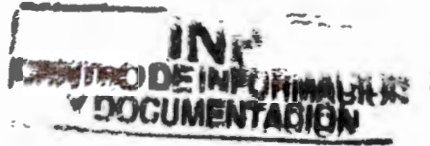


Facultad de Medicina



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

**SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA
PROTEÍNA C REACTIVA (CRP) EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LUPUS
ERITEMATOSO SISTÉMICO**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTA:

DR. OSVALDO ZARCO CID DEL PRADO

TESIS PARA OBTENER EL DIPLOMA DE SUBESPECIALIDAD

EN ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA PEDIÁTRICA

DR. FRANCISCO JAVIER ESPINOSA ROSALES

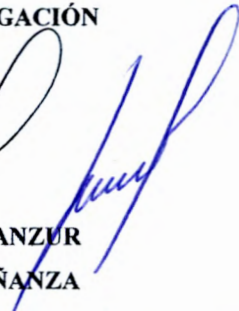

TUTOR DE TESIS

MÉXICO, D.F.



2009

**ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA
PROTEÍNA C REACTIVA (CRP) EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LUPUS
ERITEMATOSO SISTÉMICO**


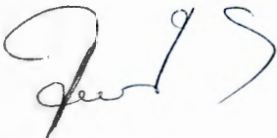
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN





**DR. JOSÉ REYNES MANZUR
DIRECTOR DE ENSEÑANZA**



**DRA. MIRELLA VAZQUEZ RIVERA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO**



**DR. JOSÉ GUADALUPE HUERTA LOPEZ
PROFESOR TITULAR DEL CURSO**



**DR. FRANCISCO JAVIER ESPINOSA ROSALES
SUBDIRECTOR DE INVESTIGACIÓN MÉDICA
TUTOR DE TESIS**



Título.

ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA PROTEÍNA C REACTIVA (CRP) EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

Autores.

Dr. Francisco Espinosa Rosales.	Investigador responsable
Dr. Rafael Velázquez Cruz	Colaborador
Dra. Lorena Orozco Orozco	Colaborador
Dr. Osvaldo Zarco Cid del Prado	Tesista, Subespecialidad en Alergia e Inmunología

Agradecimientos:

A mi esposa Miriam, quien ha sido un constante apoyo y vínculo de amor en todo lo logrado por mi persona. A mis hijos, queriendo yo ser un ejemplo a seguir para ellos y esperando que sea superado por ellos.

Al Dr. Francisco J. Espinosa Rosales, por la confianza depositada en mí para este proyecto y en mi formación académica, Dr. José G. Huerta López, por lo aprendido no solo de la Alergia sino por la enseñanza de una forma de vida, Dr. Vicente Baca, por el apoyo logístico del proyecto, Dra. Lorena Orozco, por el apoyo del personal a su digno cargo y por las facilidades brindadas, Dr. Rafael Velázquez Cruz y Q.F.B. Humberto García Ortiz, por trabajar en equipo en la recolección y en el procesamiento de las muestras. Al Instituto Nacional de Pediatría por pulir mis conocimientos en Pediatría y por formar parte de una gran Institución a nivel internacional en mi formación como subespecialista.

RESUMEN

ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA PROTEÍNA C REACTIVA (CRP) EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

Espinosa - Rosales J. Francisco, Zarco - Cid del Prado Osvaldo, Orozco Lorena, Velázquez - Cruz Rafael.

Introducción: El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune sistémica, caracterizada por la producción de autoanticuerpos, activación del complemento, formación de complejos inmunes, daño tisular y afección de diversos órganos.

Aproximadamente el 20% de los casos de LES se presentan en la edad pediátrica. Los síntomas clínicos y los hallazgos inmunológicos en pacientes con LES pediátrico son similares a los observados en pacientes adultos, sin embargo el lupus de inicio temprano tiende a ser más severo al inicio de la enfermedad y tiene un curso clínico más agresivo. Ahora se sabe, que el LES surge de la interacción de factores hormonales, ambientales y genéticos. Mediante estudios del genoma completo se han identificado 8 regiones que muestran ligamiento significativo con LES y que han sido replicados independientemente, entre éstas se encuentra la región 1q21.3 y dentro de esta región se encuentra el gen que codifica para la proteína C- reactiva (CRP). La proteína C reactiva participa en procesos inflamatorios y los niveles séricos de esta molécula es uno de los principales medidores de la actividad de la enfermedad.

Objetivo: Determinar si polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en el gen *CRP*, se encuentran asociados a la susceptibilidad para desarrollar LES, en pacientes pediátricos mexicanos.

Diseño: Estudio de casos y controles, transversal, prospectivo y comparativo.

Material y métodos: Se realizó un estudio de casos-contróles en 295 pacientes con diagnóstico de LES de inicio temprano y 431 controles sanos no relacionados. Se genotipificaron un total de 6 SNPs presentes en el gen *CRP* mediante el método de 5' exonucleasa (Taqman). El estudio de asociación se realizó mediante la aplicación de la prueba de Chi cuadrada.

Resultados: El análisis de los SNPs en el gen *CRP* sugiere que el alelo T del SNP rs1205 (C/T) se encuentra asociado con la susceptibilidad a desarrollar LES ($P=0.0398$, $OR=1.25$ $IC=1.01-1.56$), en la población pediátrica mexicana. Por otro lado, se correlacionaron los SNPs con el riesgo a desarrollar nefritis en el grupo de pacientes. El alelo T del SNP rs1130864 (C/T) mostró una asociación con el riesgo a desarrollar nefritis en el grupo de pacientes ($P=0.043$, $OR=1.48$ $IC=1.01-2.16$); aunado a que el alelo T del SNP rs1417938 (A/T) también mostró asociación con el riesgo a desarrollar nefritis ($P=0.02$, $OR=1.6$ $IC=1.07-2.3$). Es importante mencionar, que la asociación observada en ambos SNPs se debe al fuerte desequilibrio de ligamiento (LD) que existe entre ellos ($r^2=95$).

Conclusiones: El alelo T del SNP rs1205 se encuentra asociado con el riesgo a desarrollar LES en la población pediátrica mexicana a diferencia de lo observado en la población caucásica. Un análisis adicional basado en familias podría revelar el papel exacto de estos polimorfismos con la susceptibilidad del LES en nuestra población.

INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades autoinmunes (EAs) son un serio problema de salud pública al afectar alrededor de 4-5% de la población general ^[1], estos síndromes complejos de evolución crónica, comprenden un grupo heterogéneo de trastornos, el prototipo de estas enfermedades es el Lupus Eritematoso Sistémico (LES), el cual se caracteriza por la producción de autoanticuerpos dirigidos contra componentes nucleares y celulares, los cuales se presentan en individuos susceptibles, en donde existe una alteración en la homeostasis de los linfocitos y una pérdida en la tolerancia periférica, aunado a defectos en la depuración de cuerpos apoptóticos. Esta enfermedad se caracteriza por la formación y depósito de complejos inmunes; además de los factores genéticos involucrados en esta patología, debemos tomar en cuenta que debido a que el LES es una enfermedad compleja existe la participación de factores ambientales, que en combinación con defectos en mecanismos hormonales e inmunitarios contribuyen al desarrollo de ésta ^[2]. El pronóstico de pacientes con LES continúa siendo grave, sin embargo en la última década ha mejorado notablemente. El inicio de LES en la edad pediátrica es de un curso clínico más grave y de pronóstico más reservado que el LES en la población adulta, afectando además aspectos psicosociales y del entorno familiar, como los relacionados con la apariencia física y el retraso en el crecimiento ^[3].

ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

EPIDEMIOLOGÍA

El Lupus Eritematoso Sistémico se presenta a cualquier edad pero la mayoría de los pacientes afectados se encuentran comprendidos entre los 10 y los 50 años, mostrando una mayor incidencia entre los 20 y los 40 años. Esta enfermedad afecta principalmente al sexo femenino (>90%) y se ha documentado la presencia de antecedentes familiares en el 5% de los adultos y en el 25% de los niños ^[2]. En otro estudio se observó que afecta principalmente a mujeres en edad reproductiva con un ratio de 9 mujeres afectadas por cada varón (9:1) ^[4].

Aproximadamente entre el 15-20% de todos los casos de LES son diagnosticados en edad pediátrica y tiene una prevalencia de 0.36-0.6 casos por cada 100,000 individuos (datos de población estadounidense) ^[5]. Como ha sido reportado para adultos el grupo étnico influye en la incidencia y en las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Los

niños hispanos tienen un curso más severo de la enfermedad, además de presentar una alta incidencia de daño renal comparado con niños caucásicos. En niños de raza negra se ha reportado una alta prevalencia y severidad de enfermedad renal y neuro-psiquiátrica (NPSLE) [6].

MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

Aunque la presentación, los síntomas clínicos y los hallazgos inmunológicos en pacientes con LES pediátrico son similares a los observados en pacientes adultos, el lupus de inicio temprano tiende a ser más severo al inicio de la enfermedad y tiene un curso clínico más agresivo [7, 12]. Además de presentar un mayor involucro de órganos que en el Lupus de adultos [8,9].

Se han descrito diferencia en la forma de muerte entre ambos grupos; mientras que los adultos generalmente mueren por complicaciones de la enfermedad tales como infecciones, falla renal ó infarto al miocardio, los niños mueren durante la fase aguda de la enfermedad [10].

Manifestaciones Cutáneas

La afectación cutánea es variada, y va desde un eritema malar en forma de alas de mariposa (60%), dermatitis generalizada, úlceras bucales (26-48%), fotosensibilidad (16-50%) la cual implica un exantema luego de la exposición a la luz ultravioleta B (luz solar, luz fluorescente), alopecia (7-48%) caracterizada por un adelgazamiento difuso del cuero cabelludo, lo cual puede ser debido a una exacerbación del LES, al estrés, embarazo o al empleo de esteroides; lesiones discoides (5-19%) que tienden a presentarse en cara, cuello, orejas y alrededor de los hombros y fenómeno de Raynaud [4, 6, 9].

Manifestaciones músculo-esqueléticas

En las manifestaciones músculo-esqueléticas se observa artralgia y artritis en más del 75% de los casos, presentándose habitualmente como una poliartritis simétrica, no erosiva muy dolorosa, afectando articulaciones grandes y pequeñas [3, 10] como los dedos de las manos, las muñecas, rodillas y con menos frecuencia hombros, caderas, codos y tobillos.

Las manifestaciones músculo-esqueléticas también pueden ser secundarias, debido a efectos adversos de los diversos tratamientos utilizados, presentándose osteoporosis.

necrosis vascular y retraso en el crecimiento ^[3, 9, 10].

Manifestaciones cardiacas

Las enfermedades cardiacas son ahora reconocidas como una causa significativa de morbilidad y mortalidad en pacientes pediátricos ^[4, 5, 7]. La aterosclerosis se observa definitivamente en estos pacientes y la isquemia en más del 16% de los niños asintomáticos ^[7]. La miocarditis ocurre en un cuarto de los niños con LES y se caracteriza clínicamente por falla congestiva del corazón, cardiomegalia y una disminución del pulso. La válvula mitral es la más comúnmente afectada, seguida por la aorta pulmonar y las válvulas tricúspides. ^[2, 3, 7].

Manifestaciones neuropsiquiátricas

El trastorno neuropsiquiátrico es considerado la segunda causa de morbi-mortalidad del LES pediátrico ^[9]. Este ocurre entre el 20-30% de los niños y adolescentes, y en la mayoría de estos pacientes pueden manifestarse en el primer año de la enfermedad ^[3, 6]. Las manifestaciones neuropsiquiátricas son diversas, y varían desde una disfunción global del SNC con parálisis y convulsiones, hasta síntomas más leves o focales como cefalea o pérdida de la memoria ^[10].

Alteraciones hematológicas

Las alteraciones hematológicas que pueden presentar los pacientes con LES son esenciales para el diagnóstico de la enfermedad. La trombocitopenia autoinmunitaria es la manifestación inicial en el 15% de los casos de LES pediátrico y se ha sugerido que entre el 20 y el 30% de los niños que presentan púrpura trombocitopénica idiopática y anticuerpos antinucleares, desarrollarán posteriormente LES ^[11]. En el 27-52% de los casos del LES pediátrico, se observa leucopenia, siendo también común la granulocitopenia ^[12].

Afección pulmonar

El pulmón se encuentra involucrado en 5-77% de los niños con LES; las formas más frecuentes de afectación pulmonar incluyen pleuritis, neumonitis, neumonía, neumotórax e hipertensión pulmonar. La mayoría de los niños desarrollan manifestaciones pulmonares en algún momento de la evolución de la enfermedad. ^[11].

Tabla 1.- Criterios de la clasificación de Lupus Eritematoso Sistémico (ACR)

Eritema malar, eritema fijo plano o elevado, que se localiza sobre las prominencias malares, sin afectación de los pliegues nasolabiales.
Erupción discoide, placas eritematosas elevadas con descamación queratótica adherente.
Fotosensibilidad, erupción cutánea provocada por una reacción inusual de los rayos solares.
Úlceras orales; ulceración oral o nasofaríngea usualmente indolora.
Artritis no erosiva, involucrando articulaciones periféricas o más, caracterizadas por dolor, tumefacción y derrame.
Serositis: a) Pleuritis, dolor o derrame pleural. b) Pericarditis.
Alteraciones renales: a) Proteinuria más de 0.5 g/ 24 h b) Cilindros celulares: hemoglobina
Afectación neurológica: a) Convulsiones b) Psicosis
Alteraciones hematológicas: a) Anemia hemolítica b) Leucopenia c) Linfopenia d) Trombocitopenia.
Alteraciones inmunológicas: a) Anticuerpos anti-ADN elevado, b) Anticuerpos anti-Smith, c) Anticuerpos anti-fosfolípidos.

Tomado de Silverman, Future Rheumatol (2007); 2(1).

Afección renal

La nefritis lúpica es una de las principales manifestaciones clínicas y es la primera causa de morbi-mortalidad en pacientes con LES pediátrico; aproximadamente en un 80% de los pacientes la presentan y ésta es la que determina el curso y presentación de la enfermedad [2].

En 1982, la Organización Mundial de la Salud (OMS), clasificó la nefritis lúpica en 6 categorías basándose en los hallazgos histológicos. La nefropatía más común en el LES pediátrico es la de grado IV y es la que más comúnmente se asocia con el desarrollo de enfermedad renal terminal o con muerte [3]. Los episodios de exacerbación de las alteraciones de la función renal son comunes durante la evolución de la nefritis lúpica y con frecuencia se presenta proteinuria (de más de 0.5g/24h o 3+++), persistente).

Diagnóstico

Aunque no existe un criterio específico para el diagnóstico de LES pediátrico, este se

define por medio del criterio establecido por, el Colegio Americano de Reumatología (ACR), que se ha establecido con base en las manifestaciones clínicas generales para la evaluación inicial de los pacientes con sospecha de Lupus, así como con pruebas de laboratorio que complementan el diagnóstico (Tabla 1). Se puede realizar el diagnóstico de Lupus si se cumplen con al menos cuatro de los once criterios establecidos por el ACR [4].

PATOGÉNESIS

La etiología del LES no ha sido elucidada por completo; esta incluye un mosaico complejo de factores genéticos, ambientales y hormonales, además de la disregulación del sistema inmune, aunque se sabe que el LES es el clásico ejemplo de una enfermedad autoinmune sistémica, caracterizada por la producción de autoanticuerpos contra componentes nucleares y citoplasmáticos.

Uno de los factores ambientales implicados en la patogénesis del LES es la luz ultravioleta [20], ya que el sol emite radiaciones ultravioleta en tres bandas del espectro conocidas como bandas A, B y C. Las dos primeras, ultravioleta A (UVA) y ultravioleta B (UVB) son las que lesionan la piel de los pacientes con LES, causando la presencia de salpullido, seguido de un daño generalizado [9]. Algunos virus denominados linfotropos como el virus Epstein-Barr son factores ambientales por tener un papel importante en la predisposición al LES, ya que muchos niños y adultos con LES cuando se comparan con individuos sanos se han encontrado con una alta carga de EBV en su sangre, y altos títulos de anticuerpos dirigidos contra una de las proteínas del virus EBNA-I [21,22].

ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS

A pesar de la complejidad de la enfermedad, se han logrado identificar defectos en células del sistema inmune, así como en varias citocinas, que se encuentran involucrados en la ruptura de la tolerancia periférica que conducen al desarrollo de LES.

Esta enfermedad es caracterizada por diversas anomalías en las respuestas inmunes que involucran hiperactividad de células B, células T, células dendríticas, funciones fagocíticas anormales y defectos en la eliminación de complejos inmunes y de restos apoptóticos [20].

Por otro lado independientemente de la edad de presentación, pacientes con LES

presentan hipergammaglobulinemia y un aumento en los títulos de los autoanticuerpos en el suero. Pacientes pediátricos y adultos muestran alteraciones en células B vírgenes [18] y en el número de células B de memoria [19].

Falla en los mecanismos de autorregulación

Se ha descrito la **falla** en los mecanismos de autorregulación del sistema inmune, de los que podemos mencionar, la **falla** de la tolerancia central dada en el Timo en edades tempranas, en donde se le presenta a los Timocitos (precursores de Linfocitos T) recién llegados de la Médula Ósea por medio de las Células Presentadoras de Antígenos en el epitelio, tejido propio para que sea asimilado como tal y no activarse más adelante ante este, debido a una avidez y afinidad por el tejido propio los linfocitos en maduración van adquiriendo la capacidad de discernir entre lo propio y lo extraño; si alguna de estas células tiene una fuerte afinidad y mayor avidez para un tejido propio, este linfocito autorreactivo entra en apoptosis, llevando a cabo el mecanismo de tolerancia central, el cual no es 100% efectivo dejando escapar estos Linfocitos autorreactivos.

Linfocitos B

Los linfocitos B juegan un papel principal en la patogénesis del LES. Los pacientes con LES tienen una marcada linfopenia, que afecta principalmente a las células B vírgenes y de memoria, y una expansión de células que expresan CD38 (incluyendo precursores de células plasmáticas) [9]. Se ha de mostrado que anomalías en el desarrollo de células B vírgenes resultan en una elevada producción de autoanticuerpos en LES. Por ejemplo las células B autoreactivas escapan a la fagocitosis en los centros germinales y nódulos linfoides, esto además de posibles defectos en la fagocitosis de estas células autoreactivas y fallas en el sistema de complemento ocasionando que su sobrevivencia se alargue más de lo normal [12]. Los Linfocitos B de pacientes con LES exhiben una mayor predisposición hacia la activación policlonal por antígenos, citocinas, y otros estímulos que conducen hacia una hipergammaglobulinemia (producción excesiva de IgG), producción de autoanticuerpos y formación de complejos inmunes. Lo anterior resulta en que los Linfocitos B de pacientes con LES son capaces de diferenciarse en células productoras de IgG de forma independiente de células T, mediante la ayuda de citocinas que se encuentran sobre-reguladas en pacientes con LES, como lo son IL-10, Blys e INF- α , estas citocinas crean un ambiente adecuado para que se de la producción

de autoanticuerpos no dependientes de células T ^[28].

Linfocitos T

Aunque esta enfermedad es caracterizada por las deficiencias en células B que conllevan a la producción de autoanticuerpos contra antígenos propios, la contribución de las células T en el desarrollo de la enfermedad no es cuestionable.

Se han descrito numerosas anormalidades en la función de células T en pacientes con LES. Como se mencionó anteriormente, una fuerte evidencia de esto, es la marcada linfopenia, aunado a varios defectos funcionales como la disminución de la actividad citotóxica ^[25], una apoptosis espontánea e incrementada, activación celular desbalanceada, acompañado tal vez por una acrecentada co-estimulación, que conlleven a cambios en la concentración y/o función de células T reguladoras (Treg), en la presentación de Ag propios por Células presentadoras de antígenos (APC) y en la desregulación de la apoptosis de estas células ^[29].

Además de todas estas anormalidades, Sfrikakis y cols. demostraron que un aumento en la actividad de las células T CD4+ contribuye con el desarrollo de nefritis en pacientes con LES, además de la aparición de una nueva población de linfocitos T CD4- CD8- doble negativas que aparecen antes de las manifestaciones clínicas de la enfermedad y proveen de ayuda a las células B autoreactivas para producir anticuerpos contra antígenos propios ^[30].

Deficiencias en el Sistema de Complemento

El sistema de complemento entre otras de sus funciones, esta encargado de la depuración de células en apoptosis y la deficiencia de una o varias de las proteínas del complemento; se ha asociado con la depuración defectuosa de estos restos apoptóticos ^[31], además de que estas deficiencias pueden proveer de ayuda a las células B autoreactivas para que escapen a la apoptosis ^[12].

Por lo tanto se puede decir que el sistema de complemento puede estar involucrado en la patogénesis de enfermedades autoinmunes como el LES. Evidencia de lo anterior, es que individuos con deficiencias en la proteína de complemento C1q padecen de un lupus más severo. con glomerulonefritis y manifestaciones cutáneas. deficiencias el C2 y C4

que conllevan a desarrollar un padecimiento menos severo que se limita a la piel y articulaciones. En consecuencia se ha descrito que los títulos de los receptores 1 y 2 (CR1 y CR2) del complemento se encuentran alterados en pacientes con LES ^[12].

APOPTOSIS

La relación entre la apoptosis y el desarrollo de la autoinmunidad ha sido ampliamente estudiada, y varias observaciones obtenidas de estos estudios proveen de evidencia suficiente de que la muerte celular programada juega un papel importante como incitador o propagador de la autoinmunidad ^[16],

La apoptosis excesiva que se presenta en pacientes con LES, libera DNA, histonas y otros antígenos intracelulares, que después de un reacomodo, quedan expuestos en la superficie de las células apoptóticas, en donde son detectados, iniciando así una respuesta inmune ^[32],

En condiciones normales, el mecanismo de eliminación de estos cuerpos apoptóticos es realizado por las células dendríticas inmaduras, las cuales se encargan de presentarlos para inducir tolerancia junto a los linfocitos T, pero si existe una deficiente eliminación de estos restos celulares, los cuales poseen una cantidad excesiva de antígenos nucleares que pueden ser captados de igual manera por células dendríticas inmaduras e inducir la ruptura de la tolerancia periférica ^[26].

BASES GENÉTICAS

La etiología de esta LES no ha sido del todo elucidada pero se sabe que es una enfermedad multifactorial, que resulta de la compleja interacción de factores genéticos y ambientales. La prevalencia de esta enfermedad es de alrededor de 0.05 % en poblaciones caucásicas, aunque se sabe que es mas frecuente en Afroamericanos, Chinos y Mexicanos, pese a que en estas poblaciones no se han hecho estudios epidemiológicos adecuados ^[33]. La heredabilidad (Fracción de la enfermedad que es atribuible a los genes) del LES se ha estimado que es del 66 % ^[14] y es más frecuente que se presente entre familiares de primer grado siguiendo un patrón de herencia no mendeliano; evidencia de esto es el alto valor de λ_s de 29 (riesgo entre hermanos de pacientes afectados con la enfermedad de padecer Lupus), así como la prevalencia familiar del LES que es del 10-12%, que indica la fuerte contribución de los factores genéticos en la

susceptibilidad a contraer la enfermedad, aunque también indica la participación de factores ambientales y/u hormonales ^[35].

La genética del LES ha sido estudiada desde principios de los 70's cuando se descubrió el primer alelo asociado con la susceptibilidad a desarrollar esta enfermedad ^[34]. Desde entonces se han identificado mas de 100 factores genéticos que confieren riesgo a desarrollar LES, mediante diversas estrategias de análisis como estudios de caso-control, estudios de ligamiento en múltiples familias, aunque solo unos pocos se han replicado en estudios independientes ^[35].

Estrategias para la identificación de factores genéticos.

Existen diferentes estrategias para la identificación de los factores genéticos involucrados en las enfermedades complejas:

1. Análisis de ligamiento; permite determinar si un marcador genético y el gen que predispone a la enfermedad se encuentran físicamente ligados mediante el análisis de la cosegregación del marcador y el fenotipo de la enfermedad. La evidencia estadística de ligamiento se conoce como LOD score, que es el logaritmo base 10 del cociente de 2 probabilidades: la probabilidad de que dos loci se encuentren ligados, entre la posibilidad de que no haya ligamiento. Convencionalmente se ha considerado que un LOD score mayor a tres es una evidencia de ligamiento entre dos loci específicos, mientras que valores negativos o menores a tres, nos indican que el ligamiento es poco probable.

En el estudio de enfermedades complejas es difícil encontrar grandes genealogías multigeneracionales debido a la participación de factores ambientales y la influencia de múltiples genes en su desarrollo. Por lo que estudios de ligamiento resultan ser imprácticos para el estudio de estas entidades ^[13].

2. Análisis de asociación; en este tipo de estudios se compara la frecuencia de un marcador entre casos no relacionados y controles sanos, e investiga su ocurrencia simultánea con la enfermedad a nivel de la población. Una asociación significativa del marcador con la enfermedad sugiere un gen candidato en la etiología de la enfermedad. Otra estrategia es el uso de la prueba de desequilibrio de transmisión (TDT por sus siglas

en inglés), la cual permite evitar las falsas asociaciones debidas a estratificación de la población obtenidas en un estudio de casos y controles. En la prueba de TDT se compara la frecuencia con la cual los padres heterocigotos transmiten un alelo específico de un marcador bialélico a su hijo enfermo. Si el marcador alélico se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el locus de la enfermedad se observará una desviación significativa de la frecuencia de transmisión esperada para cualquiera de los dos alelos (una desviación superior al 50% para cualquiera de los dos alelos) ^[13].

Hasta la fecha, los análisis del genoma completo en LES han sido realizados y de estos se han identificado cerca de 60 loci potenciales de susceptibilidad con LES ^[46]. Las estrategias y diseños de estudios pueden variar dependiendo el origen étnico de las familias involucradas en los estudios. De todos los loci identificados, sólo ocho de estos que muestran un LOD score >3.3 han sido replicados de manera independiente, usando el fenotipo de lupus; estos loci son: 1q23, 1q25-31, 1q41-42, 2q35-37, 4p16-15.2, 6p11-21, 12q24 y 16q12-13, (Tabla 2); ^[13, 14, 15, 17; 18, 21, 25; 36].

Tabla 2. Regiones del genoma que han mostrado ligamiento significativo con LES en múltiples poblaciones.

Localización	LOD score	Población	Gen candidato
1q23	4.0	AA y E	<i>FCGR1IA/IIIA, CRP</i>
1q31-32	3.8	E y HI	?
1q41-42	3.3	E, AA y OR	<i>PARP, TLR5</i>
2q37	4.2	E y H	<i>PDCD1</i>
4p16	3.8	E	?
6p21-p12	4.2	E	<i>HLA-DR</i>
11p13	3.4	AA	?
12q24	3.3	HI	?
16q12-13	3.4	EA	<i>NOD2/CARD15/OAZ</i>

Europeos (E), Afro-americanos (AA), Asiáticos del Este (OR) e hispanos (HI). ?, no se ha identificado un gen candidato potencial identificado hasta ahora. Modificado de Wong y Tsao 2006.

La causa del LES está basada en la pérdida de tolerancia inmunológica contra antígenos propios. Estudios del genoma han identificado 8 regiones cromosómicas ligadas significativamente al LES (Tabla 2). Estos incluyen tanto genes de la respuesta inmune innata como de la adaptativa. De las regiones que han mostrado ligamiento significativo se encuentra la región 1q23 y de los genes candidatos más importantes en la etiología del LES, se encuentra el gen que codifica para la proteína C-reactiva (CRP).

El gen *CRP* consta de dos exones separados por un solo intrón. Dentro de la región promotora se encuentran varios sitios de unión para factores de transcripción tales como: STAT3, C/EBPβ y USF 1 [32].

Varios SNPs (variaciones polimórficas de una sola base) así como un repetido dinucleótido de GT que va desde 12 a 21 copias [32] presentes en el gen *CRP* se han asociado con la predisposición de un individuo a desarrollar LES.

La ubicación de dichos SNPs dentro del gen *CRP*, es la siguiente: los SNPs rs3093062 y rs3091244 se encuentran en al caja E-1 y E-2 respectivamente, dentro de la región promotora del gen y se asocian con los niveles de CRP sérica; el SNP rs1800947 se encuentra dentro del exón 2 en la región codificadora pero no altera la secuencia de aminoácidos; los SNPs rs1130864 y rs1205 se encuentran dentro de la región 3' no traducible [30]. El repetido dinucleótido de GT está presente dentro del intrón [32].

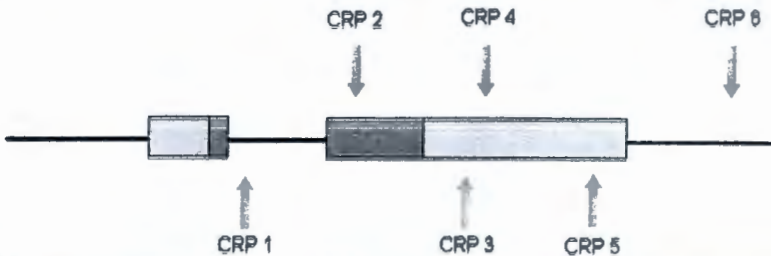


FIGURA 1. Representación del gen que codifica para la proteína C reactiva.- Este gen consta de dos exones (cajas coloreadas) separados por un solo intrón (línea azul). Se han descrito varios SNPs en este gen; las flechas indican la posición de cada uno de los SNPs analizados en este trabajo (ver tabla 3 para una descripción mas detallada).

Estudios de asociación basados en familias han demostrado que el alelo T del SNP rs1205(C/T) se encuentra asociado con la susceptibilidad a desarrollar LES y con la

producción de anticuerpos antinucleares, así como con el desarrollo de nefritis lúpica ^[32; 33]. Los SNPs rs3093062 y rs3091244 se han relacionado con los niveles de CRP sérica, donde los individuos que presentan el haplotipo -409G/-390T muestran los niveles más altos de CRP sérica, mientras que los individuos con el haplotipo -409A/-390T presentan los niveles más bajos ^[34]. Un estudio realizado por el grupo de Szalai y cols. en 2005 donde analizaron pacientes con LES de poblaciones hispanas, Afro-americanas y caucásicas, demostró que los individuos que acarreaban 20 copias del repetido GT tenían un alto riesgo a desarrollar eventos cardiovasculares y que además este polimorfismo se encuentra sobre expresado en pacientes afro-americanos e hispanos.

Los niveles normales de CRP en sangre son de 1 µg/ml pudiéndose incrementar hasta 500 µg/ml durante la fase aguda de la inflamación. Estos tienden a incrementarse con la edad, y son generalmente más altos en mujeres que en hombres. Valores elevados de CRP se han utilizado como predictor del riesgo de contraer alguna enfermedad cardiovascular ^[34] y han sido observados en pacientes con enfermedades renales en etapa terminal ^[31]. Por el contrario, bajos niveles de CRP se asocian con padecimientos autoinmunes, particularmente con LES ^[31].

La proteína C- reactiva pertenece a la familia de las pentraxinas, que consisten en un arreglo cíclico de 5 subunidades idénticas unidas por enlaces no covalentes. Se ha determinado que cuenta con sitios de unión para dos iones calcio (Ca^{++}) y una molécula de fosfocolina (PC) por protómero en su cara "B". En su cara "A" se cree que existen sitios de unión para la proteína del sistema de complemento C1q y para receptores de la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas (específicamente para receptores del tipo FcγRI) (figura 2) ^[30].

La CRP es producida por los hepatocitos, en respuesta a varias citocinas inflamatorias como la interleucina IL-6 y su síntesis aumenta sinérgicamente con la interacción con la IL-1β ^[30]. Normalmente se une a la superficie de células apoptóticas, resultando esto en una amplificación de la vía clásica del complemento y un incremento de la actividad fagocítica de los macrófagos ^[31]. Esta pentraxina se une a constituyentes específicos de la membrana celular y material nuclear expulsados durante la muerte celular, o expuestos en la superficie celular durante la apoptosis.

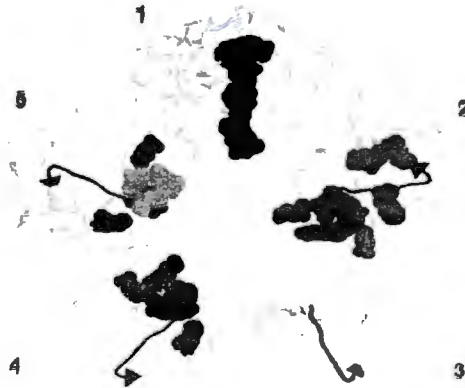


FIGURA 2. Estructura de la proteína C reactiva.- Se muestran las 5 subunidades por la cual está compuesta esta proteína. Los residuos en color amarillo indican los sitios de unión para los receptores FcγR; los residuos en color azul son los propuestos sitios de unión para C1q; los residuos en color verde se cree que son importantes para la unión a C1q y FcγR. Los residuos en púrpura y rojo han sido investigados por otros grupos de investigadores.

La CRP se une principalmente a pequeñas riboproteínas nucleares (snRNPs) y a fosfolípidos polares (dos de los principales autoantígenos en el LES). Se ha propuesto que un procesamiento defectuoso de estos restos celulares es un factor que contribuye en el LES [32]. La unión de la CRP a la superficie de las células apoptóticas es dependiente de (Ca^{++}) y favorece la activación de la vía clásica del complemento incrementando la unión de C1q y C3b/bi. La activación del complemento por la proteína C-reativa difiere de la activación por anticuerpos, en que ésta es selectiva hacia ciertos componentes, pero sin la formación del complejo de ataque de membrana [30]. También es capaz de interactuar con el factor H del complemento para inhibir la actividad de la convertasa de C5 causando una disminución de un bucle de amplificación de la vía alterna del complemento, lo que causa una disminución en los títulos del complejo de ataque de membrana y por lo tanto disminuyendo la inflamación [29].

La CRP se une a la cromatina por solubilización de ésta en presencia de complemento; experimentos de Blotting han dejado ver la unión de la CRP con la proteína D del complejo Sm (anti-Smith) y proteínas de 70 kDa de las riboproteínas nucleares. Estos antígenos son de los principales blancos de autoanticuerpos en pacientes con LES [30].

La habilidad de la CRP de incrementar la depuración de células apoptóticas así como su capacidad de unirse a antígenos nucleares, han propuesto la teoría de que esta proteína

actúa enmascarando los autoantígenos para evitar que los reconozca el sistema inmune y que el incremento en la depuración de estos antígenos por la CRP puede prevenir la autoinmunidad [30].

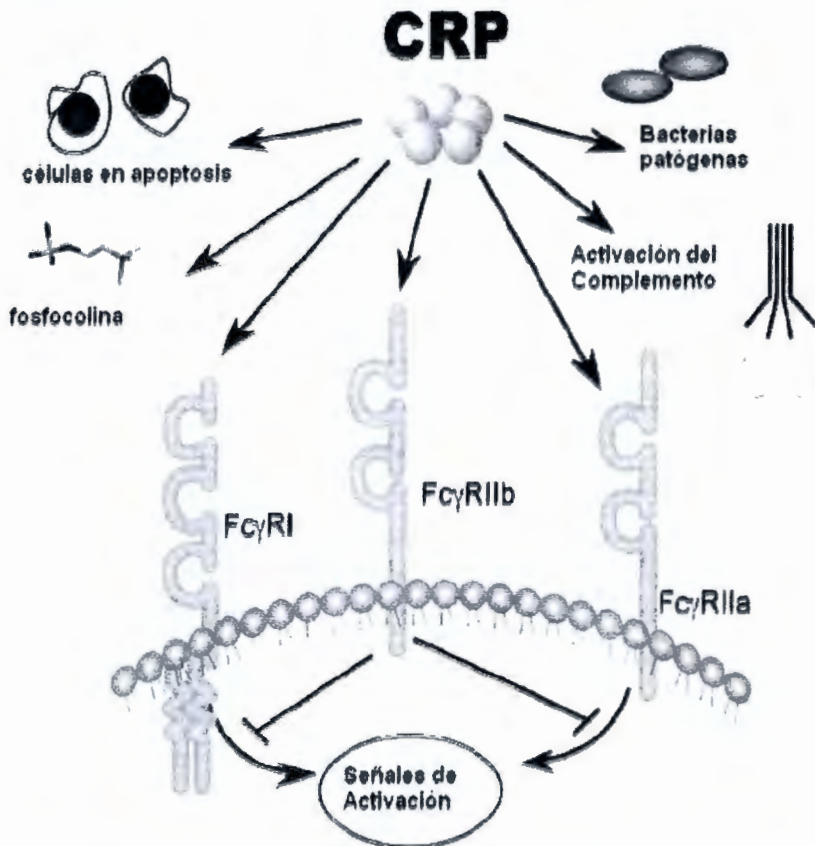


FIGURA 3. Ligandos de la CRP.- el ligando clásico de la proteína C-reactiva es la fosfololina, un fosfolípido de membrana; otros ligandos son los antígenos nucleares expuestos en la superficie de células en apoptosis, además de bacterias patógenas como el neumococo. Tras la unión a estos ligandos la CRP es capaz de unirse a la proteína C1q del complemento y activar la vía clásica de este sistema, o unirse a los receptores FcγR e iniciar la depuración de estos complejos.

JUSTIFICACIÓN.

En un estudio previo de casos y controles, realizado por Vicente Baca y colaboradores [13], se analizaron diversas variantes polimórficas de un solo nucleótido (SNPs) localizadas en genes involucrados en la respuesta inmune en 130 pacientes con LES. Nuestros resultados preliminares de los polimorfismos -1082 G/A, -819 C/T y -592 C/A del gen IL-10, -174 G/C del gen IL-6 y el R/H131 del gen FcγRIIA no mostraron

diferencias significativas entre los pacientes pediátricos mexicanos y los controles sanos, muy probablemente debido a limitaciones en el tamaño de la muestra y/o debido a que otros genes que participan en la respuesta inmune, podrían estar involucrados en la susceptibilidad de la enfermedad.

En este proyecto se buscaron polimorfismos asociados en el gen de la proteína C-reactiva (CRP) con la susceptibilidad a padecer lupus eritematoso sistémico (LES) en población pediátrica mexicana. Los resultados generados nos permitieron contribuir al conocimiento de los factores genéticos involucrados en la etiopatogenia de esta enfermedad, mismos que tendrán aplicación potencial en la prevención, diagnóstico y tratamiento del LES y sentarán las bases para el estudio de otras entidades multifactoriales comunes en nuestro medio.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar si polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en el gen de la proteína C Reactiva (CRP), se encuentran asociados a la susceptibilidad para desarrollar LES, en pacientes pediátricos mexicanos.

Objetivos específicos:

1. Determinar si existe asociación entre los SNPs localizados en el gen de la CRP y LES de inicio en la edad pediátrica.
2. Determinar si existen diferencias entre los polimorfismos asociados a LES en otras poblaciones con los encontrados en el presente estudio.
3. Establecer si existe correlación entre los polimorfismos estudiados y las manifestaciones clínicas y de laboratorio de LES.
4. Conocer la frecuencia de los polimorfismos mencionados en una muestra de individuos mexicanos.

HIPÓTESIS

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en el gen de la Proteína C reactiva involucra a la respuesta inmune e inflamatoria, y se encuentran asociados a la gravedad y susceptibilidad para desarrollar LES en pacientes pediátricos mexicanos.

CLASIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

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

MATERIALES Y MÉTODOS.

POBLACIÓN DE ESTUDIO.

Para el estudio de casos-controles, se incluyeron 295 pacientes con LES y 436 individuos sanos sin antecedentes de enfermedades autoinmunes (determinado mediante la aplicación de un cuestionario), que se utilizaron como controles; ambos grupos fueron pareados por sexo y origen geográfico.

MUESTRAS.

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

EXTRACCIÓN DE DNA.

La extracción del DNA genómico se realizó a partir de leucocitos de sangre periférica, utilizando la técnica convencional de fenol-cloroformo y precipitación con etanol [27]. Alternativamente, la extracción del DNA se llevó a cabo, utilizando el Kit QIAGEN. La integridad del DNA se verificó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El DNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría.

ANÁLISIS MOLECULAR.

GENOTIPIFICACIÓN DE SNPs EN EL GEN DE LA CRP.

Se analizaron 6 SNPs descritos en el gen de la proteína C reactiva (CRP), que han mostrado asociación en otras poblaciones afectadas con LES.

Los SNPs fueron caracterizados por el método fluorescente de 5' exonucleasa (Taqman) [29]. Los SNPs se analizaron en forma independiente y como haplotipos construidos con el programa HAPLOVIEW V3.2.

Método fluorescente de 5' exonucleasa (Taqman®).

Para cada ensayo de discriminación alélica, se diseñaron 2 sondas específicas marcadas en el extremo 5' con fluorocromos diferentes, VIC para el alelo 1 y FAM para el alelo 2, además ambas sondas tienen en el extremo 3' un "quencher" (TAMRA) el cual mientras la sonda permanece intacta, inhibe la emisión de fluorescencia. Durante la reacción de PCR los primers hibridan con una secuencia específica del templado de DNA. Si éste contiene la secuencia polimórfica, la sonda de Taqman también hibrida con su secuencia homóloga. Durante la PCR, la AmpliTaq Gold, que tiene actividad tanto de DNA polimerasa como de exonucleasa 5'-3', es capaz de digerir la sonda marcada durante la amplificación y liberar el colorante fluorescente de la acción del "quencher", de tal manera que dadas las condiciones de astringencia utilizada durante la reacción, sólo la sonda específica para el polimorfismo presente, será capaz de hibridar. Por lo tanto es posible diferenciar un alelo del otro con base en el tipo de fluorescencia emitida.

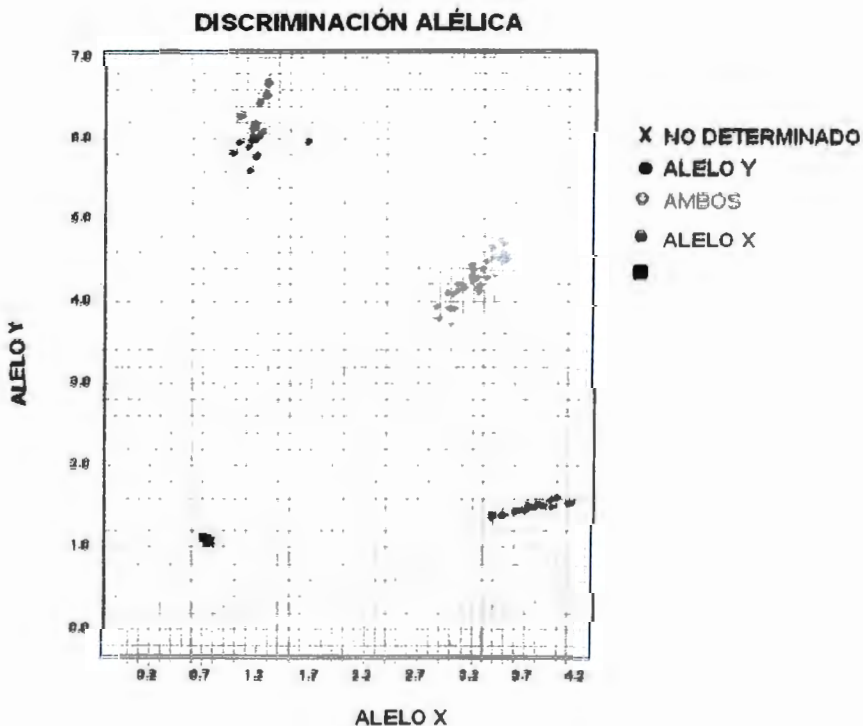


FIGURA 4. Plot de Discriminación Alélica.- Se muestran los tres grupos de genotipos que se forman usando dos tipos de sondas Vic para el alelo X (grupo en color rojo), se forma con los individuos que son homocigotos para el alelo 1 y Fam para el alelo Y (grupo en color azul), formado por los individuos que son homocigotos para el alelo 2, los individuos que son heterocigotos (alelos 1 2), se distinguen por la combinación de los dos fluorocromos (rojo y azul) observándose de color verde.

DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y SONDAS ESPECÍFICAS.

Los oligonucleótidos y las sondas se diseñaron con el software PRIMER EXPRESS v2.0 (Applied biosystems, Foster City, CA).

UBICACIÓN DEL ESTUDIO.

Los pacientes fueron reclutados, previo consentimiento informado y diagnóstico de LES, en el Departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Pediatría. El análisis genético y el estudio molecular se llevo acabo en el laboratorio de Genómica de las Enfermedades Multifactoriales del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

RESULTADOS

El análisis de forma independiente de los seis SNPs estudiados, indican que en 4 de los 6 SNPs no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (pacientes y controles). Los SNPs que no mostraron asociación son los siguientes: CRP 1 (T/A), CRP 2 (G/C), CRP 3 (C/A) y CRP 6 (T/C) (Tabla 3 $p>0.05$).

Tabla 3.- SNPs presentes en el gen de la CRP que fueron analizados dentro del presente estudio

SNP	Rs	Alelo menos frecuente %*	Valor de P	O.R 95% CI
CRP 1	rs1417938 (A/T)	37.1	0.13	1.18 (0.95-1.46)
CRP 2	rs1800947 (G/C)	2.0	0.22	N.D
CRP 3	rs3093066 (C/A)	0.7	0.73	N.D
CRP 4	rs1130864 (C/T)	37.1	0.08	0.83 (0.67-1.02)
CRP 5	rs1205 (C/T)	39.5	0.04	1.25 (1.01-1.56)
CRP 6	rs2808630 (T/C)	17.3	0.91	N.D

A su vez, dos de estos no resultaron ser polimórficos en nuestra población CRP 2 (G/C) y CRP 3 (C/A), por lo que se excluyeron para el análisis como haplotipos. Por otro lado, cuando se relacionó la frecuencia de estos polimorfismos con el riesgo a desarrollar glomerulonefritis, los polimorfismos CRP1(A/T) y CRP4 (C/T) resultaron asociados ($P < 0.05$).

Como se muestra en la tabla 3, el alelo T del SNP CRP 4 mostró una tendencia a la asociación ($p = 0.08$). El alelo T del SNP CRP 5 mostró asociación con el riesgo a desarrollar LES en nuestra población ($p = 0.039$; OR=1.25, IC 95%=1.25-1.56) (Tabla 3). Aunque este valor de P se pierde después de someterlo a una prueba de corrección, el alelo T de este polimorfismo ya se había asociado con la susceptibilidad a desarrollar LES en otras poblaciones [48], pero en población mexicana la asociación que muestra es muy débil.

Tabla 4.- Distribución Genotípica y Alélica del Polimorfismo rs1130864(C/T) del Gen *CRP* en Pacientes Pediátricos con LES y Controles Sanos.

Genotipo	Pacientes n=295 (%)	Controles n=431 (%)		χ^2	P	OR (95% IC)
CC	115 (38.9)	142 (32.9)	CC vs CT	1.9	0.165	0.79 (0.57-1.1)
CT	141 (47.8)	219 (50.9)	CC vs TT	2.5	0.112	0.69 (0.43-1.1)
TT	39 (13.2)	70 (16.2)	CC vs [CT+TT]	2.8	0.095	0.77 (0.56-1.1)
<hr/>						
Alelos						
C	371 (62.9)	503 (58.4)				
T	219 (37.1)	359 (41.6)		3.0	0.083	0.83 (0.67-1.02)

La construcción de haplotipos, reveló que dos de ellos muestran una tendencia a la asociación, (haplotipo 1 $p = 0.067$, haplotipo 2 $p = 0.055$) (Tabla 4). Cabe destacar que ambos haplotipos se encuentran definidos por los alelos que mostraron tendencia a la asociación en el análisis individual de los SNPs. El haplotipo 1, se encuentra definido por el alelo T del SNP CRP 4 (OR= 0.89, 95% IC= 0.67-1.04).

Tabla 5.- Distribución Genotípica y Alélica del Polimorfismo rs1205(C/T) del Gen *CRP* en Pacientes Pediátricos con LES y Controles Sanos.

Genotipo	Pacientes n=295 (%)	Controles n=434 (%)		χ^2	P	OR (95% IC)
CC	108 (36.6)	191 (44.0)	CC vs CT	2.9	0.091	1.32 (0.96-1.82)
CT	141 (47.8)	189 (43.5)	CC vs TT	3.1	0.079	1.5 (0.95-2.38)
TT	46 (15.6)	54 (12.5)	CC vs [CT+TT]	4.0	0.046	1.4 (1.0-1.84)
Alelos						
C	357 (60.5)	571 (65.7)				
T	233 (39.5)	297 (34.3)		4.2	0.0398	1.25 (1.01-1.56)

El haplotipo 2 que mostró cierta tendencia a la asociación, se define por el alelo T del SNP CRP 5 (OR= 1.24, IC 95%=1.04-1.55). Este alelo es el que mostró asociación con el riesgo a desarrollar LES en nuestra población, por lo que aunque el valor de *P* no es significativo, podría este conferir un ligero riesgo en nuestra población. Cuando se eliminó el SNP CRP 6 del bloque de haplotipos, el valor de *P* del haplotipo 2 disminuye a 0.04 mostrando una asociación débil pero significativa

Tabla 6.- Haplotipos construidos por el análisis de los SNPs del gen *CRP*

Haplotipo	SNPs				Controles n=436 (%)	LES n=296 (%)	P	OR 95% IC
	CRP 6	CRP 5	CRP 4	CRP 1				
1	T	C	T	T	40.7	36.2	0.067	0.89 (0.67-1.04)
2	T	T	C	A	34.0	39.0	0.055	1.24 (1.04-1.55)
3	C	C	C	A	16.9	16.9	0.879	1.03 (0.79-1.37)
4	T	C	C	A	7.2	6.3	0.501	0.85 (0.58-1.34)

Adicionalmente se correlacionó si alguno de los SNPs analizados se encontraba asociado con una de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Los SNPs estudiados se

cuantificaron en pacientes con LES que tienen nefritis y estos datos se retaron contra los pacientes que no padecen nefritis.

Se contabilizaron un total de 245 pacientes, de los cuales 151 presentaron nefritis y 95 no. De los 6 SNPs analizados solo dos mostraron una asociación significativa con el riesgo a desarrollar nefritis de forma independiente; estos fueron los polimorfismos CRP 1 (A/T) $P=0.02$ (tabla 6) y CRP4 (C/T) $P=0.04$ (tabla7).

De igual forma, se construyeron los haplotipos correspondientes, donde uno de estos; definido por los alelos minoritarios de los dos SNPs que mostraron asociación CRP4 T, CRP1 T, también se asociaron con el riesgo a desarrollar LES $P=0.04$ (OR=2.3, IC=0.98-5.5). Al eliminar el SNP CRP6 de nuevo, el valor de P para este haplotipo disminuyó a 0.02. Cabe destacar, que ninguno de estos SNPs se ha asociado con el riesgo a desarrollar la enfermedad o alguna de sus manifestaciones clínicas en estudios realizados en otras poblaciones, aunado al hecho de que se encuentran en fuerte desequilibrio de ligamiento (LD) $r^2= 95$.

Tabla 7.- Distribución Genotípica y Alélica del Polimorfismo rs1417938(A/T) del Gen CRP en Pacientes Pediátricos con LES con glomerulonefritis vs. pacientes con LES sin glomerulonefritis

Genotipo	Con Nefritis n=151 (%)	Sin Nefritis n=95 (%)		χ^2	P	OR (95% IC)
AA	48 (31.8)	43 (45.25)	AA vsCT	3.2	0.07	1.6 (0.95-2.90)
AT	78 (51.7)	43 (45.25)	AA vs TT	2.5	0.03	2.5 (1.05-5.9)
TT	25 (16.5)	9 (9.5)	AA vs [AT+TT]	4.8	0.03	1.8 (1.06-3.01)
Alelos						
A	174 (58.3)	128 (67.4)				
T	128 (41.7)	62 (32.6)		5.4	0.02	1.6 (1.07-2.3)

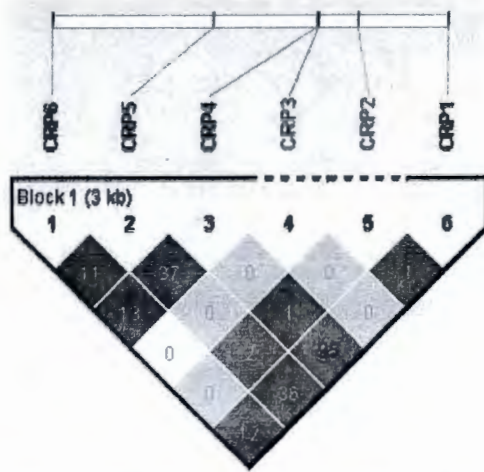


FIGURA 5. Plot de los haplotipos construidos con el programa Haploview V3.32.- Los SNPs CRP2 y CRP3 no se encuentran en desequilibrio de ligamiento con los otros SNPs analizados. De igual forma los polimorfismos CRP4 y CRP1 se encuentran en fuerte desequilibrio de ligamiento $r^2 = 0.95$. Se muestran los valores de r^2 en cada casilla.

Tabla 7.- Distribución Genotípica y Alélica del Polimorfismo rs1130864(C/T) del Gen *CRP* en Pacientes Pediátricos con LES con glomerulonefritis vs pacientes con LES sin glomerulonefritis

Genotipo	Con Nefritis n=151 (%)	Sin Nefritis n=95 (%)		χ^2	P	OR (95% IC)
CC	50 (33.1)	42 (44.2)	CC vs CT	1.7	0.18	1.45 (0.83-2.52)
CT	76 (50.3)	44 (46.3)	CC vs TT	3.8	0.05	2.3 (0.98-5.5)
TT	25 (16.6)	9 (9.5)	CC vs [CT+TT]	3.1	0.08	1.6 (0.94-2.7)
Alelos						
C	176 (58.3)	128 (67.4)				
T	126 (41.7)	62 (32.6)		4.1	0.04	1.48 (1.01-2.16)

El SNP CRP 1 que mostró la asociación más fuerte, se encuentra dentro del intrón del gen *CRP*, por lo que no se sabe a ciencia cierta cual sea la función que cumple dentro del gen, a diferencia del polimorfismo CRP4 que se encuentra dentro de la región 3' no traducible (3' UTR) y por lo tanto puede influenciar la estabilidad del mRNA y a su vez alterar los niveles de la proteína en sangre periférica.

Tabla 8.- Haplotipos construidos por el análisis de los SNPs del gen *CRP* en pacientes con LES y nefritis

Haplotipo	SNPs				Sin nefritis n=95 (%)	Con nefritis n=151 (%)	P	OR 95% IC
	CRP 6	CRP 5	CRP 4	CRP 1				
1	T	T	C	A	37.6	40.4	0.538	0.89 (0.63-1.32)
2	T	C	T	T	40.5	31.3	0.041	1.5 (1.04-2.22)
3	C	C	C	A	15.3	19.7	0.207	0.74 (0.49-1.25)
4	T	C	C	A	4.3	7.5	0.131	0.55 (0.31-1.37)

DISCUSIÓN

Se sabe que los pacientes con LES exhiben niveles séricos de CRP por debajo de lo normal. Dado que una de las principales funciones de esta proteína es la de la depuración de complejos inmunes y restos apoptóticos, títulos disminuidos de CRP en suero pueden influir en la pérdida de tolerancia inmunológica y ser un factor para el riesgo a desarrollar LES. Los polimorfismos analizados en el presente estudio se encuentran en regiones no codificadoras a excepción del SNP CRP2 (G/C) que causa una mutación silenciosa y no afecta la secuencia de aminoácidos, aunque este polimorfismo no mostró asociación con la enfermedad y resultó ser poco polimorfito en nuestra población.

Los resultados demuestran que, por una parte el SNP CRP5 se encuentra débilmente asociado con el riesgo a desarrollar LES en el estudio de casos y controles pero no lo está con una de las manifestaciones clínicas de la enfermedad como lo es la glomerulonefritis.

El alelo T de este SNP ya se ha mostrado asociado con el riesgo a desarrollar LES en otras poblaciones y más aún con el riesgo a desarrollar anticuerpos antinucleares (ANA) y con niveles bajos de CRP en suero^[48]. La frecuencia de este polimorfismo en nuestra población es mayor 39% comparado con las que analizó Russell (Caucásicos Europeos, Afro-caribeños e indio-asiáticos) 33%, 14% y 32% respectivamente. Este SNP se encuentra en la región 3' UTR y se sabe que estas regiones tienen que ver con la

estabilidad del mensajero, ya que a su vez este polimorfismo se asocia con niveles bajos de CRP en suero que puede originar inestabilidad del mRNA causando su pronta degradación y por lo tanto afectando los niveles basales de esta proteína en sangre y que, dado a que esta se encarga de la depuración de complejos inmunes y de enmascarar auto antígenos que son blanco de autoanticuerpos en LES, la presencia de este polimorfismo se traduzca en un depuramiento defectuoso de estos complejos y por lo tanto desencadene la pérdida de tolerancia hacia este tipo antígenos (debido a la ausencia de la CRP).

En un estudio publicado recientemente por Jønsen y cols. asociaron este SNP, también con el riesgo a desarrollar nefritis lúpica $P=0.01$, lo cual contrasta con los datos que nosotros obtuvimos $P>0.05$. Lo anterior sugiere que se necesita un análisis más profundo de este SNP para corroborar el verdadero papel que juega en la etiopatogénesis de la enfermedad.

De igual forma los SNPs CRP4 que mostró una tendencia a la asociación, si se encontró asociado aunque débilmente con el riesgo a desarrollar nefritis en paciente con LES de inicio temprano. Este SNP se ha encontrado en fuerte desequilibrio de ligamiento con el alelo T del SNP rs3091244 que se encuentra en un sitio de unión para un factor de transcripción ^[50] y se asocia con niveles basales de CRP por debajo de lo normal, aunado al hecho de que el polimorfismo CRP4 se encuentra en fuerte desequilibrio de ligamiento con el SNP CRP5 $r^2= .95$; la presencia de este haplotipo causa niveles de expresión bajos del gen *CRP* y por lo tanto la depuración defectuosa de complejos inmunes.

Como se mencionó, el alelo T del SNP CRP5 fue el que mostró la asociación más fuerte con el riesgo a desarrollar nefritis en la muestra de pacientes. Este SNP no se ha descrito en otras poblaciones asociado con el riesgo a desarrollar LES u otra enfermedad, aunque este polimorfismo se encuentra en una región intrónica y aparentemente no afectaría la expresión de la proteína; en últimas fechas se han descrito polimorfismo en regiones intrónicas de algunos genes que afectan la expresión de sus proteínas correspondientes ^[51] como un polimorfismo en la región intrónica del gen que codifica para la interleucina 6 (IL-6), que afecta los niveles plasmáticos de esta interleucina. El alelo T de este polimorfismo, tuvo la asociación mas fuerte con el riesgo a desarrollar nefritis en el

grupo de estudio $p=0.02$, lo cual indica que este alelo se encuentra involucrado en la etiopatogénesis de la enfermedad y más concretamente con la susceptibilidad a desarrollar nefritis.

Por otra parte, los complejos inmunes son fijadores de complemento, y estos se fijan en la superficie del glomérulo; por lo que si existe un depuramiento defectuoso de estos complejos, se pueden desencadenar una respuesta inmune hacia estos antígenos y desencadenar daño al riñón. Por lo que la deficiencia de proteínas que se encargan de la depuración de estos restos celulares es clave para el desarrollo de este tipo de patologías.
[53]

Se sabe que para el análisis de OR de 1.2 como es el caso, se requieren tamaños de muestras grandes y aunque se cuenta con un número elevado de pacientes talvez no es suficiente aún para corroborar si efectivamente los SNPs del gen CRP se encuentran asociados o no con la susceptibilidad a desarrollar LES en nuestra población.

OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS

Se cumplió con el objetivo principal de la investigación, ya que se identificó un polimorfismo de susceptibilidad a desarrollar LES en nuestra población, el cual ya había sido identificado como un factor de riesgo a desarrollar LES en otras poblaciones [48].

En cuanto a los objetivos específicos se logró cumplir con los planteados para el presente estudio como se menciona a continuación:

1. Se encontraron evidencias estadísticas de que el alelo T del SNP CRP5 (C/T) se encuentra asociado con el riesgo a desarrollar LES en nuestra población, aunque ejerce un efecto modesto OR= 1.25.
2. Como se mencionó anteriormente, este SNP ejerce un efecto modesto en nuestra población en comparación con lo reportado en estudios previos, aunado a que se identificó un SNP en región intrónica que eleva el riesgo a desarrollar nefritis en los pacientes con LES de inicio pediátrico, el cual no ha sido reportado en otras poblaciones.

3. Se encontraron dos polimorfismos que se asocian con el riesgo a desarrollar nefritis en pacientes con LES, dichos SNPs son: CRP1 (A/T) $P=0.02$, y CRP4 (C/T) $P=0.04$, en ambos SNPs el alelo T fue el de susceptibilidad.
4. La frecuencia de los polimorfismos en nuestra población difiere a la reportada en otras poblaciones, por ejemplo el SNPs CRP1 (A/T) se presentan en mayor frecuencia en nuestra población que lo reportado para Caucásicos y Afro-americanos.

CONCLUSIONES.

El polimorfismo CRP 5 (C/T) se encuentra asociado con el riesgo a desarrollar LES en nuestra población, aunque ejerce un efecto modesto $OR= 1.25$, Al realizar la construcción de haplotipos se observó uno que se encuentra asociado $P<0.05$, el cual se está definido por el alelo T del SNP CRP 5, lo cual confirma que este polimorfismo está involucrado con la susceptibilidad a desarrollar LES e nuestra población. Por otra parte, al correlacionar los SNPs analizados con alguna de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, se encontraron dos que ejercen un efecto modesto al riesgo a desarrollar nefritis, estos SNPs son: CRP1 (A/T) $OR= 1.6$ y CRP4 (C/T) $OR= 1.5$.

Uno de los Haplotipos construidos, también se asocia al riesgo a padecer nefritis, el cual se encuentra definido por los alelos minoritarios de ambos SNPs (haplotipo 2 Tabla 8). Cabe destacar que ambos SNPs se encuentra en fuerte desequilibrio de ligamiento $r^2=95$.

Lo anterior indica que solos algunos polimorfismos el gen *CRP* se encuentran involucrados con el riesgo asociado a Lupus eritematoso sistémico en nuestra población y más aún con el riesgo a padecer nefritis lúpica. Por lo que se requiere de un análisis mas exhaustivo para elucidar el verdadero papel de estos polimorfismos con la susceptibilidad al LES en nuestra población.

BIBLIOGRAFÍA:



1. Wanstrat A, Wakeland E. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol* 2001;2:802 – 809.
2. Arnet FC Jr. The genetics of human lupus. In Dubois' Lupus Erythematosus, edn 5. Edited by Wallace DJ, Hahn BH; Baltimore: Williams and Wilkins, 1997:77-117.
3. Klein-Gitelman M, Reiff A, Silverman ED. Systemic lupus erythematosus in childhood. *Rheum Dis Clin North Am.* 2002;28:561-77.
4. Benseler SM, Silverman ED. Systemic lupus erythematosus. *Pediatr Clin North Am.* 2005;52:443-67.
5. Silverman ED: Pediatric systemic lupus erythematosus. *Future Medicine/Future Rheumatology* 2007: 2:1: pp 23-50.
6. Benseler SM, Silverman E.D Review: Neuropsychiatric involvement in pediatric systemic lupus erythematosus. *Lupus*, August 2007; 16: 564 - 571
7. Brunner HI, Silverman ED, To T, et al. Risk factors for damage in childhood-onset systemic lupus erythematosus: cumulative disease activity and medication use predict disease damage. *Arthritis Rheum* 2002, 46:436-444.
8. Bader-Meunier B, Quartier P, Deschenes G, et al.: Childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arch Pediatr* 2003, 10:147-157.
9. Gazarian M, Feldman BM, Benson LN, et al.: Assessment of myocardial perfusion and function in childhood systemic lupus erythematosus. *J Pediatr* 1998, 132:109-116.
10. Hagelberg S, Lee Y, Bargman J, et al. Long term follow up of childhood lupus nephritis. *J Rheumatol* 2002, 29:2635-2642.

11. Stichweh D, Pascual V: Lupus Eritematoso sistémico pediátrico. *An Pediatr (Barc)* 2005;63 (4):321-9.
12. Mittal G, Mason L, Isenberg D. Immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Future Rheumatology* 2007. 2:1. 93-103.
13. Shai, R. Quismorio, RP Jr. Li, L. Kwon, OJ. Morrison, J. Wallace, DJ. Neuwelt, CM. Brautbar, C. Gauderman, WJ. Jacob, CO. Genome-wide screen for systemic lupus erythematosus susceptibility genes in multiplex families, *Hum Mol Genet* 8 (1999), 639–644.
14. Sheryl J. Boon, MD and Deborah Mc Curdy, MD: *Pediatric Annals* 2002 Jul 31 (7):407-417.
15. Schmutz M, Revel-Vilk S, Hiraki L, Rand ML, Blanchette VS, Silverman ED. Thrombocytopenia and thromboembolism in pediatric systemic lupus erythematosus. *J Pediatr*. 2003; 143:666-9.
16. Tucker, LB. Menon, S. Schaller, JG. Isenberg, DA. Adult- and childhood-onset systemic lupus erythematosus: A comparison of onset, clinical features, serology, and outcome. *Br J Rheumatol*. 1995; 34:866-72.
17. Gray-McGuire C, Moser KL, Gaffney PM, Kelly J, Yu, H, Olson JM, et al. Genome scan of human systemic lupus erythematosus by regression modeling: evidence of linkage and epistasis at 4p16-15.2. *Am J Hum Genet* 2000;67:1460-9
18. Lindqvist, A.K.B. Steinsson, K. Johanneson, B. Kristjánisdóttir, H. Arnasson, A. Gröndal, G. Jonasson, I. Magnusson, V. Sturfelt, G. Truedsson, L. Svenungsson, E. Lundberg, I. Terwilliger, JD. Gyllensten U B. Alarcón-Riquelme ME. A Susceptibility Locus for Human Systemic Lupus Erythematosus (hSLE1) on Chromosome 2q. *J Autoimmunity*, 2000. 14:2 169-178.
19. Baca V, Velázquez-Cruz R, Salas-Martínez G, Espinosa-Rosales F, Saldaña-Álvarez Y,

- Orozco L. Association analysis of the PTPN22 gene in childhood-onset systemic lupus erythematosus in Mexican population. *Genes and Immunity* (2006) 7, 693–695.
20. Tsao BP. The genetics of human systemic lupus erythematosus. *Trends immunol* 2003; 24:595-602.
 21. Johansson, CM. Zunec, R. García, MA. Scherbarth, HR. Tate, GA. Paira, S. Navarro SM. Perandones, CE. Gamron, S. Alvarillos, A. Graf, CE. Manni, J. Berbotto, GA. Palatnik, SA. Catoggio, LJ. Battaglioti, CG. Sebastiani, GD. Migliaresi, S. Galleazzi, M. Pons – Estel, BA. Alarcón – Riquelme, ME. The Collaborative Group on the Genetics of SLE. The Argentine Collaborative Group. Chromosome 17p12-q11 harbors susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Hum Genet* (2004) 115: 230–238
 22. Moser K.L., Neas, B.R., Salmon, J.E., Yu, H., Gray-McGuire, C., Asundi, N., Bruner, GR., Fox, J., Kelly, j., Henshall, S. et al. (1998) Genome scan of human systemic lupus erythematosus: evidence for linkage on chromosome 1q in African-American pedigrees. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95, 14869-14874.
 23. Wakeland EK, Liu K, Graham RR, et al.: Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity* 2001, 15:397-408.
 24. Kelly JA, Moser KL, Harley JB: The genetics of systemic lupus erythematosus: putting the pieces together. *Genes Immun* 2002, 3 (Suppl 1):S71-S85. Very thorough update on the current status of genetic studies in human SLE.
 25. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, et al.: Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 200, 165:5970-5979.
 26. Arce E, Jackson DG, Gill MA, et al.: Increased frequency of pre-germinal center B cells and plasma cell precursors in the blood of children with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001, 167:2361-2369.

27. Mageed RA, Prud'homme GJ: Immunopathology and the gene therapy of lupus. *Gene Ther* 2003, 10:861-874.
28. Gross AJ, Hochberg D, Rand WM, Thorley-Lawson DA: EBV and systemic lupus erythematosus: a new perspective. *J Immunol* 2005, 174:6599-6607.
29. Moon UY, Park SJ, Oh ST, et al.: Patients with systemic lupus erythematosus have abnormally elevated Epstein-Barr virus load in blood. *Arthritis Res Ther* 2004, 6:R295-R302.
30. Renaudineau Y, Pers JO, Bendaou B, et al.: Dysfunctional B cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2004, 3:515-523.
31. Mok CC, Lau CS: Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 2003, 56:481-490.
32. Merryl JT. BLYS antagonists and peptide tolerance induction. *Lupus*. 2005;14(3):204-9
33. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive Protein. *J Biol Chem*. 2004 19;279(47):48487-90.
34. Jönsen, A. Gunnarsson, I. Gullstrand, B. Svenungsson, E. Bengtsson, O. Nived, I. Lundberg, E. Truedsson, L. Sturfelt, G. Association between SLE nephritis and polymorphic variants of the CRP and FcγRIIIa genes. *Rheumatology* 2007;46:1417-1421
35. Croker JA, Kymberly RP. SLE: challenges and candidates in human disease. *Trends Immunol*. 2005 Nov;26(11):580-6.
36. Sfikakis PP, Souliotis VL, Fragiadaki KG, Moutsopoulos HM, Boletis JN, Theofilopoulos AN. Increased expression of the FoxP3 functional marker of regulatory T cells following B cell depletion with rituximab in patients with lupus nephritis. *Clin Immunol*. 2007 Apr;123(1):66-73.

37. Flierman R, Daha MR. The clearance of apoptotic cells by complement. *Immunobiology*. 2007;212(4-5):363-70
38. Graham RR, Ortmann WA, Langefeld CD, Jawaheer D, Selby SA, Rodine PR, Baechler EC, Rohlf KE, Shark KB, Espe KJ, Green LE, Nair RP, Stuart PE, Elder JT, King RA, Moser KL, Gaffney PM, Bugawan TL, Erlich HA, Rich SS, Gregersen PK, Behrens TW. Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet*. 2002 Sep;71(3):543-53
39. Alarcón GS, Calvo-Alén J, McGwin G Jr, Uribe AG, Toloza SM, Roseman JM, Fernández M, Fessler BJ, Vilá LM, Ahn C, Tan FK, Reveille JD; LUMINA Study Group. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic cohort: LUMINA XXXV. Predictive factors of high disease activity over time. *Ann Rheum Dis*. 2006 Sep;65(9):1168-74
40. Grumet FC, Coukell A, Bodmer JG, Bodmer WF, McDevitt HO. Histocompatibility (HL-A) antigens associated with systemic lupus erythematosus. A possible genetic predisposition to disease. *N Engl J Med*. 1971 Jul 22;285(4):193-6.
41. Harley JB, Kelly JA, Kaufman KM. Unraveling the genetics of systemic lupus erythematosus. *Springer Semin Immunopathol*. 2006 Oct;28(2):119-30
42. Gaffney PM, Kearns, G.M., Shark, K.,B., Ortmann, W.A., Selby, S.A., Malmgren, M.L., Rohlf, K.E., Ockenden, T.C., Messner, R.P., King, R.A. et al. (1998) A genome-wide search for susceptibility genes in human systemic lupus erythematosus sib-pair families. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 14875-14879.
43. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:685-711].
44. Blin N, Sttaford D. A general method for isolation of high molecular weigh DNA from eukaryotes. *Nucleic Acid Res* 1976; 3:2303-2308.

45. Gyllenstein UB, Erlich HA. Generation of ssDNA by the PCR and its application to direct sequencing of the HLA DQA locus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 88: 7652-7656.
46. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7276-7280.
47. Marnell Lorraine, Mold Carolyn, Du Clos Terry W. C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clin. Immunol.*, 2005, Vol 117 (2): 104-111.
48. Pzyper Martine Kravits, Shoenfeld Yehuda. Autoimmunity to protective molecules: is it the *perpetuum movile* (vicious cycle) of autoimmune rheumatic diseases?. *Nature clinical practice* 2006 Jul;Vol 2 (9):481-490.
49. Russell, A. Cunninghame-Graham, DS. Shepherd, C. Robertson, CA. et al. Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet*, 2004, Vol. 13 (1): 137-147.
50. Sanger FR, Nicken S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;74:5463-5467.
51. Carlson, CS. Aldred, SF. Lee, PK. Tracy, RP. Schwartz, SM. Rieder, M. Liu, K. Williams, O.D. Iribarren, C. Lewis, E. C Fornage, M. Boerwinkle, E. Gross, M. Jaquish, C. Nickerson, D A. Myers, RM. Siscovick, DS. Reiner, A P. Polymorphisms within the C-Reactive Protein (CRP) Promoter Region are Associated with Plasma CRP Levels. 2005 *Am. J. Hum. Genet.* 77:64-77
52. Szalai AJ, Wu J, Lange EM, McCrory MA, Langefeld CD, Williams A, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the C-reactive protein (CRP) gene promoter that affect transcription factor binding, alter transcriptional activity, and associate with differences in baseline serum CRP level. *J. Mol Med.* 2005; Vol 83 (6):440-

447.

53. Wong Maida, Tsao P. Betty. Current topics in human SLE genetics. Springer Seminars in Immunopathology 2006 Aug 29 PMID: 16941108.
54. Wong, C. K. Szeto, C. C. Chan, M. H. M. Leung, C. B. Li, P. K. T. Lam, C. W. K. Elevation of Pro-Inflammatory Cytokines, C-Reactive Protein and Cardiac Troponin T in Chronic Renal Failure Patients on Dialysis. Immunological Investigations 2007. 36:1 47-57



ANEXO I

CALENDARIO DE ACTIVIDADES					
<i>Tiempo (semanas)</i>					
1	2	3	4	5	6
Captación de pacientes y grupo control					
Extracción del DNA					
		Tipificación de alelos HLA I y HLA II			
		Análisis de discriminación alélica de los SNPs.			
		Combinación de los haplotipos con el programa GENEHUNTER (regresión lineal)			
		Análisis de asociación de los SNPs, por la prueba de TDT y comparación de casos y controles.			
				Publicación	

ANEXO II

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPANTES CON LES.

I. México, D. F. a _____ de _____ de 200__

Por medio de la presente hago constar que mi hijo (a) _____, mi cónyuge y yo (y en caso necesario mis otros hijos), estamos de acuerdo en participar en el proyecto de investigación **"Polimorfismos en genes candidato y su asociación con Lupus Eritematoso Sistémico de inicio en la edad pediátrica."**

Estamos enterados de que nuestra participación en el estudio consistirá únicamente en donar una muestra de 10 ml de sangre venosa por parte de mi hijo (a) enfermo y de 15 ml por parte de mi cónyuge y yo, además de responder preguntas relacionadas con la enfermedad de mi hijo(a).

Se nos ha explicado que la sangre será tomada de una vena del brazo con todos los requisitos de seguridad, como el uso de material nuevo y por personal calificado, por lo que no representa ningún riesgo para nosotros y que la única molestia que podría presentarse es la aparición de un pequeño hematoma o moretón que desaparecerá en 3-5 días. Así mismo, nos han comentado que la información obtenida del estudio genético y de los cuestionarios es absolutamente confidencial y que esta información será manejada únicamente por los investigadores y sólo será utilizada para conocer los antecedentes y evolución de la enfermedad. Estamos consientes de que nuestra participación en el estudio es completamente voluntaria, que participar no implica pago o retribución alguna y que si en medio del proceso decidimos no continuar, toda la información recopilada será eliminada.

Hemos leído la información descrita y nuestras preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente.

Atentamente

Nombre y firma del padre, la madre o el tutor (No. Telefónico)

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma del

He entregado al padre, madre o tutor del participante con LES la información precisa y necesaria sobre los objetivos del proyecto, riesgos, beneficios y derechos que tienen cada uno de los participantes. Declaro que su decisión de participar en el estudio ha sido tomada de manera libre, sin presiones o influencias de ningún tipo, y soy testigo de que esta carta ha sido firmada por el padre o tutor del participante arriba mencionado.

Nombre y firma del Investigador (No. Telefónico)

ANEXO III
HOJA DE CAPTACIÓN DE DATOS

No. de Familia

No. de Paciente

Fecha de evaluación

Nombre del paciente _____

Registro _____

Institución CMN CMR HIM INP Otras

Especificar _____

Fecha de Nacimiento Edad actual años meses

Origen geográfico

Sexo F M

Lugar de Nacimiento _____

Nombre del Padre _____

Lugar de Nacimiento _____

Nombre de la Madre _____

Lugar de Nacimiento _____

Escolaridad: Paciente _____ Padre _____ Madre _____

Antecedentes de Nacionalidad Extranjera en: Padres, Abuelos, Bisabuelos, otros.

Sí No Especificar _____

Dirección _____

Teléfono _____

Médico evaluador:

Nombre _____ Firma _____

Fecha de inicio de los síntomas

Edad al inicio de los síntomas años meses

Fecha en que se establece el diagnóstico

Edad al momento del diagnóstico años meses

Cumple con los criterios de clasificación para LES propuestos por el ACR

Sí No Número de criterios

Existe algún antecedente de Lupus u otra enfermedad autoinmune en la familia

Sí No Especificar:

Enfermedad _____ Parentesco _____

Enfermedad _____ Parentesco _____

Enfermedad _____ Parentesco _____

Enfermedad _____ Parentesco _____

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

I.- SÍNTOMAS CONSTITUCIONALES

- a). Fiebre
- b). Pérdida de peso
- c). Fatiga

I.- MUCOCUTÁNEAS

- a) Eritema malar
- b) Lesiones discoides
- d) Fotosensibilidad
- c) Úlceras nasales/orales
- e) Alopecia
- f) Vasculitis cutánea

Otras (especificar):

II. MUSCULOESQUELÉTICAS

- a) Artralgias
- b) Artritis
- c) Mialgias

Otras (especificar):

III. NEUROPSIQUIÁTRICAS

- a) Crisis convulsivas
- b) Psicosis
- c) Síndrome Orgánico Cerebral
- d) Mielitis Transversa
- e) Cefalea
- f) Enfermedad vascular cerebral
- g) Neuropatía craneal
- h) Neuropatía periférica
- i) Corea

Otras (especificar):

IV.- CARDIOVASCULARES

- a) Pericarditis

b) Miocarditis

c) Infarto al miocardio

d) Valvulopatía

Otras (especificar):

V.-PULMONARES

a) Pleuritis

b) Neumonitis

c) Hemorragia

d) Hipertensión pulmonar

Otras (especificar):

VI.-GASTROINTESTINALES

a) Pancreatitis

b) Hepatitis

c) Peritonitis

Otras (especificar):

VII.-HEMATOLÓGICAS

a) Trombocitopenia

b) Anemia hemolítica

c) Leucopenia

d) Linfopenia

e) Neutropenia

Otras (especificar):

VIII.-RENALES

Nefritis **Sí** **No**

Proteinuria persistente > 0.5g o proteinuria +++ en el EGO **Sí** **No**

Cilindros eritrocitarios, granulados, tubulares, de hemoglobina o mixtos **Sí** **No**

Eritrocituria 10 eritrocitos por campo **Sí** **No**

Elevación de creatinina sérica (1.5 mg/dl) **Sí** **No**

Depuración de Creatinina 100 ml/min/1.73 m2

Sí No

Hipertensión arterial

Sí No

Biopsia renal

Sí No

- a) Glomerulonefritis Clase I
- b) Glomerulonefritis Clase II
- c) Glomerulonefritis Clase III
- d) Glomerulonefritis Clase IV
- e) Glomerulonefritis Clase V

IX.-TROMBOSIS

- a) Arterial
- b) Venosa

X.- OTRAS MANIFESTACIONES

- _____
- _____
- _____
- _____
- _____
- _____

ESTUDIOS INMUNOLÓGICOS:

- a) Anticuerpos antinucleares Positivos Negativos N.D.
- b) Anticuerpos anti-DNA Positivos Negativos N.D.
- c) Anticuerpos anti-Ro Positivos Negativos N.D.
- d) Anticuerpos anti-La Positivos Negativos N.D.
- e) Anticuerpos anti-Sm Positivos Negativos N.D.
- f) Anticuerpos RNP Positivos Negativos N.D.
- g) Anticuerpos anti-Cardiolipina Positivos Negativos N.D.
- h) Anticoagulante lúpico Positivo Negativo N.D.

OTROS ESTUDIOS (especificar):

- _____ Positivo Negativo
- _____ Positivo Negativo
- _____ Positivo Negativo

Anexo IV. CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN PARA LES

1. Rash malar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Eritema fijo, plano o elevado, en las eminencias malares, que tienden a respetar los pliegues nasolabiales.
2. Lupus discoide queratósica puede ocurrir cicatrización	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Placas eritematosas elevadas con descamación adherente y tapones foliculares; atrófica en las lesiones antiguas.
3. Fotosensibilidad por	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Rash que resulta de reacción poco usual a la luz del sol, historia o por observación del médico.
4. Úlceras orales observada	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ulceración oral o nasofaríngea, generalmente indolora, por un médico.
5. Artritis periféricas volumen o	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Artritis no erosiva que afecta dos o más articulaciones caracterizada por dolor a la presión, aumento de derrame.
6. Serositis auscultado de	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	a) Pleuritis; historia convincente de dolor pleural o frote por un médico, o evidencia de derrame pleural. b) Pericarditis: documentada por EKG o frote o evidencia derrame pericárdico.
7. Alteración renal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	a) Proteinuria persistente mayor de 0.5 g por día o mayor de 3+ si no se cuantifica. b) Cilindros celulares: pueden ser de eritrocitos, hemoglobina, granulares, tubulares o mixtos.
8. Alt. Neurológica alteraciones desequilibrio alteraciones cetoacidosis, o desequilibrio hidroelectrolítico.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	a) Convulsiones; en ausencia de fármacos causales o metabólicas conocidas (uremia, cetoacidosis, o hidroelectrolítico). b) Psicosis: en ausencia de fármacos causales o metabólicas conocidas (uremia,
9. Alt. Hematológica ocasiones ocasiones de	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	a) Anemia hemolítica con reticulocitosis. b) Leucopenia: menos de 4000/mm ³ en dos o más c) Linfopenia: menos de 1500/mm ³ en dos o más d) Trombocitopenia: menos de 100,000/mm ³ en ausencia fármacos causales.
10. Alt. Inmunológica anormales. han sido confirmadas con prueba de treponema o prueba de FTA.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	a) Células LE positivas b) Anti-DNA: anticuerpos contra DNA nativo a títulos c) Anti-Sm: anticuerpos contra el antígeno nuclear Sm d) Pruebas serológicas falsas positivas para sífilis que positivas por lo menos 6 meses y inmovilización del
11. ANA fármacos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Título anormal de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia o un ensayo equivalente en ausencia de asociados al síndrome de "lupus inducido por drogas.

Número de criterios positivos

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPANTES VOLUNTARIOS SANOS

México, D. F. a _____ de _____ de 200__

Por medio de la presente hago constar que yo _____ estoy de acuerdo en participar en el proyecto de investigación **“Polimorfismos en genes candidato y su asociación con Lupus Eritematoso Sistémico de inicio en la edad pediátrica.”**

Estoy enterado de que mi participación en el estudio consistirá únicamente en donar una muestra de 15 ml de sangre venosa y responder preguntas relacionadas con mi salud.

Me han explicado que la sangre será tomada de una vena del brazo con todos los requisitos de seguridad, como el uso de material nuevo y por personal calificado, por lo que no representa ningún riesgo para nosotros y que la única molestia que podría presentarse es la aparición de un pequeño hematoma o moretón que desaparecerá en días. Así mismo, me han comentado que la información obtenida del estudio genético y del cuestionario es absolutamente confidencial y que esta información será manejada únicamente por los investigadores.

Estoy consiente de que mi participación en el estudio es completamente voluntaria, que participar no implica pago o retribución alguna y que si en medio del proceso decido no continuar, toda la información recopilada será eliminada.

He leído la información descrita y mis preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente.

Atentamente

Firma del participante voluntario (No. Telefónico)

Nombre y firma del Testigo

Nombre y firma del

Testigo

He entregado al participante la información precisa y necesaria sobre los objetivos del proyecto, riesgos, beneficios y derechos que tiene. Declaro que su decisión de participar en el estudio ha sido tomada de manera libre, sin presiones o influencias de ningún tipo, y soy testigo de que esta carta ha sido firmada por él.

Nombre y firma del Investigador (No. Telefónico)

