

Biomédica 2017;37:260-6
doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3247>

COMUNICACIÓN BREVE

Asociación de variantes polimorfas de los genes *PTPN22*, *TNF* y *VDR* en niños con nefritis lúpica: un estudio de tríos en familias colombianas

Gloria Garavito¹, Eduardo Egea¹, Luis Fang², Clara Malagón³, Carlos Olmos⁴, Luz González³, Pilar Guarnizo⁴, Gustavo Aroca⁵, Guillermo López⁶, Antonio Iglesias⁷

- ¹ División Ciencias de la Salud, Grupo de Investigación en Inmunología y Biología Molecular, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia
- ² Corporación Universitaria Rafael Núñez, Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia
- ³ Ciencias de la Salud, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia
- ⁴ Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia
- ⁵ Ciencias de la Salud, Grupo de Investigación Nefrología, Universidad Simón Bolívar, Barranquilla, Colombia
- ⁶ Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Grupo de Investigación en Biología Celular y Biotecnología, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España
- ⁷ Ciencias de la Salud, Grupo Unidad de Reumatología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introducción. El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmunitaria cuya gravedad varía según la raza, el sexo y la edad de aparición. Esta disparidad también se observa en los marcadores genéticos asociados con la enfermedad presentes en los genes *PTPN22*, *VDR* y *TNF*. La estratificación genética que presentan las diferentes poblaciones en el mundo puede influir en dicha variabilidad.

Objetivo. Analizar la asociación de variantes genéticas de los genes *PTPN22*, *VDR* y *TNF* con nefritis lúpica en niños y su carácter de hereditarias en familias colombianas.

Materiales y métodos. Se llevó a cabo un estudio basado en familias con 46 tríos (caso, padre y madre). Se hizo la genotipificación de las variantes rs2476601 de *PTPN22*, rs361525 y rs1800629 del *TNF*, y TaqI [rs731236], ApaI [rs7975232], BsmI [rs1544410] y FokI [rs2228570] del *VDR*, mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (*quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR). Se estimó el efecto de la transmisión del alelo de riesgo de padres a hijos y el desequilibrio de ligamiento de los loci *VDR* y *TNF*.

Resultados. Se observó que el alelo A de rs2476601 en *PTPN22* se distribuyó en 8,69 % (n=16) de los padres y en 19,5 % (n=18) de los casos, y que su transmisión de padres a hijos fue 17 veces mayor con relación al alelo G (p=0,028). Los polimorfismos de *TNF* y *VDR* no presentaron desequilibrio de transmisión. Las variantes TaqI, ApaI y BsmI del *VDR* presentaron desequilibrio de ligamiento.

Conclusión. Estos hallazgos evidenciaron una asociación del polimorfismo rs2476601 de *PTPN22* con la nefritis lúpica en niños, determinada por su transmisión en el grupo de familias estudiadas.

Palabras clave: lupus eritematoso sistémico; nefritis lúpica; desequilibrio de ligamiento; estudios de asociación genética.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3247>

Association of polymorphic variants of *PTPN22*, *TNF* and *VDR* genes in children with lupus nephritis: A study in Colombian family triads

Introduction: Systemic lupus erythematosus is an autoimmune disease in which the severity varies according to race, sex and age of onset. This variation is also observed in the genetic markers associated with the disease, including *PTPN22*, *VDR* and *TNF* genes. The genetic stratification in different populations worldwide can influence the variability.

Objective: To analyze the heritability of *PTPN22*, *VDR* and *TNF* genetic variants and their association with pediatric lupus nephritis in Colombian families.

Materials and methods: We conducted a family-based study including 46 triads (case, father and mother). The variants rs2476601 of *PTPN22*; rs361525 and rs1800629 of *TNF*, and TaqI [rs731236],

Contribución de los autores:

Gloria Garavito y Eduardo Egea: coordinación general del estudio e interpretación de los resultados

Luis Fang: análisis estadísticos e interpretación de los resultados

Clara Malagón, Carlos Olmos, Luz González, Pilar Guarnizo, Gustavo Aroca y Antonio Iglesias: componente clínico del proyecto

Guillermo López: interpretación de los resultados

Todos los autores participaron por igual en el desarrollo y la elaboración del manuscrito.

Apal [rs7975232], Bsm1 [rs1544410] and FokI [rs2228570] of *VDR* were genotyped by qPCR. The effects of overtransmission of the risk allele from parents to children and linkage disequilibrium at the *VDR* and *TNF* loci were estimated.

Results: We found that allele A of rs2476601 in *PTPN22* was distributed among 8.69 % (n=16) of the parents and 19.5 % (n=18) of the cases; this allele was overtransmitted from parents to children 17 times more often than the G allele (p=0.028). *TNF* and *VDR* polymorphisms did not exhibit transmission disequilibrium. *VDR* TaqI, Apal and Bsm1 variants exhibited linkage disequilibrium.

Conclusion: These findings showed an association between the *PTPN22* rs2476601 polymorphism and pediatric lupus nephritis due to its overtransmission in the group of families studied.

Key words: Lupus erythematosus, systemic; lupus nephritis; linkage disequilibrium; genetic association studies.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v37i3.3247>

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad crónica de carácter autoinmunitario caracterizada por la producción de autoanticuerpos (1,2). Quienes lo padecen pueden presentar una amplia variabilidad clínica o de 'endotipos' debido al compromiso de múltiples sistemas del organismo. En diversos estudios se ha demostrado que el compromiso orgánico y la gravedad de la enfermedad varían según el grupo étnico, el sexo y la edad de aparición (3,4). Se desconocen las causas de la enfermedad, pero se ha demostrado su vínculo con factores hormonales, genéticos y ambientales (5-7).

Por otra parte, entre 10 y 25 % de los pacientes adultos con lupus eritematoso sistémico pueden desarrollar insuficiencia renal, mientras que cerca de 75 % de los niños que lo padecen desarrollan algún grado de compromiso renal y, en algún momento de su evolución, aparece la nefritis lúpica (8). Las formas proliferativas de esta condición, es decir, los tipos III, IV y V, son las más comunes y, a la vez, las más graves, pues pueden evolucionar hacia una nefropatía terminal (9).

En reportes previos, se ha demostrado el papel de algunas variantes genéticas presentes en los genes *PTPN22* (10,11), *VDR* (12,13), *TNF* (14,15), y *HLA* (16,17), entre otros (18), como factores de riesgo o de protección en los diferentes endotipos de lupus eritematoso sistémico, incluida la nefritis lúpica. La mayoría de estos estudios emplean un diseño de asociación genética de casos y controles para la detección de factores genéticos asociados a una enfermedad en particular (19,20). El grado de asociación detectado con este método depende

de que el alelo identificado confiera propensión a la enfermedad, aunque también puede ocurrir que el alelo se encuentre en desequilibrio de ligamiento con un alelo del verdadero gen de propensión (21). Este enfoque metodológico puede arrojar resultados erróneos debido a variables de confusión, como la estratificación poblacional, especialmente cuando se estudian individuos con características multiétnicas como en el caso de las poblaciones latinoamericanas (22). Los estudios basados en familias ofrecen una alternativa exenta del efecto de confusión debido a dicha estratificación poblacional (23).

En el diseño de tríos de casos y padres, se seleccionan las familias a partir del caso índice y se obtiene información de ambos padres, quienes presentan una estratificación poblacional similar a la de su descendencia (24,25). En este tipo de estudios, se puede emplear el test de desequilibrio de transmisión, con el cual se evalúa la transmisión de alelos de los padres heterocigotos a los hijos enfermos (26). En pocos estudios se ha empleado este tipo de diseño en el estudio de marcadores genéticos asociados con la nefritis lúpica en niños, especialmente en Colombia.

El objetivo del presente estudio consistió en analizar la asociación de variantes genéticas de los genes *PTPN22*, *VDR* y *TNF- α* con la nefritis lúpica en niños y su carácter de hereditarias en tríos de familias colombianas con un caso índice de dicha enfermedad.

Materiales y métodos

Población de estudio

Se hizo un estudio de asociación genética con 46 tríos en un contexto familiar. Solo se incluyeron familias en las que ni el padre ni la madre referían antecedentes personales de enfermedades autoinmunitarias. El diagnóstico de lupus eritematoso

Correspondencia:

Gloria Garavito, Universidad del Norte, Km 5 vía Puerto Colombia, Barranquilla, Colombia
Teléfono: (575) 350 9486; fax (575) 359 8852
ggaravit@uninorte.edu.co

Recibido: 22/02/16; aceptado: 03/08/16

sistémico se determinó por la presencia de, al menos, cuatro de los 11 criterios propuestos por el *American College of Rheumatology*, presentes en secuencia o simultáneamente durante el tiempo de observación del individuo (27). La edad de inicio de los síntomas de la falla renal se tuvo en cuenta para establecer la presencia de nefritis lúpica en los niños.

Extracción de ADN genómico

Un equipo compuesto por flebotomistas, investigadores y médicos, se encargó de recolectar 10 ml de sangre venosa periférica por participante en tubos Vacutainer con EDTA dipotásico (Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, USA, Ref: 367856), para la obtención de suero y posterior extracción de ADN genómico. Las muestras se tomaron en ayunas, antes de las 7 a.m.

El ADN se extrajo a partir de la fracción leucoplaquetaria (*buffy coat*) de la muestra de sangre anticoagulada, usando el protocolo de *salting out* modificado y sometiéndola a precipitación con perclorato de sodio (28). La concentración y la calidad del ADN se midieron mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000/2000c (ThermoScientific™, Waltham, MA, USA). Las muestras de ADN genómico y de suero se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -70 °C hasta su posterior análisis.

Genotipificación de los polimorfismos de nucleótido simple

Se hizo la genotipificación de los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) rs2476601 de *PTPN22*, rs1800629 y rs361525 del *TNF- α* , y TaqI [rs731236 A/G], ApaI [rs7975232 A/C], FokI [rs2228570 A/G] y BsmI [rs1544410 C/T] del *VDR* mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando los estuches comerciales TaqMan® SNP Genotyping (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), en un volumen total por reacción de 5 μ l (2,4 μ l de ADN en una concentración aproximada de 10 ng/ μ l, 2,5 μ l de Master Mix-2x y 0,125 μ l de sondas Taqman Genotyping-40x específicas de cada SNP). Todas las reacciones de PCR se hicieron por duplicado. El programa de ciclos consistió en uno inicial de 10 minutos a 95 °C, seguido por 40 de 15 segundos a 92 °C y un minuto a 60 °C. La asignación genotípica se hizo automáticamente mediante la aplicación *Allelic Discrimination* del sistema Applied Biosystems, con una calidad de amplificación mayor o igual a 90 % por muestra. Todas las muestras se analizaron

por duplicado para evitar errores de genotipificación; además, se verificó que no se presentaran inconsistencias mendelianas.

Análisis estadístico

El análisis estadístico consistió en determinar las frecuencias alélicas y genotípicas mediante el programa estadístico SPSS®, versión 20 (IBM SPSS Statistics 20®; IBM Corp., USA). A estas frecuencias se les estimó la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W), empleando el programa Arlequín, versión 3.5.

La segregación de los SNP de *PTPN22*, *VDR* y *TNF* se hizo mediante pruebas estadísticas del desequilibrio de ligamiento, como son el D' y el r^2 , y la transmisión de estas variantes de los padres a los hijos mediante el test de desequilibrio de transmisión. Para estos análisis, se empleó el programa Haploview 4.1. La significación estadística se estableció como un valor de $p < 0,05$.

Consideraciones éticas

Todos los participantes mayores de edad aprobaron, mediante consentimiento informado escrito, su participación voluntaria en el estudio, así como la de sus hijos, autorizando la obtención de muestras biológicas (sangre venosa periférica, ADN genómico y material genético). El Comité de Ética de la División de Ciencias de la Salud de la Universidad del Norte aprobó la realización del estudio.

Resultados

Los casos índice presentaron un promedio de edad de $16,19 \pm 3,48$ años. La aparición del lupus eritematoso sistémico se dio, en promedio, a los $4,47 \pm 3,5$ años. Por otra parte, en 35,8 % de estos casos se registraron antecedentes de enfermedad autoinmunitaria en varios miembros de las familias. Se encontró que la distribución de la enfermedad dependía del sexo, con una frecuencia mayor en niñas: 73,9 % ($n=34$) (cuadro 1).

Distribución de las variantes genéticas de PTPN22, TNF y VDR en las familias de estudio

En cuanto a la distribución alélica de estas variantes, se observó que el alelo A del polimorfismo rs2476601 del *PTPN22* se distribuyó en 8,69 % ($n=16$) de los padres y aumentó a 19,5 % ($n=18$) en los casos. Este efecto también se vio reflejado en la frecuencia del genotipo homocigoto AA y del heterocigoto AG, distribuido en 8,6 % y 21,7 % de los casos índice, respectivamente. Se encontró que el polimorfismo exhibía equilibrio genético

Cuadro 1. Descripción de los casos índice

	n=46	%
Sexo		
Masculino	12	26,10
Femenino	34	73,90
Edad (media ± DE)	16,19 ± 3,48	
Inicio del lupus eritematoso sistémico (años)	4,47 ± 3,53	
Tiempo con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (años)	11,91 ± 2,88	
Antecedentes familiares de enfermedad autoinmunitaria	33	35,87

DE: desviación estándar

de Hardy-Weinberg en los padres ($p=0,689$), mas no así en la descendencia ($p=0,035$). En cuanto a las variantes de *TNF- α* y *VDR*, estas mostraron distribuciones similares entre padres e hijos. Las variantes del *TNF- α* no se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg en los casos índice (cuadro 2).

Desequilibrio de ligamiento y transmisión genética de *PTPN22*, *TNF* y *VDR*

Dado que presentaron más de una variante en la genotipificación, se estimó el desequilibrio de ligamiento de los SNP de *TNF- α* y *VDR*, lo cual permitió detectar un bloque de 1 kb de distancia genómica entre los SNP rs731236, rs7975232 y rs1544410 mediante el método de *solid spine*, el cual abarca la región comprendida entre las posiciones 46.525.024 y 46.526.102 del cromosoma 12 del gen *VDR*. Estos tres polimorfismos demostraron un desequilibrio significativo, con un D' de 0,807 y un r^2 de 0,538 (figura 1). En cuanto al *TNF*, se observó la segregación de los dos polimorfismos en un bloque de 3 kb (figura 2).

Asimismo, se evaluó la posibilidad de heredar los polimorfismos determinados por genotipificación mediante el test de desequilibrio de transmisión y se demostró que el alelo A de rs2476601 en el *PTPN22* se había transmitido de los padres a la descendencia con nefritis lúpica, con una razón de 17 a 6 veces más que el alelo G ($p=0,028$). La transmisión de padres a hijos de los demás polimorfismos no fue significativa (cuadro 3).

Discusión

Este es uno de los pocos estudios en Colombia con un diseño basado en las familias para evaluar la asociación y la posibilidad de heredar variantes genéticas en los *loci* *PTPN22*, *TNF* y *VDR* con propensión al endotipo de nefritis lúpica del lupus eritematoso sistémico en niños. Este tipo de diseño es ideal en el estudio de enfermedades

Cuadro 2. Frecuencia genotípica y alélica de los SNP de *PTPN22*, *TNF* y *VDR*

	Tríos					
	Padres		H-W†	Casos		H-W†
	n=92	%		n=46	%	
<i>PTPN22</i> [rs2476601]						
AA	1	1,08		4	8,69	
AG	14	15,2		10	21,73	
GG	77	83,6		32	69,5	
A	16	8,69	0,689	18	19,56	0,035*
G	168	91,30		74	80,43	
<i>TNF</i> [rs361525]						
AA	1	1,08		---	---	
AG	12	13,04		7	15,21	
GG	79	85,86		39	84,78	
A	14	7,60	0,488	7	7,60	0,00*
G	170	92,39		85	92,39	
<i>TNF</i> [rs1800629]						
AA	---	---		1	2,17	
AG	14	15,2		3	6,52	
GG	78	84,7		42	91,3	
A	14	7,60	0,00*	5	5,43	0,013*
G	170	92,39		87	94,56	
<i>VDR</i> /TaqI [rs731236]						
AA	48	52,1		24	52,1	
AG	34	36,9		17	36,9	
GG	10	10,8		5	10,86	
A	130	70,6	0,296	65	70,65	0,460
G	54	29,34		27	29,34	
<i>VDR</i> /ApaI [rs7975232]						
AA	21	22,82		10	22,72	
AC	48	52,17		23	52,27	
CC	23	25,0		11	25,0	
A	90	48,91	0,673	43	48,86	0,760
C	94	51,08		45	51,13	
<i>VDR</i> /BsmI [rs1544410]						
CC	1	1,09		2	4,44	
CT	38	41,7		18	40,0	
TT	52	57,14		25	55,5	
C	40	21,97	0,037*	22	24,4	0,578
T	142	78,02		68	75,5	
<i>VDR</i> /FokI [rs2228570]						
AA	11	11,95		8	17,39	
AG	53	57,60		22	47,82	
GG	28	30,43		16	34,78	
A	75	40,76	0,064	38	41,3	0,926
G	109	59,23		54	58,6	

†: test de equilibrio de Hardy-Weinberg mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov

*: $p<0,05$

que aparecen a temprana edad (29). Como se pudo observar en este estudio, la edad promedio de inicio de la enfermedad fue a los cuatro años, aproximadamente, lo cual aumenta la probabilidad de que se produzca daño renal (8).

Se han hecho algunos estudios en población colombiana sobre la asociación entre el lupus eritematoso sistémico y los polimorfismos de *PTPN22*

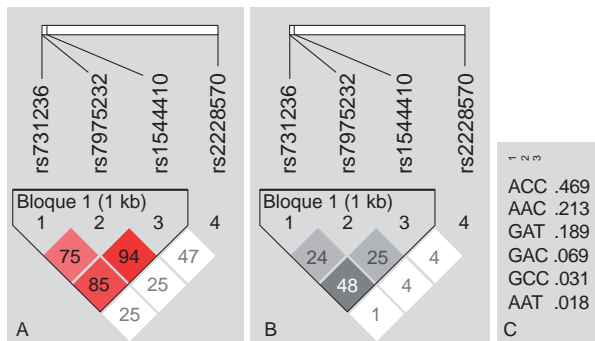


Figura 1. Mapa *pair-wise* del desequilibrio de ligamiento de los SNP del *VDR* evaluados en los tríos. Se detectó un bloque mediante el método *solid spine* que recogió la información genética de los SNP TaqI, ApaI y BsmI. **A)** Se muestra un desequilibrio de ligamiento más marcado entre los polimorfismos rs731236, rs7975232 y rs1544410, con un D' de 0,852 y una puntuación LOD de 16,32. **B)** En el bloque 1 se observa un r^2 de 0,485. **C)** Se observa la frecuencia haplotípica del bloque 1.

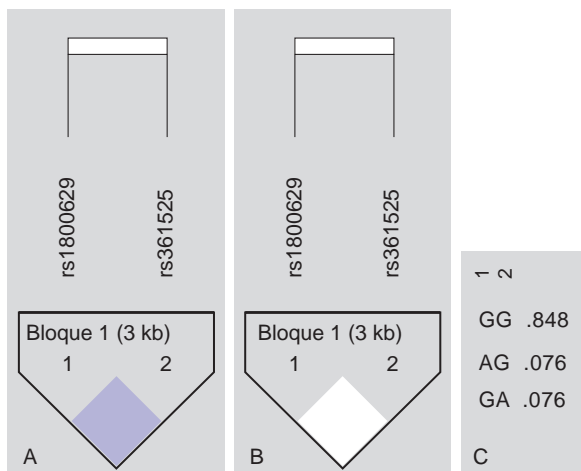


Figura 2. Mapa *pair-wise* del desequilibrio de ligamiento de los SNP de *TNF* evaluados en los tríos. Se detectó un bloque mediante el método *solid spine* que recogió la información genética de los dos SNP de *TNF* caracterizados por genotipificación. **A)** Se muestra un evidente desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs1800629 y rs361525 con un D' de 1,0 y una puntuación LOD de 0,5. **B)** Se observa un r^2 de 0,007. **C)** Se describe la frecuencia haplotípica del bloque.

(10,11), *VDR* (12,13) y *TNF* (14,15). Sin embargo, hasta la fecha solo en el estudio de Ramírez, et al. (11), se había reportado la asociación del polimorfismo rs2476601, también conocido como C1858T, del gen *PTPN22*. En dicho estudio, los autores encontraron una asociación significativa entre dicho SNP y la propensión a esta enfermedad y a la artritis reumatoide. Cabe aclarar que, en ese estudio, se empleó un diseño de casos y controles con individuos de diferentes zonas de Colombia. En el presente estudio, se corroboró la asociación

Cuadro 3. Transmisión de los SNP de *PTPN22*, *TNF* y *VDR* según el análisis por tríos

	SNP	Alelo transmitido	T:U	p
<i>PTPN22</i>				
	rs2476601	A	17:6	0,028*
<i>TNF</i>				
	rs1800629	G	9:5	0,285
	rs361525	---	6:6	1,0
	Haplotipos	Frecuencia		
	GG	0,848	14:10	0,414
	AG	0,076	5:9	0,285
	GA	0,076	6:6	1,000
<i>VDR</i>				
	rs731236	---	17:17	1,000
	rs7975232	A	23:22	0,881
	rs1544410	T	20:17	0,621
	rs2228570	A	27:26	0,890
	Haplotipos	Frecuencia		
	ACCG	0,239	20.1 : 19.0	0,8668
	ACCA	0,230	17.2 : 19.4	0,7148
	GATG	0,139	14.4 : 9.6	0,3284
	AACG	0,131	12.6 : 9.7	0,5508
	AACA	0,081	8.7 : 6.8	0,6338
	GACG	0,055	1.1 : 7.8	0,023*
	GATA	0,050	4.1 : 4.8	0,8033
	GCCA	0,023	2.8 : 1.4	0,4917
	AATG	0,018	0.5 : 2.9	0,1915
	GACA	0,015	2.4 : 0.8	0,3727

T: alelo que se transmite de padres a hijos
 U: alelo que no se transmite de padres a hijos
 *: p<0,05

observada para este polimorfismo y la nefritis lúpica en niños de familias colombianas; además, se describió la forma en que el alelo de riesgo es heredado de padres a hijos. En las publicaciones sobre marcadores de propensión y nefritis lúpica en niños, no se han presentado resultados que asocien este polimorfismo con un efecto funcional, como tampoco se ha encontrado su asociación con algún subgrupo de la enfermedad.

En este estudio, no se evidenció ninguna asociación entre las variables genéticas estudiadas de los *loci* de *TNF* y *VDR* con el endotipo de la nefritis lúpica en niños; además, estas mostraron un comportamiento de segregación similar entre los alelos. En Colombia, no se han reportado datos sobre marcadores de propensión relacionados con estas variantes y esta enfermedad. Como ya se mencionó, la variabilidad observada en los resultados de los diversos estudios a nivel mundial, muy probablemente, se deba a la estratificación poblacional de cada muestra de estudio. Sin embargo, en el presente estudio, las variantes TaqI, ApaI y BsmI del *VDR* exhibieron un desequilibrio de ligamiento, lo cual sugiere que, a pesar de no estar

relacionados directamente con la enfermedad, si son cercanos a otros marcadores asociados con la nefritis lúpica en niños.

Entre las limitaciones de este estudio cabe señalar un tamaño de muestra relativamente pequeño, debido a la frecuencia del endotipo estudiado y la disponibilidad de las muestras biológicas del trío completo, lo cual, aunado a la posible estratificación deficiente de la población estudiada, explicaría el desequilibrio genético de Hardy-Weinberg en los SNP de *VDR* y *TNF* observados en padres e hijos. Por lo tanto, los resultados aquí presentados son aplicables exclusivamente a esta muestra de familias colombianas.

Puede concluirse, entonces, que en el caso particular de la nefritis lúpica en los niños de las familias estudiadas, el alelo A del polimorfismo rs2476601 del gen *PTPN22*, heredado de sus padres, presentó una asociación directa con la enfermedad. Estos resultados sirven de base para el planteamiento de futuros estudios epidemiológicos de asociación con un mayor número de familias y de grupos multiétnicos similares a la población colombiana.

Agradecimientos

A Colciencias y a la Universidad del Norte, por sus aportes a la financiación de esta investigación. A nuestros pacientes, por su colaboración. A Nicole Samuel Pereira Sanandrés, por la revisión del manuscrito.

Conflicto de intereses

Los autores del presente estudio declaran no tener conflicto de intereses con respecto al estudio.

Financiación

Colciencias (contrato 652-2009) y Universidad del Norte

Referencias

- Bonanni A, Vaglio A, Bruschi M, Sinico RA, Cavagna L, Moroni G, et al.** Multi-antibody composition in lupus nephritis: Isotype and antigen specificity make the difference. *Autoimmun Rev.* 2015;14:692-702. <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2015.04.004>
- Mohan C, Putterman C.** Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11:329-41. <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2015.33>
- Pons-Estel BA, Catoggio LJ, Cardiel MH, Soriano ER, Gentiletti S, Villa AR, et al.** The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus: Ethnic and disease heterogeneity among "Hispanics". *Medicine (Baltimore).* 2004;83:1-17. <http://dx.doi.org/10.1097/01.md.0000104742.42401.e2>
- Ramírez-Gómez LA, Uribe-Uribe O, Osio-Uribe O, Grisales-Romero H, Cardiel MH, Wojdyla D, et al.** Childhood systemic lupus erythematosus in Latin America. The GLADEL experience in 230 children. *Lupus.* 2008;17:596-604. <http://dx.doi.org/10.1177/0961203307088006>
- Makashir SB, Kottyan LC, Weirauch MT.** Meta-analysis of differential gene co-expression: Application to lupus. *Pac Symp Biocomput.* 2015;443-54. http://dx.doi.org/10.1142/9789814644730_0042
- Dema B, Charles N.** Advances in mechanisms of systemic lupus erythematosus. *Discov Med.* 2014;17:247-55.
- Kunz M.** Lupus erythematosus. Part I: Epidemiology, genetics and immunology. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2013;11:709-19. <http://dx.doi.org/10.1111/ddg.12165>
- Sinha R, Raut S.** Pediatric lupus nephritis: Management update. *World J Nephrol.* 2014;3:16-23. <http://dx.doi.org/10.5527/wjn.v3.i2.16>
- Ortega LM, Schultz DR, Lenz O, Pardo V, Contreras GN.** Review: Lupus nephritis: Pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions. *Lupus.* 2010;19:557-74. <http://dx.doi.org/10.1177/0961203309358187>
- Shi L, Wei Y, Xun W, Han D.** Meta-analysis of the correlation between *PTPN22* gene polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Asia Pac J Public Health.* 2013;25(Suppl.4):22S-9. <http://dx.doi.org/10.1177/1010539513496268>
- Ramírez M, Quintana G, Díaz-Gallo LM, Caminos J, Garcés M, Cepeda L, et al.** The *PTPN22* C1858T variant as a risk factor for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus but not for systemic sclerosis in the Colombian population. *Clin Exp Rheumatol.* 2012;30:520-4.
- Hu W, Niu G, Lin Y, Chen X, Lin L.** Impact of the polymorphism in vitamin D receptor gene *Bsm1* and the risk of systemic lupus erythematosus: An updated meta-analysis. *Clin Rheumatol.* 2015;35:927-34. <http://dx.doi.org/10.1007/s10067-015-3157-x>
- Mao S, Huang S.** Association between vitamin D receptor gene *Bsm1*, *Fok1*, *Apal* and *TaqI* polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus: A meta-analysis. *Rheumatol Int.* 2014;34:381-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-013-2898-6>
- Pan HF, Leng RX, Wang C, Qin WZ, Chen LL, Zha ZQ, et al.** Association of *TNF-alpha* promoter-308 A/G polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus: A meta-analysis. *Rheumatol Int.* 2012;32:2083-92. <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-011-1924-9>
- Zou YF, Feng XL, Pan FM, Su H, Tao JH, Ye DQ.** Meta-analysis of *TNF-alpha* promoter - 238A/G polymorphism and SLE susceptibility. *Autoimmunity.* 2010;43:264-74. <http://dx.doi.org/10.3109/08916930903509049>
- Niu Z, Zhang P, Tong Y.** Value of HLA-DR genotype in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: A meta-analysis. *Int J Rheum Dis.* 2015;18:17-28. <http://dx.doi.org/10.1111/1756-185X.12528>
- Pan CF, Wu CJ, Chen HH, Dang CW, Chang FM, Liu HF, et al.** Molecular analysis of HLA-DRB1 allelic associations with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis in Taiwan. *Lupus.* 2009;18:698-704. <http://dx.doi.org/10.1177/0961203308101955>

18. **Ghodke-Puranik Y, Niewold TB.** Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015;64:125-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2015.08.004>
19. **Lewis CM.** Genetic association studies: Design, analysis and interpretation. *Brief Bioinform.* 2002;3:146-53. <http://dx.doi.org/10.1093/bib/3.2.146>
20. **Campbell H, Rudan I.** Interpretation of genetic association studies in complex disease. *Pharmacogenomics J.* 2002;2:349-60. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.tpj.6500132>
21. **Robinson MR, Wray NR, Visscher PM.** Explaining additional genetic variation in complex traits. *Trends Genet.* 2014;30:124-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2014.02.003>
22. **Kaufman JS, Cooper RS.** Commentary: Considerations for use of racial/ethnic classification in etiologic research. *Am J Epidemiol.* 2001;154:291-8. <http://dx.doi.org/10.1093/aje/154.4.291>
23. **Jenkins JM, McGowan P, Knafo-Noam A.** Parent-offspring transaction: Mechanisms and the value of within family designs. *Horm Behav.* 2016;77:53-61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.06.018>
24. **Infante-Rivard C, Mirea L, Bull SB.** Combining case-control and case-trio data from the same population in genetic association analyses: Overview of approaches and illustration with a candidate gene study. *Am J Epidemiol.* 2009;170:657-64. <http://dx.doi.org/10.1093/aje/kwp180>
25. **Santos JL, Pérez F, Carrasco E, Albala C.** Uso de tríos caso-padres en estudios epidemiológicos de asociación entre polimorfismos genéticos y enfermedades complejas. *Rev Med Chil.* 2002;130:1307-15. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872002001100016>
26. **Guo W, Fung WK.** Combining the case-control methodology with the small size transmission/disequilibrium test for multiallelic markers. *Eur J Hum Genet.* 2005;13:1007-12. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201453>
27. **Hochberg MC.** Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1725. [http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131\(199709\)40:9<1725::AID-ART29>3.0.CO;2-Y](http://dx.doi.org/10.1002/1529-0131(199709)40:9<1725::AID-ART29>3.0.CO;2-Y)
28. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
29. **Laird NM, Lange C.** Family-based designs in the age of large-scale gene-association studies. *Nat Rev Genet.* 2006;7:385-94. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg1839>