.
- Lee, Y.H., Woo, J.H., Choi, S.J., Ji, J.D., Song, G.G., 2010. Fc receptor-like 3–169C/T polymorphism and RA susceptibility: a meta-analysis. *Rheumatology International* 30, 947–953.
- Lee, S.H., Park, J.S., Park, C.S., 2011. The search for genetic variants and epigenetics related to asthma. *Allergy, Asthma and Immunology Research* 3, 236–244.
- Leu, C.M., Davis, R.S., Gartland, L.A., Fine, W.D., Cooper, M.D., 2005. FcRH1: an activation coreceptor on human B cells. *Blood* 105, 1121–1126.
- Li, K., Zhao, M., Hou, S., Du, L., Kijlstra, A., Yang, P., 2008. Association between polymorphisms of FCRL3, a non-HLA gene, and Behçet's disease in a Chinese population with ophthalmic manifestations. *Molecular Vision* 14, 2136–2142.
- Mao, C., Pan, H., Chen, Q., Wang, X., Ye, D., Qiu, L., 2010. Association between Fc receptor-like 3 C169T polymorphism and risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Molecular Biology Reports* 37, 191–196.
- Martínez, A., Mas, A., de las Heras, V., Bartolomé, M., Arroyo, R., Fernández-Arquero, M., et al., 2007. FCRL3 and multiple sclerosis pathogenesis: role in autoimmunity? *Journal of Neuroimmunology* 189, 132–136.
- Martínez, A., Sánchez, E., Valvidia, A., Orozco, G., López-Nevot, M.A., Pascual-Salcedo, D., et al., 2006. Epistatic interaction between FCRL3 and NFKB1 genes in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 65, 1188–1191.
- Martínez, A., Nuñez, C., Martín, M.C., Mendoza, J.L., Taxonera, C., Díaz-Rubio, M., et al., 2007. Epistatic interaction between FCRL3 and MHC in Spanish patients with IDB. *Tissue Antigens* 69, 313–317.
- Matesanz, F., Fernández, O., Milne, R.L., Fedetz, M., Leyva, L., Guerrero, M., et al., 2008. The high producer variant of the Fc-receptor like-3 (FCRL3) gene is involved in protection against multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 195, 146–150.
- McKeigue, P.M., Carpenter, J.R., Parra, E.J., Shriver, M.D., 2000. Estimation of admixture and detection of linkage in admixture populations by a Bayesian approach: application to African-American populations. *Annals of Human Genetics* 64, 171–186.
- Moser, K.L., Kelly, J.A., Lessard, C.J., Harley, J.B., 2009. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes and Immunity* 10, 373–379.
- Newman, W.G., Zhang, Q., Liu, X., Walker, E., Ternan, H., Owen, J., et al., 2006. Rheumatoid arthritis association with the FCRL3 –169C polymorphism is restricted to PTPN22 1858T-homozygous individuals in a Canadian population. *Arthritis and Rheumatism* 54, 3820–3827.
- Owen, C.J., Kelly, H., Eden, J.A., Merriman, M.E., Pearce, S.H., Merriman, T.R., 2007. Analysis of the Fc receptor-like-3 (FCRL3) locus in Caucasians with autoimmune disorders suggests a complex pattern of disease association. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92, 1106–1111.
- Phelan, J.D., Thompson, S.D., Glass, D.N., 2006. Susceptibility to JRA/JIA: complementing general autoimmune and arthritis traits. *Genes and Immunity* 7, 1–10.
- Szczeklik, W., Sanak, M., Szczeklik, A., 2004. Functional effects and gender association of COX-2 gene polymorphism G-765C in bronchial asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 114, 248–253.
- Teles, J.S., Bianco, B., Vilarino, F.L., André, G.M., Christofilini, D.M., Barbosa, C.P., 2011. Association of FCRL3 C-169 T promoter single-nucleotide polymorphism with idiopathic infertility and infertility-related endometriosis. *Journal of Reproductive Immunology* 89, 212–215.
- Thabet, M.M., Wesoly, J., Slagboom, P.E., Toes, R.E., Huizinga, T.W., 2007. FCRL3 promoter 169CC homozygosity is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in Dutch Caucasians. *Annals of the Rheumatic Diseases* 66, 803–806.
- Welcome Trust Case Control Consortium, Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC), Burton, P.R., Clayton, D.G., Cardon, L.R., Craddock, N., Deloukas, P., Duncanson, A., et al., 2007. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nature Genetics* 39, 1329–1337.
- Yamada, R., Tanaka, T., Unoki, M., Nagai, T., Sawada, T., Ohnishi, Y., et al., 2001. Association between a single-nucleotide polymorphism in the promoter of human interleukin-3 gene and rheumatoid arthritis in Japanese patients, and maximum-likelihood estimation of combinatorial effect that two genetic loci have on susceptibility to the disease. *The American Journal of Human Genetics* 68, 674–685.
- Yim, H., Kim, J.E., Shin, J.Y., Ye, Y.M., Park, H.S., Nahm, D.H., 2006. Antigen-binding characteristics of circulating IgG autoantibodies to cytokeratin 18 protein in patients with nonallergic asthma. *Journal of Korean Medical Science* 21, 652–655.
- You, Y., Wang, Z., Deng, G., Hao, F., 2008. Lack of association between Fc receptor-like 3 gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus in Chinese population. *Journal of Dermatological Science* 52, 118–122.