



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA Y TECNOLOGÍA  
QUÍMICA**

**TESIS DE GRADO PARA OBTENER EL TITULO DE DOCTOR  
DEL ESTUDIANTE**

**Eduardo Egea Bermejo MD. Esp. MSc.**





**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA Y TECNOLOGÍA  
QUÍMICA**

**TESIS DE GRADO PARA OBTENER EL TITULO DE DOCTOR  
DEL ESTUDIANTE**

**Eduardo Egea Bermejo MD. Esp. MSc.**

**TITULO**

**ESTUDIO DE VARIANTES GENÉTICAS DE LOS SISTEMAS *VDR*, *MHC*, *PTPN22*, *TNF* Y BIOMARCADORES METABÓLICOS ASOCIADOS A LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO EN PACIENTES COLOMBIANOS.**

**Palabras claves:** LES, Nefritis Lúpica, MHC, PTPN22, TNF alfa, VDR, Vitamina D, Leptina, Adipoleptina, población Colombia.

**Key words:** LES, Class IV Lupus Nephritis, MHC, PTPN22, TNF alfa, VDR, Vitamin D, Leptin, Adiponectin, Caribbean Colombia population.

**UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR**

**ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR**

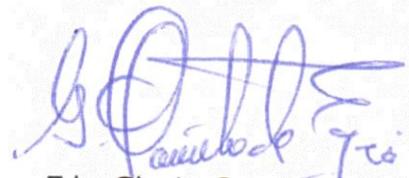
**ESTUDIO DE VARIANTES GENÉTICAS DE LOS SISTEMAS *VDR, MHC,*  
*PTPN22, TNF* Y BIOMARCADORES METABÓLICOS ASOCIADOS A LUPUS  
ERITEMATOSO SISTÉMICO EN PACIENTES COLOMBIANOS.**

Memoria de tesis presentada por **Eduardo Egea Bermejo MD. Esp. MSc.**  
Licenciado en Medicina para optar al grado de **DOCTOR.**

Los Directores



**GUILLERMO LÓPEZ LLUCH**  
Profesor Titular Biología Celular



**GLORIA GARAVITO DE EGEEA**  
Profesor Asociado Division Ciencias  
de la salud. Universidad del

NorteSevilla, a 29 de Septiembre de 2015



## CENTRO ANDALUZ DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO

**D. GUILLERMO LÓPEZ LLUCH**, DOCTOR EN CIENCIAS POR LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA Y PROFESOR TITULAR DE BIOLOGÍA CELULAR DEL ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, ANATOMÍA, Y BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

INFORMA

Que, **Don Eduardo Egea Bermejo** Licenciada en Medicina, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “**ESTUDIO DE VARIANTES GENÉTICAS DE LOS SISTEMAS *VDR*, *MHC*, *PTPN22*, *TNF* Y BIOMARCADORES METABÓLICOS ASOCIADOS A LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO EN PACIENTES COLOMBIANOS**”, y que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al grado de Doctor.

Y para que conste, firmo el presente en Sevilla a 29 de septiembre de dos mil quince.

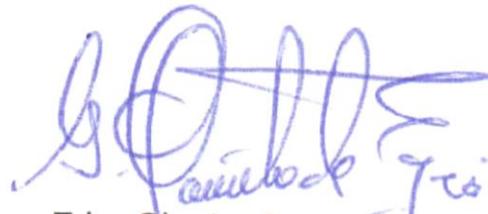
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS MEDICA**  
**DIVISION CIENCIAS DE LA SALUD. UNIVERIDAD DEL NORTE**

**GLORIA GARAVITO DE EGEA MD**, DOCTOR EN INMUNOLOGÍA POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS MÉDICAS Y JEFE DEL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, DIVISIÓN CIENCIAS DE LA SALUD UNIVERSIDAD DEL NORTE.

INFORMA

Que, **Don Eduardo Egea Bermejo** Licenciada en Medicina, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“ESTUDIO DE VARIANTES GENÉTICAS DE LOS SISTEMAS VDR, MHC, PTPN22, TNF Y BIOMARCADORES METABÓLICOS ASOCIADOS A LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO EN PACIENTES COLOMBIANOS”**, y que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al grado de Doctor.

Y para que conste, firmo el presente en Sevilla a 29 de septiembre de dos mil quince.



## **DEDICATORIA**

**Dedico este trabajo a:**

**Dios, fuente suprema de toda creación, por guiar mi vida por los senderos del bien**

**A mi esposa Gloria, mi mentor, asesor y soporte en el diario vivir. Por su comprensión y acompañamiento durante mi trabajo.**

**A mis hijos: Eduardo Enrique, Antonio, Gloria Eliana y Angeline y a todos mis nietos: mi familia, el orgullo y motivo de mi existencia**

**A mis padres quienes me dieron la vida**

**A todos los paciente y personas que participaron en este estudio**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A:**

### **Dr Guillermo Lopez Luch ,**

Mi tutor. Por su permanente Apoyo , orientación y acompañamiento en la dirección y el desarrollo de esta tesis. Por su experiencia y comprensión a lo largo de este ejercicio académico e investigativo

### **Dr . Jose Angel Armengol.**

Gestor e impulsor de esta decisión de vida. Sin su colaboración , consejos y recomendaciones , no hubiese sido posible culminar este trabajo.

### **Dra Gloria Garavito**

Por su apoyo en el diseño y en el trabajo experimental y su acompañamiento y al constante estímulo a lo largo de este trabajo

### **MSc. Luis Fang**

Asesor estadístico, compañero y amigo. Por su invaluable colaboración en el análisis de la data de esta tesis

### **Dr Javier Marrugo**

Compañero en la Universidad, quien me informo , oriento y acompaño al inicio de mi vinculación con la Universidad Pablo de la Olavide.

### **SOFÍA MORENO, SAMUEL PEREIRA, FERNANDO DE LA CRUZ, DORIS OLIER Y BRAYAN BAYONA**

Compañeros de Laboratorio; quienes me ayudaron en momentos en que se requirió su colaboración en el banco de trabajo.

### **Drs Antonio Iglesias y Clara Malagon**

Mis compañeros de trabajo clínico,. Sin su ayuda en el acopio de los pacientes

No hubiese sido posible adelantar el trabajo de laboratorio.

**AI DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA, Y BIOLOGÍA CELULAR DE LA  
UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE . AL CENTRO ANDALUZ Y A LA UNIVERSIDAD  
PABLO DE OLAVIDE**

Por darme un espacio en su nicho academico e investigativo.

**Al Departamento Nacional de Ciencia y Tecnologia - COLCIENCIAS- y a la  
Universidad del Norte**

Por la Finaciacion de esta Tesis

# CONTENIDO

	Pag
1. RESUMEN.....	17
2.INTRODUCCIÓN.....	23
3. MARCO TEÓRICO.....	32
3.1 GENÉTICA DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES.....	40
3.1.1 Estudios de ligamiento.....	41
3.1.2 Estudios de asociación.....	43
3.1.3 Estudios de asociación del genoma completo.....	43
3.1.4 Polimorfismos de nucleótido solo (SNPs).....	44
3.1.5 Selección de genes candidatos.....	44
3.2 GENÉTICA DEL LES.....	45
3.3 OTROS SISTEMAS GENÉTICOS INVOLUCRADOS EN EL LUPUS.....	49
3.3.1 Polimorfismo genético del receptor de la vitamina D (VDR).....	49
3.3.1.1 Vitamina D.....	50
3.3.1.2 Gen VDR.....	54
3.3.1.3 Dominios estructurales del VDR.....	55
3.3.1.4 Polimorfismos en el gen VDR.....	56
3.3.2 La deficiencia de vitamina D en pacientes con LES.....	58
3.3.3 Polimorfismo del gen VDR en pacientes con LES.....	61
3.4 GENES MHC Y ANTÍGENO LEUCOCITARIO HUMANO HLA.....	62
3.5 GEN DE LA PROTEINA TIROSINA PHOSPHATASA PTPN22.....	65
3.6 TNF ALFA.....	68

3.7 BIOMARCADORES ASOCIADOS A LUPUS.....	71
3.7.1 Adiponectinas.....	71
3.7.2 Leptina.....	72
3.7.3 El papel de las adipocinas en LES.....	73
3.7.3.1 Leptina.....	73
3.7.3.2 Adiponectina.....	74
3.8 AUTOANTICUERPOS EN EL LUPUS.....	74
4. OBJETIVOS DE LOS PROYECTOS DE LA TESIS.....	77
4.1 PROYECTO I.....	77
4.1.1 Objetivo General.....	77
4.1.2 Objetivos Específicos.....	77
4.2 PROYECTO II.....	78
4.2.1 Objetivo General.....	78
4.2.2 Objetivos Específicos.....	78
4.3 PROYECTO III.....	79
4.3.1 Objetivo General.....	79
4.3.2 Objetivos Específicos.....	79
5. METODOLOGÍA DEL PROYECTO DE LA TESIS.....	80
5.1 METODOLOGÍA DESARROLLADA.....	80
5.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	81
5.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	82
5.4 VARIABLES DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS, PARACLÍNICAS Y DE HISTORIA FAMILIAR.....	82

5.5 MUESTRA.....	83
5.6 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE VITAMINA D Y ADIPONECTINAS EN SUERO.....	84
5.6.1 Las adiponectinas.....	85
5.7 IDENTIFICACIÓN DE AUTOANTICUERPOS.....	88
5.8 OBTENCION DE ADN.....	88
5.9 GENOTIPIFICACIÓN HLA.....	89
5.10 GENOTIPIFICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS PTPN22, TNF Y VDR.....	92
5.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	98
6. RESULTADOS.....	100
6.1 PROYECTO I.....	101
6.2 PROYECTO II.....	112
6.3 PROYECTO III.....	131
7. DISCUSIÓN.....	143
8. CONCLUSIONES.....	152
9. REFERENCIAS.....	155



## LISTA DE FIGURAS

Figura 0-1. Interacción entre los factores ambientales y los posibles factores genéticos estudiados sobre la respuesta inmunológica en LES.....	25
Figura 0-2. Mapa conceptual de la Tesis Doctoral.....	28
FIGURA 3-1. COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD - BRAZO CORTO DEL CROMOSOMA 6.....	47
FIGURA 3-2. SÍNTESIS Y METABOLISMO DE LA VITAMINA D. ....	51
FIGURA 3-3. GEN VDR .....	55
<b>FIGURA 3-4. DOMINIOS ESTRUCTURALES DEL VDR. ....</b>	<b>56</b>
FIGURA 3-5. POLIMORFISMOS DEL VDR.....	58
FIGURA 3-6. LOCALIZACIÓN Y ORGANIZACIÓN DEL COMPLEJO HLA EN EL CROMOSOMA 6. ....	63
FIGURA 3-7. LOCALIZACIÓN DEL GEN PTPN22 EN EL CROMOSOMA 1. ....	66
FIGURA 3-8. LOCALIZACIÓN Y ESTRUCTURA DEL TNF-ALFA.....	68
FIGURA 6.1-1 CONCENTRACIONES SÉRICAS DE VITAMINA D EN CASOS CON LES. ....	111
FIGURA 6.1-2 CONCENTRACIÓN DE VITAMINA D SEGÚN VALORES DE REFERENCIA.....	111
FIGURA 6.2-1 CONCENTRACIONES SÉRICAS DE VITAMINA D EN INDIVIDUOS CON NFIV. ....	126
FIGURA 6.2-2 CONCENTRACIÓN DE VITAMINA D SEGÚN VALORES DE REFERENCIA.....	126
FIGURA 6.3-1 VITAMINA D EN NIÑOS CON NLP. ....	136
FIGURA 6.3-2 LEPTINA EN NIÑOS CON NLP. ....	137
FIGURA 6.3-3 ADIPONECTINA EN NIÑOS CON NLP. ....	137



## LISTA DE TABLAS

TABLA 3-1. CRITERIOS DEL COLEGIO AMERICANO DE REUMATOLOGÍA PARA LA CLASIFICACIÓN DEL LUPUS (REVISADOS EN 1982 Y EN 1997) .....	34
TABLA 3-2. PUNTUACIÓN DE SLEDAI 2000. ....	36
TABLA 3-3. CLASIFICACIÓN DE LA NL ISN/RPS. ....	39
TABLA 3-4. GENES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO CATEGORIZADOS POR NIVEL DE EVIDENCIA . .....	47
<b>TABLA 6.1-1. ASOCIACIÓN DEL LOCUS PTPN22 CON LES. ....</b>	<b>102</b>
<b>TABLA 6.1-2 ASOCIACIÓN DEL LOCUS VDR CON LES. ....</b>	<b>103</b>
<b>TABLA 6.1-3. DISTRIBUCIÓN ALÉLICA DEL LOCUS HLA-DRB1 Y SU ASOCIACIÓN CON LES. ....</b>	<b>104</b>
<b>TABLA 6.1-4. DISTRIBUCIÓN ALÉLICA DEL LOCUS HLA-DRB1 (GRUPOS) Y SU ASOCIACIÓN CON LES. ....</b>	<b>105</b>
<b>TABLA 6.1-5. DISTRIBUCIÓN ALÉLICA DEL LOCUS HLA-DQB1 Y SU ASOCIACIÓN CON LES. ....</b>	<b>106</b>
<b>TABLA 6.1-6. DISTRIBUCIÓN DEL LOCUS HLA-DQB1 (GRUPOS) Y SU ASOCIACIÓN CON LES. ....</b>	<b>107</b>
<b>TABLA 6.1-7. ASOCIACIÓN DE HAPLOTIPOS DE VDR COMO FACTORES DE RIESGO DE LES. ....</b>	<b>108</b>
<b>TABLA 6.1-8. ASOCIACIÓN DE HAPLOTIPOS DE LOS LOCI *DRB1-*DQB1 COMO FACTOR DE RIESGO DE LES. ....</b>	<b>109</b>
<b>TABLA 6.1-9. DISTRIBUCIÓN ALÉLICA DEL LOCUS HLA-DRB1 Y SU ASOCIACIÓN CON LA VITAMINA D. ....</b>	<b>110</b>
<b>TABLA 6.2-1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO. ....</b>	<b>113</b>
<b>TABLA 6.2-2. ASOCIACIÓN DEL SNP rs2476601 DEL GEN PTPN22 CON NF-IV. ....</b>	<b>114</b>
<b>TABLA 6.2-3. DISTRIBUCIÓN GENOTÍPICA Y ALÉLICA DEL LOCUS TNF. ....</b>	<b>115</b>
<b>TABLA 6.2-4. ASOCIACIÓN DEL LOCUS VDR CON LA PRESENCIA DE NF-IV. ....</b>	<b>117</b>
<b>TABLA 6.2-5. DISTRIBUCIÓN ALÉLICA DEL LOCUS HLA-C. ....</b>	<b>118</b>
<b>TABLA 6.2-6. DISTRIBUCIÓN ALÉLICA DEL LOCUS HLA-B. ....</b>	<b>119</b>
<b>TABLA 6.2-7. DISTRIBUCIÓN ALÉLICA DEL LOCUS HLA-DRB1. ....</b>	<b>120</b>
<b>TABLA 6.2-8. DISTRIBUCIÓN ALÉLICA DEL LOCUS HLA-DQB1. ....</b>	<b>122</b>
<b>TABLA 6.2-9. FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS DE LOS LOCI TNF-HLA Y SU ASOCIACIÓN CON LA ENFERMEDAD. ....</b>	<b>124</b>
<b>TABLA 6.2-10. ASOCIACIÓN DE HAPLOTIPOS DE VDR COMO FACTORES DE RIESGO DE NF-IV. ....</b>	<b>125</b>
<b>TABLA 6.2-11. ASOCIACIÓN DE LOS LOCI PTPN22, TNF Y VDR CON LA VITAMINA D. ....</b>	<b>128</b>
<b>TABLA 6.2-12. FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS DE LOS LOCI TNF-HLA Y SU ASOCIACIÓN CON LA VITAMINA D. ....</b>	<b>129</b>
<b>TABLA 6.2-13. FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS DEL LOCUS VDR Y ASOCIACIÓN CON LA VITAMINA D. ....</b>	<b>130</b>
<b>TABLA 6.3-1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO. ....</b>	<b>131</b>
<b>TABLA 6.3-2. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS DE LOS SNPs DE PTPN22, TNF Y VDR. ....</b>	<b>133</b>
<b>TABLA 6.3-3. FRECUENCIAS ALÉLICAS DEL LOCUS HLA-DQB. ....</b>	<b>134</b>
<b>TABLA 6.3-4. FRECUENCIAS ALÉLICAS DE HLA-DRB1. ....</b>	<b>135</b>

<b>TABLA 6.3-5. CONCENTRACIONES DE BIOMARCADORES SÉRICOS. ....</b>	<b>138</b>
<b>TABLA 6.3-6. ASOCIACIÓN DEL LOCUS PTPN22 CON BIOMARCADORES SÉRICOS. ....</b>	<b>139</b>
<b>TABLA 6.3-7. ASOCIACIÓN DE HAPLOTIPOS DE LOS LOCI VDR Y TNF-HLA COMO FACTORES DE RIESGO DE NEFRITIS LÚPICA PEDIÁTRICA. ....</b>	<b>141</b>

## 1. RESUMEN

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune compleja, de etiología desconocida, multifactorial, con un gran compromiso multisistémico. Está asociada con el género femenino especialmente en edad reproductiva y con las características étnicas de cada grupo. Se caracteriza por la producción de autoanticuerpos dirigidos contra diversos componentes nucleares y citoplasmáticos que intervienen en procesos inflamatorios los cuales se asocian con las manifestaciones clínicas que varían dependiendo del órgano o sistema involucrado, siendo el tejido renal el más afectado. Una de las complicaciones más frecuente es la Nefritis Lúpica (NL) Clase IV (clasificación histológica).

Son abundantes los trabajos que se han publicado tendientes a esclarecer las posibles etiologías que expliquen la participación de factores ambientales, inmunológicos y genéticos en la etiopatogenia de la enfermedad. Por lo anterior y teniendo en cuenta que la interacción gen hospedero es dependiente de la carga génica especialmente en los grupos multiétnicos como la población colombiana, se realizó este estudio en tres endotipos sufriendo de LES : LES sin daño renal en adultos, LES con endotipo de NL Clase IV en adulto y Nefritis lúpica pediátrica(NLp).

Esta tesis es un estudio observacional, analítico y de corte transversal, de casos y controles en tres endotipos de LES. Para el cálculo de la muestra se usó el OR de la población Latinoamericana (95% CI: 1.28–3.56) de estudios previos. Se involucraron 520 sujetos residentes en el Caribe Colombiano no relacionados familiarmente, cuyos padres y sus familiares hasta la tercera generación hubieran estado radicados en el litoral caribe colombiano, su distribución por proyecto fueron así:

Proyecto 1: Lupus eritematoso Sistémico; 133 contra 100 controles adultos sanos

Proyecto 2: nefritis lúpica clase IV (adultos): 49 casos contra 146 controles adultos sanos.

Proyecto 3: nefritis Lúpica en escolares: 92 contra 100 controles pediátricos sanos.

Todos los pacientes involucrados en este proyecto debieron tener un diagnóstico clínico de LES. Estos sujetos que participaron en el estudio provinieron de la consulta externa de los hospitales universitarios y fueron reclutados en un periodo entre febrero del 2012 y junio del 2013. Los pacientes involucrados en los proyectos I y II tuvieron un diagnóstico anatomopatológico, realizado por el mismo patólogo en el mismo servicio de patología.

A todos los sujetos se les tomó muestra de sangre venosa para la obtención de suero, plasma y ADN. A partir de este último se realizó tipificación de SNPs de los sistemas VDR, PTPN22, TNF y de MHC-Clase II. Se determinaron los SNPs rs2476601 [A/G] en el gen de la Proteína Tirosina Fosfatasa no Receptora Tipo 22 (PTPN22); rs361525 [A/G] y rs361525 [A/G] del gen del factor de necrosis tumoral (TNF); los polimorfismos TaqI [rs731236 A/G], ApaI [rs7975232 A/C], BsmI [rs1544410 C/T] y FokI [rs2228570 A/G] presentes en el gen del receptor de vitamina D (VDR) y los polimorfismos presentes en los loci de HLA-DRB1 y HLA-DQB1.

Los polimorfismos de PTPN22, TNF y VDR se genotipificaron mediante PCR en tiempo real (RT-PCR) utilizando TaqMan® de la casa Applied Biosystems, Foster City, CA, USA. en un equipo de RT-PCR ABI Prism 7300, de Applied Biosystems. La genotipificación para HLA DRB1\* y DQB1\* se realizó mediante técnica de Luminex. Se dispuso de kits LIFECODES HLA-SSO (Gen-Probe para uso con Luminex®) Los niveles de Vitamina D, leptina y adiponectina se cuantificaron por enzoinmunoanálisis. A partir de las muestras de suero se detectó la presencia y concentración de autoanticuerpos Anti-dsDNA, Anti-SM, Anti-SM, Anti-P ribosomal y Anti-RNP mediante microelisa.

El análisis de la data utilizó el software estadístico SPSS v20 (IBM® SPSS® Statistics 20; IBM Corp., USA). El análisis incluyó el estudio de las características inmunológicas, sociodemográfica, los resultados de la dosificación de Vitamina D y adipocinas en suero y los marcadores genéticos obtenidos. Se calcularon las frecuencias alélicas y fenotípicas. Se hizo chi cuadrado para identificación de asociaciones, se calculó el OR para cada alelo y cada genotipo y haplotipo, se determinó el equilibrio de Hardy-Weimberg.

La fuerza de asociación se calculó usando el programa power and simple size calculation versión 2.1.30. Las diferencias se consideran estadísticamente significativas cuando el valor de

p fue  $<0.05$ . Cuando fue necesario corregir la data obtenida en cada genotipo, se utilizó la corrección de Bonferroni.

Para el componente descriptivo de las variables clínicas se utilizaron estadísticos de tendencia central y paramétricos. Se utilizó ANOVA cuando se requirió.

La data fue analizada por regresión lineal y regresión logística y análisis estadístico multivariado, con el fin de estudiar la relación entre los resultados de las pruebas serológicas de Vitamina D y adiponectinas con los polimorfismos estudiados

La distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas fueron testeadas con el Test de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg y comparadas entre los casos y controles usando el Test de diferenciación de muestras de Arlequin v3.5. Las asociaciones de las frecuencias genotípicas y alélicas con la enfermedad se realizaron mediante la prueba de  $\chi^2$  de Pearson con razón de verosimilitud. A las comparaciones múltiples se les realizó corrección de Bonferroni. Además, se calcularon factores de riesgo (OR) y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% usando modelos de regresión logística ajustada (edad y sexo).

El análisis de haplotipo empleó el paquete estadístico "Haplo.stats v1.6.8" (R versión 3.0.2; <http://www.r-project.org>). Con este paquete se corrieron las funciones Haplo.em (estimación de frecuencias haplotípicas), Haplo.score (estimación de asociaciones de haplotipos con rasgos categóricos o cuantitativos), Haplo.cc (Modelos de regresión logística para la estimación de riesgo - OR [95% IC] ajustado por edad y sexo, excluyendo alelos con frecuencias  $\leq 1\%$ , y 10.000 simulaciones que refinan el valor de p [Psim]). La significancia estadística fue interpretada como  $p < 0.05$ .

Los resultados que se encontraron en esta tesis son coherentes con los descritos en la literatura. Los alelos y genotipos del SNP VDR-Bsm1 se mostraron asociados al LES y al daño renal en los tres endotipos estudiados. En el análisis del gen PTPN22 se encontró que el SNP rs2476601 se asoció con la susceptibilidad a la enfermedad y a los endotipos de nefritis lúpica tanto en niños como adultos. Se encontraron otras asociaciones que se presentaron en los endotipos de nefritis lúpica para los sistema MHC y TNF, sin embargo el escaso número de sujetos que expresaron estos polimorfismos, obliga a considerar que estos resultados, podrían cambiar al aumentar el número de sujetos de estudio.

Con respecto a los niveles séricos de vitamina D se destaca que no se encontró deficiencia en ninguno de los 3 endotipos estudiados. En el estudio de los adultos con LES sin daño renal, se encontró que tanto los casos y controles mostraron niveles séricos de Vitamina D normales. Controversialmente los casos presentan niveles significativamente mayores, en comparación a los controles.

En este mismo grupo, el SNP- VDR FokI se asoció con LES a nivel de alelos., el alelo A se portó como un factor de riesgo para LES [OR: 1.58; 95%IC: 1.05 - 2.36] (p=0.025).

En cuanto a los alelos HLA clase II, se observó que los alelos HLA DRB1\*03 y \*15 se mostraron como factores de riesgo para LES. En cuanto a los haplotipos de HLA clase II, los haplotipos HLA DRB1\*0701 /DQB1\*0201 y DRB1\*0411 / DQB1\*0302 se mostraron como factores protectores. Solo HLA DRB1\*16 se mostró como factor de riesgo para la insuficiencia de vitamina D.

En el endotipo nefritis lúpica del adulto, los participantes presentaron suficiencia de este heterolípido (30 – 100 ng/mL), exhibiéndose concentraciones similares entre los casos y controles (37.2 ng/mL  $\pm$  12.2 Vs 36.5 ng/mL  $\pm$  11.1; p=0.82).

En relación con la asociación de los SNPs del PTPN22 con este endotipo se observó una frecuencia significativamente mayor del genotipo AG en los casos (12.2% [n=6]) a diferencia de los controles (1% [n=1]), con un OR de 13.4 (95% IC = 1.56-114; p=0.018)

Los datos encontrados en nuestro estudio relacionado con el endotipo nefritis lúpica pediátrica, muestran que entre los los niveles séricos de Vitamina D presentan niveles significativamente mayores, en comparación a los controles.

El SNP rs2476601 del locus PTPN22 se encontró asociado con la susceptibilidad a Nefritis Lúpica en los niños con NLp Clase IV estudiados. Al comparar las frecuencias genotípicas entre el grupo de casos y controles, se observó que el genotipo AA se encuentra presente solo entre los casos con una frecuencia del 4.35%. Mientras que el genotipo AG se comporta como un factor de para nefritis lúpica [OR: 5.23; 95%IC: 1.35-20.1; p=0.005). En cuanto a la distribución alélica, el alelo A fue el alelo de menor frecuencia en la población en general con

un 5.73% [2n=22]; en el grupo de casos este alelo presentó una frecuencia del 10.33% [2n=19], en comparación a los controles 1.5% [2n=3]). Este alelo se comporta como un factor de riesgo para padecer nefritis lúpica reportando un OR de 8.29 (95% IC= 2.35 – 29.1; p=0.00). Mientras que el alelo G exhibió un comportamiento protector de la enfermedad, cuyo OR es de 0.12 (95% IC=0.03 - 0.42; p=0.00

Por otra parte, de todos los polimorfismos evaluados, solo el SNP rs2476601 de PTPN22 fue el único cuyos alelos y genotipos se asociaron con los biomarcadores séricos antes mencionados. El alelo A se asoció con concentraciones significativamente elevadas de vitamina D [59.7 ± 19.5 ng/mL], leptina [9.96 ± 9.73 ng/mL] y adiponectina [11.07 ± 14.5 ug/mL].

El SNP FokI o rs2228570, exhibió una frecuencia significativamente mayor del genotipo AA en los casos (18.4% [n=9]) a diferencia de los controles (12.4% [n=12]), con un OR de 3.47 (95% IC = 1.17-10.2; p=0.024. Al contrario de esto, el genotipo GG demostró una frecuencia superior en los individuos sanos (52.6% [n=51]) en comparación con los sujetos enfermos (22.4% [n=11]), siendo un factor protector contra la enfermedad, con un OR de 0.28 (95% IC=0.09-0.84; p=0.024) (Tabla 4).

En cuanto a los alelos de HLA clase II, se observó que los alelos HLA DRB1\*03 y \*15 se mostraron como factores de riesgo para LES.

Con relación a los niveles séricos de vitamina D, se observó asociación con los SNPs de los loci de PTPN22 y VDR.

En la presente tesis se analizaron las concentraciones plasmáticas de los biomarcadores Leptina, adiponectina y autoanticuerpos nefrofilicos. En el endotipo NLp, el grupo de casos presentan concentraciones elevadas de leptina y adiponectina (11.9 ng/mL y 15.8 ug/mL; respectivamente) en comparación a los controles, mostrando una diferencia estadísticamente significativa.

Con relación a los autoanticuerpos, solo el 3.85% de los casos estudiados fueron negativos para anti-dsDNA y el 5.13% para anti-SM también fueron negativos. Se destaca que el 100%

de los casos resulto positivos para anti-C1q. Contrario al comportamiento para aquellos, los anticuerpos anti-P ribosomal y anti-RNP fueron negativos en la mayoría de los sujetos de este estudio.

Tomando en conjunto los resultados obtenidos en los tres proyectos desarrollados, de tres endotipos de LES con y sin compromiso renal, pertenecientes a un grupo multiétnico, como lo es la población, se puede concluir que:

La susceptibilidad a desarrollar LES es dependiente del género en los distintos endotipos estudiados. Es el género femenino el que presenta mayor predisposición en desarrollar LES, NFIV en el adulto y NLp clase IV. De los diferentes biomarcadores séricos aquí analizados, la vitamina D demostró una asociación indirecta con la enfermedad. Como se describió, la población de estudio presenta una prevalencia relativamente baja de insuficiencia de vitamina D; más del 80% de los casos estudiados presentan concentraciones séricas suficientes entre 30 y 100 ng/mL. Sin embargo, el comportamiento de este heterolípido entre los endotipos evaluados, muestra que el daño renal a temprana edad, como ocurre en niños con Nefritis lúpica, genera un incremento de la vitamina D sérica, con niveles séricos promedio de 57.2 ng/mL. Estos niveles disminuyen en los individuos adultos con Nefritis lúpica tipo IV. No se encontró deficiencia de vitamina D en los sujetos involucrados en este estudio.

En cuanto a la asociación de las variantes genéticas y sus polimorfismos con relación a la al desarrollo del LES en estos tres endotipos, se encontró que: el polimorfismo rs2476601 de PTPN22 demostró una contribución al desarrollo de daño renal como ocurre en los casos con NLp clase IV y NF del adulto case IV observándose el genotipo heterocigoto AG como factor de riesgo para la enfermedad a diferencia de los individuos con LES que no desarrollan daño renal, en los cuales el locus PTPN22 no genera predisposición a la enfermedad. Con respecto al gen VDR solo los alelos y genotipos del BsmI se mostraron asociados a la predisposición al Desarrollo del LES en los tres endotipos.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades autoinmunes son una condición crónica iniciada por la pérdida de la tolerancia inmunológica a antígenos propios. La naturaleza crónica de algunas enfermedades es de importante significancia dado que, de manera directa e indirecta, afecta significativamente los presupuestos de salud pública a nivel mundial así como la calidad de vida. La incidencia estimada para las enfermedades autoinmunes es de alrededor de 90 casos por 100,000 personas por año y la prevalencia es del 3% en la población en general. El riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune aumenta con el género, ya que se habla de una proporción de 10:1 en relación mujer/hombre.

Las enfermedades autoinmunes constituyen un grupo de enfermedades crónicas no comunicables con una carga epidemiológica en crecimiento. Son enfermedades de etiología desconocida que tienen un comportamiento clínico variado expresando diferentes manifestaciones clínicas (Fenotipos) que pueden agrupar diferentes comportamientos, entre ellos, la selectividad por órganos y sistemas, el compromiso general de la economía corporal y una mayor morbimortalidad, expresiones fisiopatológicas que pueden ser explicadas por la carga genética, la inmunocompetencia del huésped, la relación gen-gen y gen medio ambiente generando en los pacientes que las padecen los diversos fenotipos y endotipos, son características compartidas entre estas enfermedades.

El Lupus Eritematoso Sistémico, (LES) es una de las enfermedades autoinmune más frecuentes y complejas es: poligénica, de etiología desconocida y multifactorial. El LES tiene un notorio compromiso multisistémico. Su prevalencia ha aumentado a nivel global durante las últimas décadas y se comporta diferente entre diversos grupos étnicos en diferentes latitudes. En la actualidad se considera que en su fisiopatogenia, influyen factores genéticos, endocrinos, metabólicos y medioambientales, los cuales se relacionan entre sí, para determinar la expresión fisiopatológica y clínica de la enfermedad.

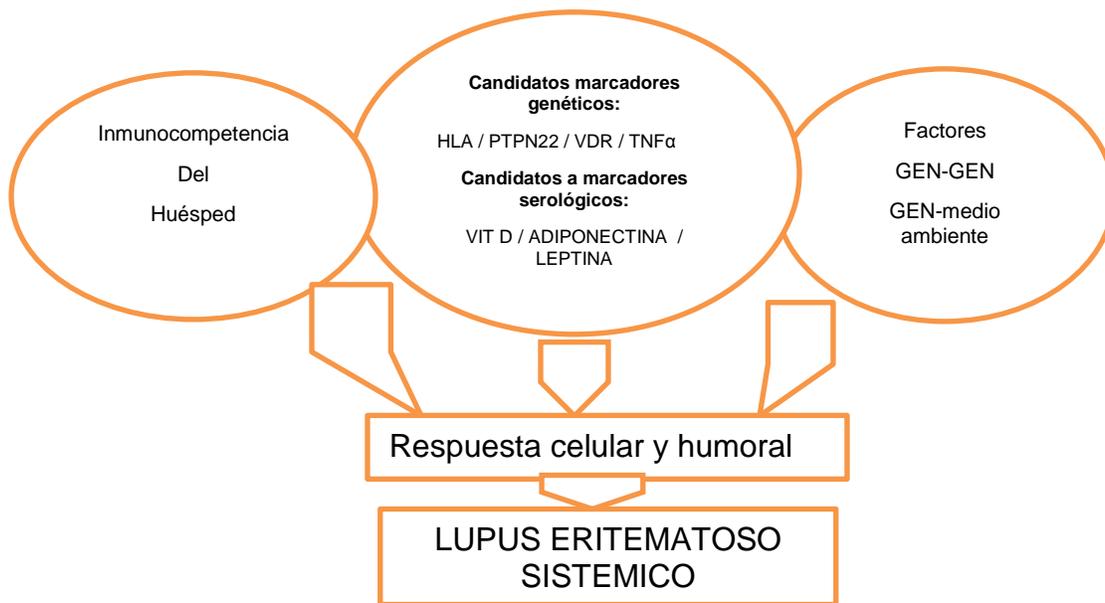
LES se caracteriza por la producción de autoanticuerpos dirigidos contra diversos componentes nucleares y citoplasmáticos los cuales intervienen en procesos inflamatorios persistentes generando alteraciones fisiológicas y metabólicas que participan en la fisiopatología de la enfermedad. Todas ellas varían dependiendo del órgano o sistema involucrado, siendo el tejido renal el más afectado. Aunque la etiología de LES es desconocida, hoy se acepta que tiene una carga genética muy significativa. La detección de marcadores genéticos y moleculares que pudieran ser aplicados al diagnóstico temprano o a la toma de decisiones, en protocolos terapéuticos, será de mucha ayuda con el fin de mejorar el pronóstico a largo plazo de esta enfermedad.

En la población pediátrica, el diagnóstico generalmente no se hace antes de los 10 años y la edad promedio del debut clínico es a los 12 años de edad. La mayoría de estos niños tienen compromiso renal, este fenotipo/ endotipo de nefritis lúpica pediátrica (NLp) se asocia con la multiétnicidad. El endotipo más frecuente es NLp clase IV. En la literatura existen pocos estudios relacionados con el comportamiento genético de este endotipo en grupos étnicos de Latinoamérica.

A pesar de los modernos desarrollos farmacológicos que han mejorado el pronóstico de la entidad y de sus complicaciones graves, el riesgo a desarrollar estas últimas es muy alta y su presentación muy frecuente. NLp es una patología crónica, con grandes repercusiones en la calidad de vida. La enfermedad genera alteraciones psicosociales y retraso en el crecimiento del niño. El LES pediátrico tiene un impacto en salud pública dado no solo por el alto costo de su tratamiento sino también por el manejo de sus comorbilidades. Son abundantes los trabajos tendientes a esclarecer la participación de diversos factores en su etiopatogenia.

Actualmente son escasos, los estudios de asociación de variantes genéticas de los sistemas Receptor de la Vitamina D(VDR), proteína intracelular tirosin fosfatasa (PTPN22) y el Tumor Necrosis factor (TNF alfa) en NLP clase IV así como los biomarcadores metabólicos Leptina, adiponectina y las concentraciones séricas de Vitamina D3 -Vit D3- con el LES sobre todo en nuestras poblaciones Latinoamericanas. En la etiopatogenia del LES se distinguen diversos factores (genéticos y ambientales) que se ven reflejados en la respuesta autoinmune que se observa en la mayoría de los casos con el LES. El VDR y los niveles séricos de Vit D3 tienen varios efectos sobre el sistema inmune.

**Figura 0-1. Interacción entre los factores ambientales y los posibles factores genéticos estudiados sobre la respuesta inmunológica en LES.**



La Vit D modula la diferenciación de células dendríticas, modula la polarización de los fenotipos de los LT CD4+ e inhibe la proliferación de LT y LB así también como la producción de citocinas. Su deficiencia e insuficiencia y también el polimorfismo de VDR se han asociado con varias enfermedades autoinmunes, entre ellas: LES, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide y T1D. En LES se ha descrito una asociación entre los niveles de Vit D y un aumento en la producción del interferón tipo1 y del TNF; citocinas importantes en la patogénesis de LES.

El descubrimiento de que la mayoría de las células expresan VDR y que las células inmunocompetentes son capaces de producir la forma activa de Vit D, ha generado un gran interés en el estudio de sus efectos inmunológicos potenciales, incluyendo su participación en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes.

La Vit D se ha asociado con la actividad y cronicidad en el LES y con algunas de sus manifestaciones clínicas, sin embargo, estos estudios muestran discrepancias cuando se analizan los resultados en diferentes grupos étnicos, probablemente debido a otras variables relacionados con: la carga genética de las poblaciones, la dieta, la etnicidad, la latitud, los trastornos metabólicos y las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad entre otros.

La Vit D se reconoce como un inmunomodulador y es un componente orgánico esencial para el metabolismo de los mamíferos. La forma activa de esta hormona: 1,25(OH)<sub>2</sub> Vit D<sub>3</sub>, resulta de la hidroxilación de un átomo de carbón de la molécula precursora y su síntesis se da primordialmente a nivel renal e incluye las células inmunocompetentes.

El VDR es polimórfico, describiéndose hasta el momento cuatro polimorfismos importantes. En dos de ellos se ha descrito su asociación con LES: BsmI y FOX1. Estos estudios se han realizados principalmente en poblaciones caucásicas. Existen muy pocos estudios de asociación del polimorfismo VDR en poblaciones multiétnicas, en especial la colombiana.

Recientemente se ha descrito que las adipocinas, citocinas sintetizadas por el tejido adiposo ejercen un efecto sobre el sistema inmunológico, dos de ellas tienen un efecto antagónico: Leptina; citocina proinflamatoria, estimula la producción de células T in vitro y promueve una respuesta CD4 Th1+ estimulando la producción de interferón, IL-12, y TNF alfa. La otra: la adiponectina, tiene propiedades anti inflamatorias e inhibe la producción de TNF $\alpha$  e IL-6 y promueve IL-10.

A la fecha está claro y es evidente que la susceptibilidad al desarrollo de LES está relacionada con la carga genética del paciente. Por lo anterior y teniendo en cuenta que la interacción gen inmunocompetencia- medio ambiente, es dependiente de esta carga génica, especialmente en los grupos multiétnicos, como la población colombiana hemos decidido plantear y desarrollar esta tesis de doctorado.

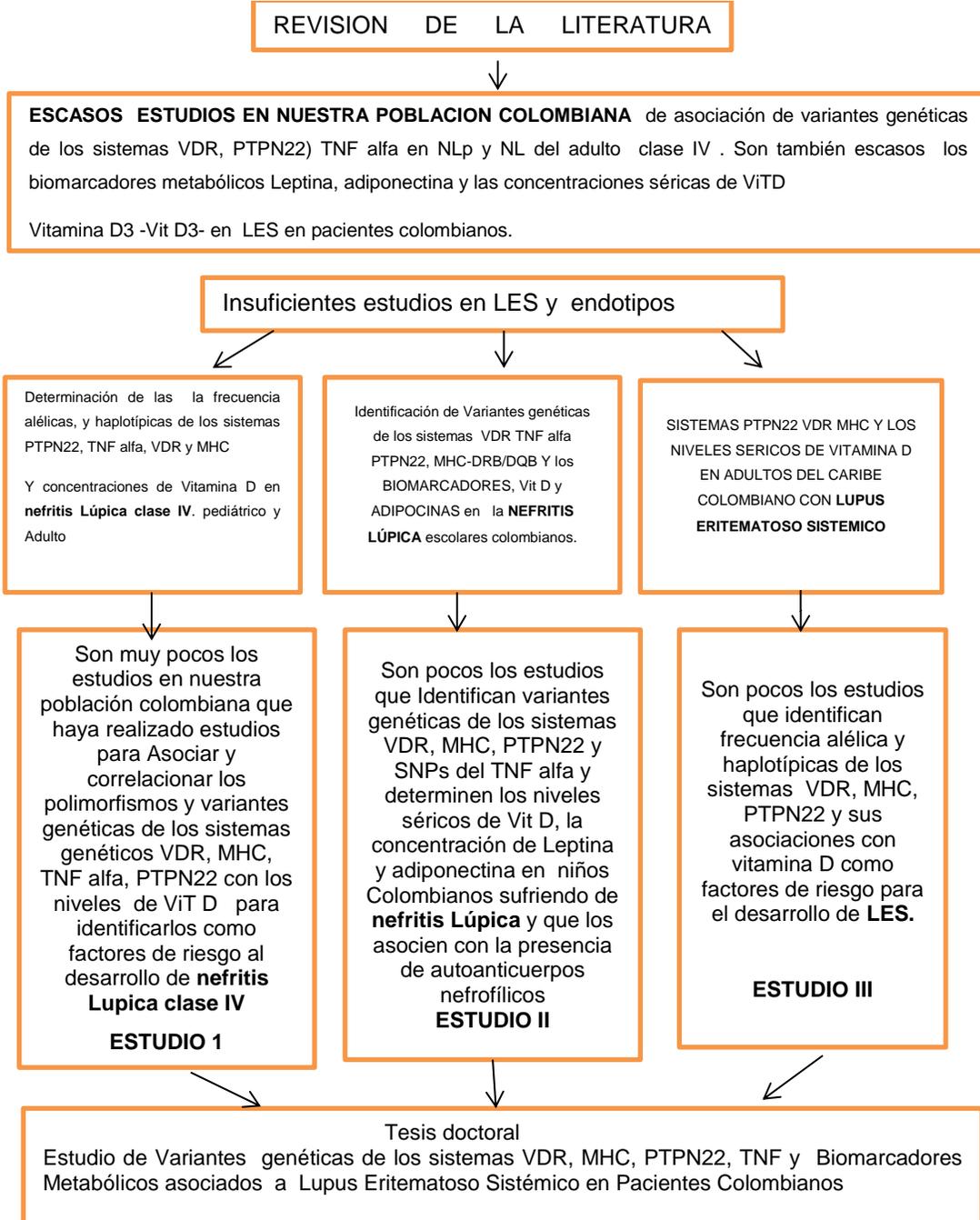
En este contexto se presenta esta tesis, diseñada como un conjunto de trabajos en pacientes pediátricos y adultos sufriendo de LES y expresando diferentes endotipos, en particular NL, complicación más frecuente y de mayor morbimortalidad en esta entidad,

Se estudian los siguientes 3 endotipos:

- I. LES sin compromiso renal en adultos.**
- II LES con Nefritis Lúpica clase IV del adulto**
- III LES con Nefritis Lúpica pediátrica**

Los resultados y el nuevo conocimiento generados de estos estudios, contribuirá a una mejor comprensión de la genética y de los mecanismos fisiopatológicos en esta entidad y permitirá identificar marcadores genéticos que podrán ser utilizados en posteriores estudios de epidemiología y genética molecular, en especial en grupos poblacionales latinoamericanos. Los resultados que se obtengan del análisis de los biomarcadores metabólicos en los diferentes endotipos de el LES, arrojaran información que, comparada con los obtenidos en otros estudios llevados a cabo con grupos poblacionales diferentes, aportaran un conocimiento del papel de ellos como factores de riesgo y morbilidad en esta enfermedad

**Figura 0-2. Mapa conceptual de la Tesis Doctoral**



El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune crónica de etiología compleja con diversas manifestaciones clínicas (1, 2) se caracteriza por la producción de autoanticuerpos contra diversos componentes nucleares y citoplasmáticos que median procesos inflamatorios asociados a manifestaciones clínicas que fluctúan en intensidad y severidad dependiendo del órgano afectado, lo que influye en la evolución y pronóstico (3-6).

Epidemiológicamente, los datos de prevalencia e incidencia del LES reportados son muy variables dependiendo del lugar de evaluación, muestra poblacional, metodología utilizada y las características étnicas de cada grupo, siendo más prevalente en hispanos y afrodescendientes que en la poblaciones de raza blanca. En las diferentes regiones geográficas, esta enfermedad es similar en su espectro clínico, pero la severidad y la comorbilidad de la enfermedad es relativamente diferente entre los países industrializados y aquellos que se encuentran en vías de desarrollo. En estos últimos se encuentra Colombia, país latinoamericano, en el cual la mayoría de su población es triétnica: nativa-afrodescendiente caucasoides. La mayoría de su población reside principalmente en zonas tropicales o subtropicales y vive bajo pobres condiciones socioeconómicas. Se ha reportado que estas características poblacionales donde se combinan los factores ambientales, socioeconómicos y la carga genética influyen en las diferencias biológicas y en el desarrollo de el LES (7).

En Latinoamérica no han sido muchos los estudios realizados en el LES pediátrico, destacándose el estudio GLADEL (Grupo Latinoamericano de Estudio del Lupus) realizado en 1214 pacientes de nueve países, entre ellos Colombia. Este estudio reporta la influencia de la etnicidad en las características clínicas del LES, destacándose la presencia de la afección renal (8).

El LES es más frecuente en el género femenino, especialmente en la edad reproductiva (9). Las tasas de incidencia van desde aproximadamente 1-10 por 100.000 personas-año y la prevalencia oscila entre 20-70 por 100.000 personas-año (10-12). Con respecto a la edad, el LES es más frecuente en adultos que en niños y en estos últimos se presenta más en la franja comprendida entre 10 y 16 años (13).

Una de las principales manifestaciones y/o complicaciones es el daño tisular en el tejido renal, constituyéndose la Nefritis Lúpica (NL) en un predictor de pobre pronóstico debido a que la mortalidad es mayor en los pacientes que la desarrollan, esencialmente porque las manifestaciones clínicas no son paralelas a las histológicas (14). El hecho de que aún existan algunos vacíos en el conocimiento de la etiología y patogénesis del LES, promueve el uso de nuevas terapias emergentes de alto costo y eficacia limitada las cuales impactan negativamente la salud pública, no sólo por el costo de su tratamiento sino también por el manejo de sus comorbilidades, especialmente por la complicación renal que ocurre en algún momento de la enfermedad conllevando al paciente en muchas ocasiones a la insuficiencia renal, lo que aumenta aún más los costos de su tratamiento al requerir hemodiálisis o trasplante; e influye en la morbilidad y mortalidad de manera directa e indirecta a través de las complicaciones derivadas del tratamiento inmunosupresor (14). La mayoría de pacientes lúpicos presentan evidencia histológica de daño renal, aunque muchos de ellos no presentan hallazgos clínicos sugestivos de compromiso renal (nefritis silente), como: sedimento urinario anormal (hematuria, cilindros celulares), proteinuria persistente (>0,5 gramos/día), valores elevados de creatinina sérica, hipocomplementemia y títulos altos de anticuerpos anti DNA de doble cadena (anti ds-DNA). Por tanto, es importante el tipo de cambio morfológico del glomérulo basándose en la clasificación ISN/RPS establecida por la International Society of Nephrology (ISN) y la Renal Pathology Society (RPS). Dicha clasificación abarca desde la Clase I

(NL mesangial mínima) hasta la Clase VI (NL esclerosante avanzada). Enmarcados en esta clasificación, se ha determinado que la clase IV o Nefritis Lúpica Difusa (NLD), es la forma más frecuentemente asociada a las manifestaciones clínicas (14-19). Además, la circunstancia de que la carga génica en los grupos multiétnicos es diferente y por ende la interacción gen/huésped, precisa que se realicen estudios que determinen marcadores genéticos de estas poblaciones y su impacto en salud humana. Por ello, el propósito específico de este trabajo fue hacer un estudio inmunogenético y molecular en pacientes sufriendo de LES y daño renal. Con el fin de evitar factores estocásticos y/o mecanismos fisiopatológicos que generaran sesgo en los resultados, se decidió definir la muestra en sujetos con el endotipo de NL Clase IV.



### 3. MARCO TEÓRICO

Las enfermedades autoinmunes son una condición crónica iniciada por una pérdida de la tolerancia a autoantígenos. La naturaleza crónica de estas enfermedades tiene un impacto significativo en términos de los cuidados médicos, costos directos e indirectos y calidad de vida. La incidencia estimada para enfermedades autoinmunes es alrededor de 90 casos por 100.000 personas al año y su prevalencia es cerca del 3% de la población. Aunque son de etiología desconocida se acepta que en su desarrollo participan factores genéticos y ambientales (10).

Algunos investigadores además de analizar la importancia del factor étnico en el curso del LES consideran que es difícil separar el factor socioeconómico como un factor predisponente en la morbilidad de estos pacientes. La población blanca que vive en los Estados Unidos o en el Reino Unido parece tener un mejor pronóstico que la población asiática que ha emigrado a estos países. Estudios recientes realizados en América Latina en pacientes adultos con LES mostraron que la población mestiza multiétnica presentó casos más severos que los pacientes de origen Europeo puro (11-13).

Aunque la etiología y mecanismo patogénico de este desorden inmunológico no ha sido claramente elucidado se acepta que es una patología multifactorial, resultante de la interacción compleja de factores genéticos y ambientales (20). Se caracteriza por la producción de autoanticuerpos y la formación y depósito de complejos inmunes. Los autoanticuerpos se han asociado a la patogénesis y, el depósito en vasos sanguíneos de los complejos inmunes y complemento, a la instalación del proceso inflamatorio en diversos órganos y sistemas como riñón, piel, sistema cardiovascular, sistema nervioso, entre otros (20). Esta diversidad de

eventos inmunológicos es la causa de las diferentes manifestaciones clínicas y complicaciones en LES especialmente las de tipo renal (4-6, 14, 18-24).

Debido a las diversas manifestaciones y formas clínicas de esta entidad, el Colegio Americano de Reumatología ha establecido criterios de clasificación del Lupus, que además se han validado en pacientes menores de 18 años (24). Los 11 criterios se pueden observar en la Tabla 3-1:

**Tabla 0-1. Criterios del Colegio Americano de Reumatología para la clasificación del Lupus (revisados en 1982 y en 1997)**

<b>CRITERIO</b>	<b>DEFINICIÓN</b>
<b>Eritema malar.</b>	Eritema fijo, plano o elevado, sobre las eminencias malares, respetando los pliegues nasolabiales.
<b>Erupción discoide.</b>	Zonas eritematosas elevadas con escamas queratósicas adherentes y taponamiento folicular. En las lesiones antiguas puede producirse cicatrización atrófica.
<b>Fotosensibilidad.</b>	Erupción cutánea desproporcionada tras exposición a la luz solar, por historia u observada por el médico.
<b>Úlceras orales.</b>	Úlceras orales o nasofaríngeas, normalmente indoloras observadas por el médico.
<b>Artritis.</b>	Artritis no erosiva en dos o más articulaciones periféricas, con inflamación, derrame sinovial o dolor a la palpación.
<b>Serositis.</b>	Pleuritis: historia clínica convincente, roce auscultado por un médico o demostración de derrame pleural. Pericarditis: documentada por ECG, roce auscultado por un médico o demostración de derrame pericárdico.
<b>Alteración renal.</b>	Proteinuria persistente superior a 0,5 g/día o > 3+ si no se ha cuantificado o cilindruria de hematíes o hemoglobina, cilindros granulosos, tubulares o mixtos.
<b>Alteración neurológica.</b>	Convulsiones o psicosis, en ausencia de trastorno metabólico, electrolítico o de fármacos que las puedan producir.
<b>Alteración hematológica.</b>	Anemia hemolítica con reticulocitosis; o, Leucopenia < de 4.000/mm <sup>3</sup> en 2 ocasiones; o, Linfopenia < de 1.500/mm <sup>3</sup> en 2 ocasiones; o Trombopenia < de 100.000/mm <sup>3</sup> no secundaria a fármacos.

<b>Alteración inmunológica.</b>	Anti DNA positivo; o, Anti Sm positivo; o, Anticuerpos antifosfolípidos positivos basado en: 1) Anticuerpos anticardiolipinas IgG o IgM (+) a títulos medios o altos; 2) Anticoagulante lúpico (+) o Serología falsamente positiva para Sífilis durante al menos 6 meses y confirmada por la prueba FTA-ABS.
<b>Anticuerpos antinucleares positivos.</b>	Título anormal de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia o por otro test equivalente en ausencia de fármacos capaces de producir lupus inducido por los mismos.

Estos criterios de clasificación fueron desarrollados con propósitos de tener una estandarización útil para los ensayos clínicos y resultados de investigación. Actualmente se constituyen en una guía inicial de evaluación del paciente, y para establecer el diagnóstico de LES el paciente debe cumplir con cuatro de los criterios anteriores, no necesariamente simultáneos, pero teniendo en cuenta que dentro de los cuatro criterios se encuentre el de la presencia de autoanticuerpos (24).

Sin embargo, los anteriores criterios de clasificación no son suficientes debido a que al paciente con LES se le debe realizar una evaluación sistemática e integral, con un enfoque particular para distinguir la actividad de la enfermedad, del daño crónico, infecciones u otros comórbidos, incluidos los efectos secundarios de los medicamentos, ya que esto puede alterar el manejo del paciente. Es por ello que desde la década de los años 80 se han diseñado diversos índices de actividad de esta enfermedad, que se basan en una serie de preguntas dirigidas a detectar posibles manifestaciones del LES en todos los órganos, particularmente las manifestaciones incluidas en los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología.

Dentro de los diversos índices se encuentra el SLEDAI (Índice de Actividad de la enfermedad Lupus Eritematoso Sistémico) que es un índice global que mide la

actividad de la enfermedad dentro de los últimos 10 días e incluye 24 ítems entre variable clínicas y de laboratorio como se observa en la tabla 3-2. Con el SLEDAI la actividad del LES se mide entre 0-105: SLEDAI=0 (sin actividad); SLEDAI=1-5 (actividad leve); SLEDAI=6-10 (actividad moderada); SLEDAI=11-19 (alta actividad); SLEDAI=>20 (muy alta actividad) (25).

**Tabla 0-2. Puntuación de SLEDAI 2000.**

<b>PUNTUACION SLEDAI</b>	<b>ÍTEM</b>	<b>DEFINICIÓN</b>
8	Agarrotamiento	De inicio reciente, excluyendo causas metabólicas, infecciosas o por drogas.
8	Sicosis	Alteración de la capacidad de realizar actividades normales debido a cambios severos en la percepción de la realidad. Incluye alucinación, incoherencia, marcada pérdida de asociaciones, empobrecimiento de contenido del pensamiento, marcado pensamiento ilógico, comportamiento desorganizado, extraño o catatónico. Excluye uremia o causa por drogas.
8	Síndrome orgánico cerebral	Variación de la función mental con alteración de la orientación, memoria u otra función intelectual, con inicio rápido y de fluctuación de las características clínicas, incapacidad para mantener la atención, con al menos dos de los siguientes: perturbación de la percepción, discurso incoherente, insomnio o somnolencia durante el día, o el aumento o disminución de actividad psicomotora. Excluye causas metabólicas, infecciosas o por drogas.
8	Alteraciones visuales	Cambios en la retina del paciente con LES. Incluye cuerpos citoides, hemorragia retinal, exudados serosos o hemorragias en la coroide o neuritis óptica. Excluye hipertensión, infección o causado por drogas.
8	Trastorno del nervio craneal	Neuropatía motora o sensorial de nueva aparición que involucre nervios craneales.
8	Dolor de cabeza LES	Dolor de cabeza severo, persistente; puede ser migrañoso, pero no responden a analgésicos narcóticos.
8	Accidente	Nueva aparición de accidente cerebrovascular.

	cerebrovascular	Excluye arteriosclerosis.
8	Vasculitis	Ulceración, gangrena, nódulos sensibles en dedos de la mano, infarto periungual, hemorragia disidente, biopsia o prueba de angiografía para vasculitis.
4	Artritis	> 2 articulaciones con dolor y signos de inflamación (por ejemplo: sensibilidad, hinchazón o derrame.
4	Miositis	Dolor/debilidad muscular proximal, asociada con aumento de la creatinina fosfoquinasa/ aldolasa, o cambios en el EMG o una biopsia mostrando miositis.
4	Cilindros urinarios	Cilindros hemo-granulares o eritrocitarios.
4	Hematuria	>5 glóbulos rojos/campo de alto poder. Excluye cálculos (piedras), infección u otras causas.
4	Proteinuria	>0.5g/24 horas.
4	Piuria	>5 glóbulos blancos/campo de alto poder. Excluye infección.
2	Erupción	Erupción cutánea de tipo inflamatorio.
2	Alopecia	Pérdida difusa, anormal o irregular de cabello.
2	Úlceras mucosas	Ulceraciones orales o nasales.
2	Pleuritis	Dolor torácico pleurítico con roce o derrame pleural o engrosamiento pleural.
2	Pericarditis	Dolor pericárdico con al menos uno de los siguientes: fricción, derrame, confirmación por ecocardiograma o electrocardiograma.
2	Disminución del complemento	Disminución de CH50, C3 o C4 debajo del límite inferior de la normalidad para las pruebas de laboratorio.
2	Incremento en unión de DNA	Aumento en la unión de ADN por encima del rango normal para ensayos de laboratorio.
1	Fiebre	>38°C. Excluye causa infecciosa.
1	Trombocitopenia	<100x10 <sup>9</sup> plaquetas/L. Excluye causa por drogas.
1	Leucopenia	<3x10 <sup>9</sup> glóbulos blancos/L. Excluye causa por drogas.

Como se ha mencionado, una de las complicaciones del lupus más serias y frecuentes es la enfermedad renal. Aproximadamente dos tercios de los pacientes tienen compromiso renal en algún momento de su enfermedad y se constituye la Nefritis Lúpica en un predictor de pobre pronóstico debido a que la mortalidad en pacientes con nefritis es mayor que en aquellos que no la presentan. La presentación de la Nefritis Lúpica varía desde una proteinuria leve asintomática hasta una glomerulonefritis rápidamente progresiva, con insuficiencia renal (14). Los cambios histológicos también son variables encontrándose en las biopsias renales desde una nefropatía mesangial mínima hasta la esclerosis glomerular total, pasando por formas de afección asociadas al depósito de complejos inmunes en los glomérulos como la glomerulonefritis focal, la proliferativa difusa y la membranosa (15).

Esta variabilidad condujo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a una clasificación basada en los cambios morfológicos en el glomérulo. La primera clasificación de la OMS fue establecida en 1974. Posteriormente fue modificada en 1982 y fue la más utilizada hasta el 2004, año en que un grupo de prestigiosos en el tema incluyendo patólogos, reumatólogos y nefrólogos, y auspiciada por la International Society of Nephrology (*ISN*) y la Renal Pathology Society (*RPS*) formuló una clasificación revisada, basada en todo el conocimiento clínico y epidemiológico acumulado hasta entonces. Esta clasificación va desde la clase I hasta la clase VI como se observa en la tabla #3-3 (16). La Nefritis Lúpica Difusa (NLD) o de clase IV según la OMS, es la forma más frecuente y severa de nefritis lúpica y contribuye a la morbilidad y mortalidad en los pacientes (17).

**Tabla 0-3. Clasificación de la NL ISN/RPS.**

<b>Clase I</b>	<b>Nefritis Lúpica Mesangial Mínima.</b> Glomérulo normal por microscopía convencional (MC), pero depósitos por inmunofluorescencia (IF).
<b>Clase II</b>	<b>Nefritis Lúpica Proliferativa Mesangial.</b> Hiper celularidad mesangial pura de cualquier grado o expansión de la matriz mesangial por MC, depósitos inmunes mesangiales.  Pueden haber unos pocos depósitos inmunes por IF o microscopía electrónica (ME), pero no por MC.
<b>Clase III</b>  <b>Clase III (A)</b> <b>Clase III (A/C)</b>  <b>Clase III (C)</b>	<b>Nefritis Lúpica Focal.</b> Glomerulonefritis (GN) endo o extracapilar activa o inactiva focal, segmentaria o global comprometiendo <50% de todos los glomérulos, típicamente con depósitos inmunes subendoteliales, con o sin alteraciones mesangiales.  Lesiones activas: NL proliferativa focal.  Lesiones activas y crónicas: NL proliferativa y esclerosante focal. Lesiones inactivas crónicas con cicatrización glomerular: NL esclerosante focal.
<b>Clase IV</b>  <b>Clase IV-S (A)</b> <b>Clase IV-G (A)</b> <b>Clase IV-S (A/C)</b>  <b>Clase IV-S (C)</b>  <b>Clase IV-G (C)</b>	<b>Nefritis Lúpica Difusa.</b> GN endo o extracapilar activa o inactiva difusa, segmentaria o global comprometiendo ≥ 50% de todos los glomérulos, típicamente con depósitos inmunes subendoteliales difusos, con o sin alteraciones mesangiales. Se divide en difusa segmentaria (IV-S) cuando ≥ 50% de los glomérulos tienen lesiones segmentarias, y difusa global (IV-G) cuando ≥ 50% tienen lesiones globales. Se define segmentario como una lesión que compromete < 50% del penacho glomerular. Se incluyen en esta clase casos con “asas de alambre” sin o con poca proliferación.  Lesiones activas: NL proliferativa segmentaria difusa.  Lesiones activas: NL proliferativa global difusa.  Lesiones activas y crónicas: NL proliferativa y esclerosante segmentaria difusa.  Lesiones crónicas inactivas con cicatrización glomerular: NL esclerosante segmentaria difusa.  Lesiones crónicas inactivas con cicatrización glomerular: NL esclerosante global difusa.
<b>Clase V</b>	<b>Nefritis Lúpica Membranosa.</b> Depósitos inmunes subepiteliales

	<p>globales o segmentarios o sus secuelas morfológicas por MC y por IF o ME, con o sin alteraciones mesangiales. Puede ocurrir en combinación con las Clases III o IV y en estos casos se diagnosticarán ambas clases.</p> <p>Puede haber cualquier grado de hiper celularidad mesangial.</p> <p>Pueden haber lesiones crónicas esclerosantes avanzadas.</p>
<b>Clase VI avanzada</b>	Nefritis Lúpica Esclerosante Avanzada. $\geq 90\%$ de glomérulos globalmente esclerosados sin actividad residual.

Se han realizado numerosos estudios tanto en modelo murino como en el humano con el fin de dilucidar los mecanismos celulares y moleculares envueltos en la presentación y desarrollo del LES y de la NLD, encontrando desde el punto de vista genético que los estudios de amplitud genómica, de familias y genes candidatos han conducido a la identificación de una serie de genes que determinan la susceptibilidad a la enfermedad o su severidad como el gen PTPN22 y CTLA-4 (activación de Linfocitos T); FCGR-2A, FCGR-2B, FCGR-3A, FCGR-3B (Receptores Fc; eliminación de complejos inmunes); STAT-4 (Producción de citoquinas de células T y respuesta de macrófagos a IFN- $\alpha$ ); HLA-DR2, HLA-DR3 (Presentación de antígeno), entre otros (26, 27). No obstante, muchos otros genes no determinados puedan contribuir a la patogénesis, la naturaleza de los identificados sugieren que los pacientes con LES tienen un sistema inmune predispuesto a una respuesta aberrante (4).

### 3.1 GENETICA DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES.

Como se había comentado anteriormente, el fondo genético de las EAI se evidencia por la agregación familiar, la cual se puede cuantificar mediante el coeficiente  $\lambda_s$ , que se define como el coeficiente de dividir la prevalencia de la enfermedad en hermanos de individuos afectados entre la prevalencia de la población general. El coeficiente  $\lambda_s$  en el LES es de 20-29 (28) y en artritis reumatoide(AR) varía entre 3-15. La comparación entre las altas tasas de

concordancia de los familiares con la de la población general, evidencia que la predisposición genética es un factor dominante en el desarrollo de las EAI. Por otro lado, una menor tasa de concordancia en familiares que en gemelos MC, sugiere la presencia de múltiples genes en la predisposición genética para estas enfermedades. Por lo tanto, estudios de genes candidatos no-HLA, son un gran aporte al esclarecimiento de la etiología de dichas enfermedades, ya que su asociación con EAI está comprobada.

Hay principalmente dos clases de estudios para identificar estos genes no-CMH, involucrados en enfermedades complejas, los estudios de ligamiento y los estudios de asociación de genes candidatos.

### **3.1.1 Estudios de ligamiento.**

Los estudios de ligamiento se usan para identificar regiones cromosómicas dentro del genoma que contengan genes de predisposición a la enfermedad. Este análisis de ligamiento genético está basado en la transmisión de dos o más genes unidos sobre un cromosoma a la misma célula hija (cuando locus genéticos son heredados conjuntamente) con un rasgo fenotípico dentro de familias (29). El modelo para estos estudios son parejas de hermanos enfermos (*affected sibling pairs, ASP*). Se espera que los familiares afectados muestren un exceso de haplotipos idénticos en las regiones donde se ubican los genes causantes de la enfermedad. Por consiguiente, se cree que las regiones cromosómicas que se comparten con alta frecuencia se encuentran genes de susceptibilidad (29). También tienen la capacidad de localizar genes de susceptibilidad sin tener un previo conocimiento de la etiología de la enfermedad.

Durante meiosis, cuando los cromosomas homólogos se aparean, se rompen en los puntos idénticos a lo largo de su longitud, dando lugar a un intercambio de los segmentos idénticos del cromosoma entre dos cromosomas homólogos. El

principio del análisis de ligamiento se basa en el hecho de que si un marcador (B) está cerca de un gen de susceptibilidad, segregarán juntos durante la recombinación, mientras que si un marcador (A) está lejos del gen, no se cosegregará con él. Cuanto más cercano el marcador se encuentre del gen relacionado con la enfermedad, más fuerte será el ligamiento con la enfermedad (alelo salvaje o silvestre).

El primer paso para detectar ligamiento entre una región cromosómica y un fenotipo endotipo, es generar un mapa cromosómico utilizando marcadores genéticos en las familias estudiadas. Para que el análisis sea robusto y con alto poder estadístico hay que usar una serie de marcadores altamente informativos separados uniformemente a lo largo de los 46 cromosomas, usualmente cada 20 centimorgans (cM), en todos los sujetos de las familias a estudiar. Se considera que un marcador es altamente informativo cuando es muy polimórfico y es poco probable encontrar individuos con los dos alelos iguales (homocigotos). Si los dos alelos son distintos (heterocigotos) en la mayoría de sujetos de una familia, se puede seguir con facilidad la herencia de cada uno de ellos a lo largo de generaciones sucesivas. Por lo tanto, podemos determinar cuántos alelos idénticos comparten 2 individuos, las posibilidades pueden ser 0,1 o 2. Los marcadores genéticos más utilizados en la búsqueda de ligamiento son polimorfismos de nucleótido simple (SNP) y microsatélites.

El concepto estadístico de *ligamiento* entre un fenotipo y un marcador genético se puede definir de la siguiente manera: si el fenotipo ocurre en individuos que comparten más alelos, es decir, que genéticamente son similares para un marcador determinado (SNP), se dice que el locus que contiene este marcador está ligado al fenotipo. Esto implica que en la proximidad del marcador existe un gen que influye en el fenotipo. El ligamiento se produce entre el marcador y el gen, aunque se acepta que el fenotipo sea el que está “ligado” al marcador (30). Una

limitación de estos estudios en enfermedades complejas es su limitado poder para detectar genes con un efecto modesto o pequeño, de manera que se necesitan un gran número de familias.

### **3.1.2 Estudios de asociación.**

Estos estudios buscan detectar una asociación entre uno o más polimorfismos genéticos y un rasgo característico. Los estudios de asociación difieren de los de ligamento en que el mismo alelo (o alelos) está asociado con ese rasgo de manera similar en toda la población, mientras que los estudios de ligamiento permiten que diferentes alelos estén asociados con ese rasgo en familias diferentes. Estos estudios de asociación pueden hacerse entre pacientes no relacionados (casos) y controles sanos para identificar marcadores que difieran significativamente entre los dos grupos o bien en grupos familiares formados normalmente por un individuo enfermo y sus progenitores (31). Este tipo de estudios normalmente tienen mayor poder para detectar asociaciones pequeñas o débiles que los de ligamiento. Numerosos estudios genéticos de asociación de genes candidatos se han llevado a cabo hasta la fecha en enfermedades autoinmunes, los cuales han producido resultados alentadores. La mayoría de las asociaciones publicadas no han sido replicadas en poblaciones diferentes a las asociadas inicialmente. Estas discrepancias podrían deberse, al menos en parte, a la heterogeneidad genética o a insuficiente poder estadístico de los estudios caso-control realizados hasta la fecha, para detectar odds ratios (OR) modestos.

### **3.1.3 Estudios de asociación del genoma completo.**

En los últimos años gracias a los nuevos avances, ha sido posible el desarrollo de los estudios de asociación del genoma completo (32), (*Genome-wide association studies*, GWAS). Estos avances han consistido principalmente en un mayor conocimiento de los patrones de variación génica humana con el proyecto

internacional HapMap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)), (33) la disponibilidad de nuevas técnicas de genotipado, con densa cobertura del genoma y costos más baratos, y por último la recolección de cohortes de pacientes y controles más amplios y mejor caracterizados. Hasta la fecha se han realizado numerosos GWAS en EAI

#### **3.1.4 Polimorfismos de nucleótido solo (SNPs).**

SNPs son mutaciones de un solo nucleótido y dan lugar a cambios de un aminoácido- aa- en la proteína. La frecuencia del alelo menor debe ser mayor al 1% en la población. Los SNPs son comunes en el genoma. Cerca de 12 millones de SNPs están disponibles en las bases de datos. Una de la base de datos de polimorfismos de un solo nucleótido (dbSNP) más conocidas es la del Centro Nacional para Información de Biotecnología. Los SNPs ofrecen la posibilidad de realizar un mapeo fino del genoma debido a la cercana posición de uno respecto a otro y su baja tasa de mutación (33).

#### **3.1.5 Selección de genes candidatos.**

La elección de genes candidatos se puede hacer basándose en dos estrategias; la posición y la función.

*La posición:* basada en genes que con anterioridad hayan sido encontrados en regiones de susceptibilidad a la enfermedad mediante estudios de ligamiento, o bien genes que se encuentren en regiones genéticas humanas homólogas asociadas a susceptibilidad en modelos animales.

*La función:* la cual consiste en seleccionar genes que puedan tener una implicación en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad, así como genes implicados en enfermedades inflamatorias o autoinmunes relacionadas. También

se deben tener en cuenta genes que involucrados en las vías fisiopatológicas de la enfermedad (inflamación, vías activación de células T y B entre otras

### **3.2 GENÉTICA DEL LES.**

Algunas variantes individuales de riesgo genético, asociados con LES presentan una modesta magnitud de riesgo con odds ratio (OR) comprendido entre 1.1 y 2.36. Sin embargo, el riesgo genético para LES implica múltiples genes y por tanto es mayor que en muchas otras enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide, la diabetes tipo 1, enfermedad de Graves, esclerosis múltiple, y psoriasis (34, 35).

La primera asociación genética que se describe para LES fue con la región HLA en el cromosoma 6p21.3, que codifica más de 200 genes, muchos de ellos con función inmunológica conocida. La región HLA se subdivide en clase I y clase II, que contienen genes que codifican glicoproteínas implicadas en los procesos de presentación de péptidos para el reconocimiento por las células T; y la región de clase III, que contiene otros genes inmunes importantes (tales como TNF, C2, C4A, C4B y CFB) (36). (Figura 3-1)

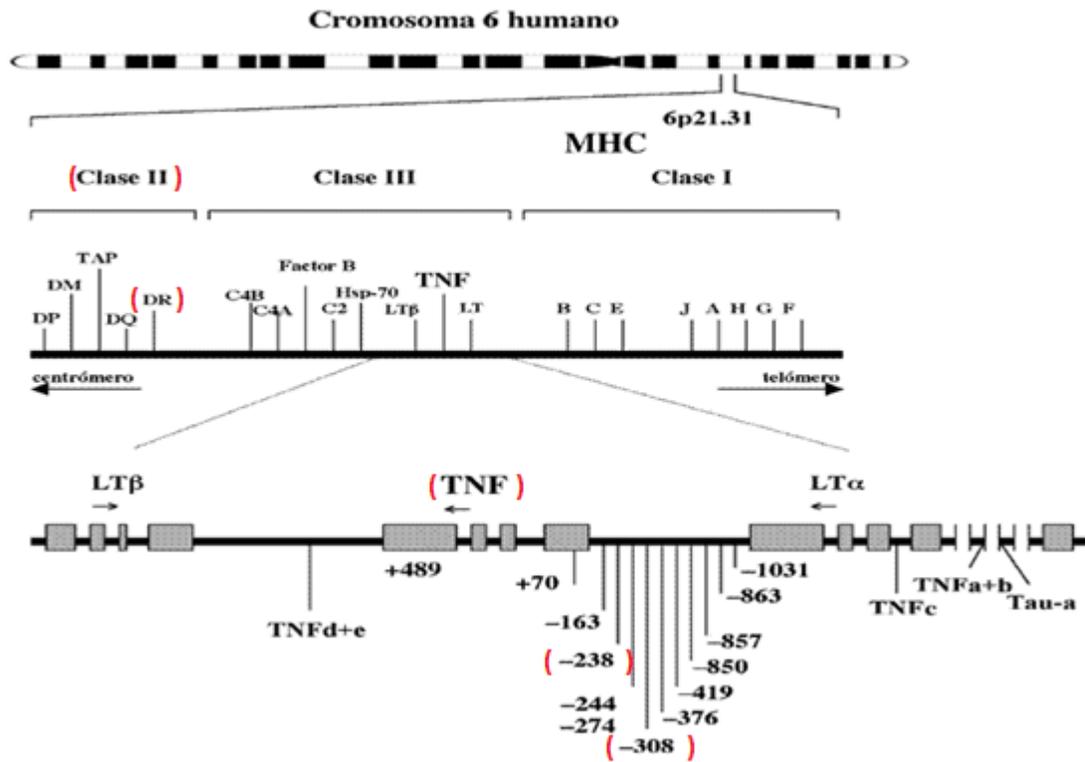
Durante los últimos años, los avances tecnológicos y la colaboración entre los investigadores han permitido evidenciar diversidad de genes implicados con el desarrollo del LES. Las asociaciones genéticas identificadas en estos estudios ponen de relieve los principales genes de susceptibilidad al LES comunes a varias poblaciones étnicas. Los resultados de estos estudios no sólo confirmaron la importancia de varias organizaciones de genes HLA, sino que también identificó una serie de nuevos genes, algunos de los cuales codifican proteínas que funcionan en diversos aspectos del sistema inmune, mientras que de otros no se

ha conocido relación a la patogénesis de el LES (35). Dentro de los cuales se destacan:

- **IRF5** (Interferon (IFN) regulatory factor 5)
- **STAT4** (Signal transducer and activator of transcription 4 protein)
- **PTPN22** (Tyrosine-protein phosphatase non- receptor type 22)
- **FcγR genes** (FCGR2A, FCGR3A, FCGR3B, and FCGR2B encode FcγRs (low-affinity Fcγ receptors for IgG))
- **C1q genes** C1QA, C1QB and C1QC
- **The IRAK1-MECP2** (IL-1 receptor-associated kinase 1)
- **TREX1** (3' repair exonuclease 1, a major 3'–5' DNA exonuclease)
- **TNFSF4** (TNF ligand superfamily member 4 (también conocida como OX40L))
- **IL10**
- **TNFAIP3 y TNIP1** (TNF-α-induced-protein 3 (encoded by TNFAIP3) its interacting protein, TNFAIP3-interacting protein 1)
- **BLK, BANK1 y LYN** (BLK encodes tyrosine-protein kinase Blk)
- **ETS1 y PRDM1** (Miembro de la súper familia de factores de trascrición con regulación negativa de diferenciación de células B y células 17 T helper)

De igual forma en la tabla # 3-4 se destacan los genes anteriormente mencionados y otros no presentes en esta lista, demostrando así la diversidad de genes implicados en el desarrollo de LES. Se destaca que los genes HLA, TNF alfa y PTPN22 son importantes en los estudios de asociación en LES.

Figura 0-1. Complejo Mayor de Histocompatibilidad - brazo corto del cromosoma 6.



Localización y organización de los genes que codifican para los antígenos HLA clase I y II y el gen de TNF $\alpha$ . Ubicado en el MHC clase III, en el brazo corto del cromosoma 6 humano. Los cuadrados representan exones. Los polimorfismos del TNF $\alpha$  descritos están incluidos en el mapa genético: los microsatélites (CT) $n$  TNF $\beta$ , c, d y e, el microsatélite (CA) $n$  TNF $\alpha$ , el microsatélite Tau-a (11 ó 14 GTs), la inserción de una C en la posición +70, las transiciones G/A en las posiciones +489, -163, -238, -244, -274, -308 y -376, C/T en las posiciones -850 y -863, T/C en la posición -1031 y las transversiones G/C y C/A en las posiciones -419 y -863, respectivamente.

El Lupus Eritematoso Sistémico está asociado con más de 100 diferentes autoanticuerpos que ocasionan afección del sistema renal y piel. La respuesta inflamatoria conlleva a depósitos de inmunocomplejos responsables de manifestaciones clínicas como vasculitis y nefritis (37, 38).

**Tabla 0-4. Genes implicados en el desarrollo de Lupus Eritematoso Sistémico categorizados por nivel de evidencia (39).**

Gene	ORs <sup>a</sup>	P-values
<b>Overwhelming evidence</b>		
The <i>MHC</i>	2.36	$1.7 \times 10^{-52}$
	2.01	$2.71 \times 10^{-21}$
<i>ITGAM</i>	1.62	$1.61 \times 10^{-23}$
	1.33	$3 \times 10^{-11}$
<i>IRF5</i>	1.54	$3.61 \times 10^{-19}$
	1.72	$1.65 \times 10^{-11}$
<i>BLK</i>	1.39	$1 \times 10^{-10}$
	1.22	$7 \times 10^{-10}$
<i>STAT4</i>	1.53	$8.96 \times 10^{-14}$
	1.50	$2.8 \times 10^{-9}$
<b>Strong evidence</b>		
<i>PTPN22</i>	1.53	$5.2 \times 10^{-6}$
	1.49	$<1 \times 10^{-5}$
<i>FCGR2A</i>	1.35	$6.78 \times 10^{-7}$
	1.30	0.0016
<b>Good evidence</b>		
<i>TNFSF4</i>	over: 1.63 (T/U) and 1.28 <sup>b</sup> under: 0.76 (T/U) and 0.71	over: $1.91 \times 10^{-6}$ under: $6.08 \times 10^{-7}$
<i>BANK1</i>	1.38	$3.7 \times 10^{-7}$
<i>FCGR3B</i> copies	2.21 <sup>c</sup>	$2.7 \times 10^{-8}$
<i>MECP2</i>	1.39	$1.2 \times 10^{-8}$
<i>KIAA1542</i> (? <i>IRF7</i> )	1.28	$3.00 \times 10^{-10}$
<i>PXK</i>	1.25	$7.10 \times 10^{-9}$
<i>NMNAT2</i>	1.18	$1 \times 10^{-10}$
<i>ATG5</i>	1.19	$1.36 \times 10^{-7}$
<i>XKR6</i>	1.23	$2.51 \times 10^{-11}$
<i>ICA1</i>	1.32	$1.90 \times 10^{-7}$
<i>LYN</i>	1.30	$5.4 \times 10^{-9}$
<i>C8orf12</i>	1.22	$4.00 \times 10^{-10}$
<i>UBE2L3</i>	1.22	$7.53 \times 10^{-8}$
<i>SCUBE1</i>	1.28	$1.21 \times 10^{-7}$
<b>Further data required</b>		
<i>PDCD1</i>		
<i>TYK2</i>		
<i>CTLA4/ICOS</i>		
<i>CRP</i>		
<i>MBL</i>		

Los anticuerpos antinucleares, son los más característicos autoanticuerpos en Lupus, contra componentes del núcleo, los anticuerpos anti- doble cadena de DNA o anti-Sm están presentes en más del 90% de los pacientes con Lupus (18).

Los autoantígenos ribosomal P, consisten en tres proteínas, componentes de la subunidad ribosomal 60S, designados como P0, P1 y P2. El análisis de un gran número de pacientes con LES ha demostrado la fuerte asociación con la actividad clínica del LES a nivel renal, hígado y compromiso cerebral. Se ha reportado que los anticuerpos anti-P ribosomal inducen a la producción de citocinas pro-inflamatorias por parte de monocitos de sangre periférica (40).

La pérdida de tolerancia contra múltiples antígenos, principalmente de origen nuclear conlleva a la generación de células B y T autorreactivas. En los pacientes con LES se ha demostrado que existe un defecto en la tolerancia en las vías de control de células B nativas, lo que conduce a la acumulación de un elevado número de las células B autorreactivas que producen anticuerpos poli- reactivos contra antígenos propios y antígenos extraños (19).

### **3.3 OTROS SISTEMAS GENÉTICOS INVOLUCRADOS EN EL LUPUS.**

#### **3.3.1 Polimorfismo genético del receptor de la vitamina D (VDR).**

Las variaciones en la secuencia del ADN que se observan en más del 1% de la población se denominan polimorfismos y entre ellos los que se producen por un cambio en una única base se denominan polimorfismo de un único nucleótido (SNP). Parece que la inmensa mayoría de las variaciones genéticas que contribuyen a las enfermedades genéticamente complejas probablemente estén representadas por dichos SNP. Dado que existen unos 4.200 millones de pb en el DNA genómico humano y que hay un SNP por cada 1000 pb, se calcula que existen al menos un 4 millones de SNP, que además contribuyen a todas las características diferenciales individuales (estatura, peso, color de ojos, tipo de piel). Los SNP pueden localizarse en las regiones codificadoras y modificar la estructura de la proteína al cambiar un aminoácido. Estos polimorfismos pueden estar también en regiones promotoras alterando la expresión de las proteínas. En algunos casos, los SNP pueden ser silentes al no variar el aminoácido codificado, pero incluso en esos casos podrían producir variaciones del producto proteico por mecanismos aún no del todo conocidos (41).

Para que un SNP contribuya a una enfermedad, debe de cumplir una serie de requisitos:

- Producir una alteración en la función o en la expresión del producto génico;

- Existir un estudio de ligamiento con una potencia adecuada que establezca la asociación con la enfermedad;
- El mecanismo debe de ser plausible desde el punto de vista biológico, a ser posible mediante una demostración en modelos experimentales animales.

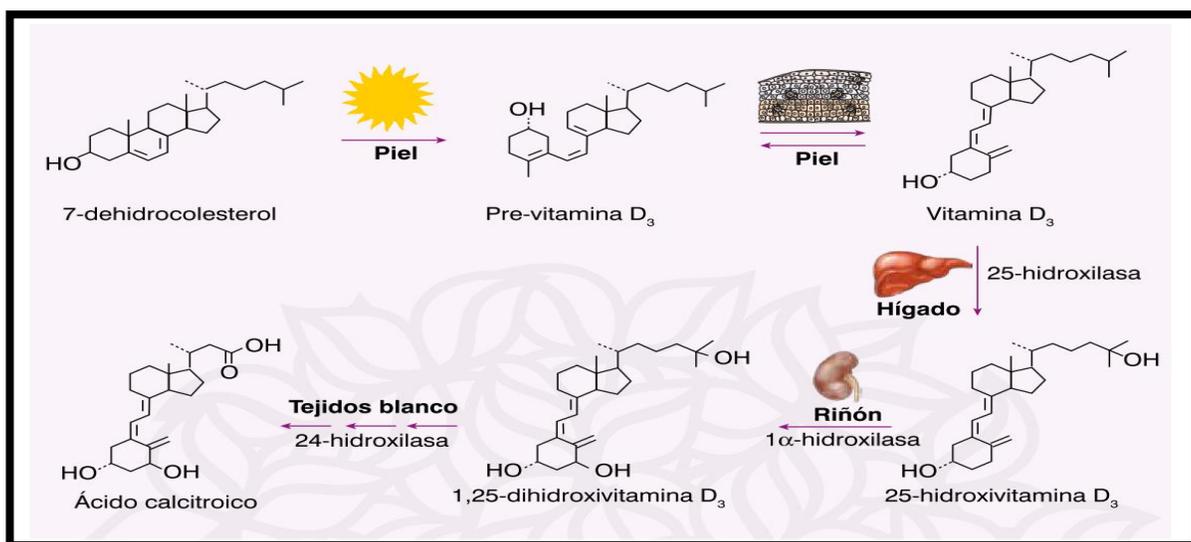
El polimorfismo SNP del gen VDR ha mostrado una marcada variación alélica en estudios de población. Los SNP más estudiados se encuentran en la región 3' del gen VDR a nivel del intrón ubicado entre los exones 8 y 9 (42).

En humanos, el gen del VDR se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 y comprende una región de aproximadamente 100 kb de ADN aunque sólo 4,6 kb son los que codifican para proteína. La proteína VDR es una fosfoproteína de 427 aminoácidos y 48 kDa en la que se reconocen 2 dominios fundamentales, uno de unión al ADN (DBD) y otro de unión al ligando (calcitriol) (LBD) (43).

### **3.3.1.1 Vitamina D.**

Es una vitamina liposoluble que se puede encontrar en dos formas: Ergocalciferol o vitamina D2 en vegetales y Colecalciferol o vitamina D3 en animales. Actualmente es considerada como pro-hormona porque tiene muchas funciones. Al convertirse en su forma activa o 1, 25- dihidroxivitamina D3, adquiere efecto autocrino, endocrino y paracrino.

**Figura 0-2. Síntesis y metabolismo de la Vitamina D.**



Modificado de : Nohora Alejandra Zuluaga Espinosa. Et al. Vitamina D: nuevos paradigmas. Medicina y Laboratorio. 2011, 17: 211-246

La vitamina D<sub>3</sub> o colecalciferol se obtiene principalmente de dos fuentes básicas que son: la dieta (10%) y la producción endógena por conversión fotoquímica a partir de 7- dehidrocolesterol en la epidermis (90%). Esta síntesis endógena se induce por la exposición de la piel a los rayos ultravioleta B (UVB) de la luz solar (290- 315 nm) que generan conversión fotolítica del 7- dehidrocolesterol a pre vitamina D<sub>3</sub>, seguido por isomerización térmica no enzimática a vitamina D<sub>3</sub>. Para ejercer sus efectos fisiológicos, la vitamina D debe convertirse a su forma activa. Para ello inicialmente es transportada por la proteína de unión a vitamina D (DBP), una proteína fijadora específica para vitamina D y sus metabolitos (44-46).

La primera hidroxilación en el carbono 25 de la vitamina D ocurre en los hepatocitos, catalizado por varias enzimas con función de citocromo P450, como son CYP2R1, CYP2D11, CYP2D25, CYP27A1, CYP3A4 y CYP2J3, estas enzimas actúan como 25-hidroxilasas, especialmente la CYP2R1 (47, 48). De esta manera,

se convierte en 25- hidroxivitamina D3, la cual es transportada por la proteína de unión de la Vitamina D (DBP) hasta el riñón en donde sufre la segunda hidroxilación en el carbono 1 del anillo A por parte de la 1- $\alpha$ - hidroxilasa mitocondrial, localizada en los túbulos contorneados proximal y distal de la nefrona, convirtiéndola en 1,  $\alpha$ -25-dihidroxivitamina D3, forma biológicamente activa. La 1- $\alpha$ - hidroxilasa también puede ser sintetizada de manera extra-renal en placenta, monocitos, macrófagos, próstata, mama, colon, corazón, pulmón, cerebro, queratinocitos, células  $\beta$  pancreáticas y células paratiroides (47-49).

La DBP es un componente grupo específico (Gc-Globulina), con un peso de 51-58 kDa y funciones múltiples. Se comporta como glicoproteína sérica y es sintetizada por los hepatocitos y secretada a la circulación en una forma monomérica de 458 residuos y tres dominios estructurales. Un estudio realizado en Irlanda utilizando pacientes con AIJ oligoarticular y poliarticular por el método de MALDI-TOF pudo determinar la presencia de varias isoformas para esta Proteína (47).

La regulación del metabolismo de la Vitamina D3 se lleva a cabo por un proceso de retroalimentación positiva y negativa que resultan en cambios de las enzimas hidroxilasas, con el fin de aumentar o disminuir los niveles de 1, 25- dihidroxivitamina D3, según el estado fisiológico. Los niveles bajos de calcio inducen un aumento en la actividad de la 1- $\alpha$ - hidroxilasa, ya que este es detectado por el receptor sensible al calcio (CaSR) de las células paratiroides, aumentando la secreción de la paratohormona (PTH) e induciendo la transcripción de la 1- $\alpha$ - hidroxilasa en las células tubulares proximales del riñón. Al estimularse la actividad de dicha enzima, se favorece la producción de 1, 25- dihidroxivitamina D3 la que interactuará con su receptor VDR, generando dos efectos principales: promover la absorción intestinal y la liberación en la matriz mineral ósea de Calcio y Fosfato. Al corregirse el déficit en la concentración sérica de calcio, se genera regulación a la baja del eje 1, 25- dihidroxivitamina D3 –PTH, lo cual es controlado

por el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF-23), liberado en el hueso. De tal manera que la densidad mineral ósea juega un papel preponderante en la regulación del metabolismo de la vitamina D3 (46).

La vitamina D tiene acción directa en la inmunidad innata y adaptativa, específicamente sobre los macrófagos, células dendríticas y linfocitos T y B. Los Macrófagos sintetizan la enzima 1- $\alpha$ - hidroxilasa cuando son estimulados con INF- $\gamma$ , favoreciendo la expresión del VDR en dichas células. La 1, 25-Dihidroxitamina D3 inhibe la maduración de las células dendríticas derivadas de los monocitos y suprime su capacidad para presentar antígenos, promoviendo un fenotipo tolerogénico (47). La 1, 25 -dihidroxitamina D3 suprime la proliferación, diferenciación y producción de Inmunoglobulinas en los Linfocitos B. En los Linfocitos T, modula su proliferación y producción de citosinas. Inhibe la expresión de citosinas Th1 (IL-2, INF-  $\gamma$ , TNF), e induce la expresión de citosinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 (48, 50) y Macrófagos (51).

La vitamina D se asocia a muchas enfermedades como la Artritis Reumatoide (52) el Asma (53-57), la diabetes (58), la esclerosis múltiple (59), la psoriasis vulgarica (60) incluso, la vitamina D puede emplearse como suplemento para la activación de células de la inmunidad innata en recién nacidos. También puede ser usada como inmunomoduladora en pediatría (61). Estudios experimentales en animales refieren que la Vitamina D puede regular la respuesta inflamatoria en la injuria colónica (62).

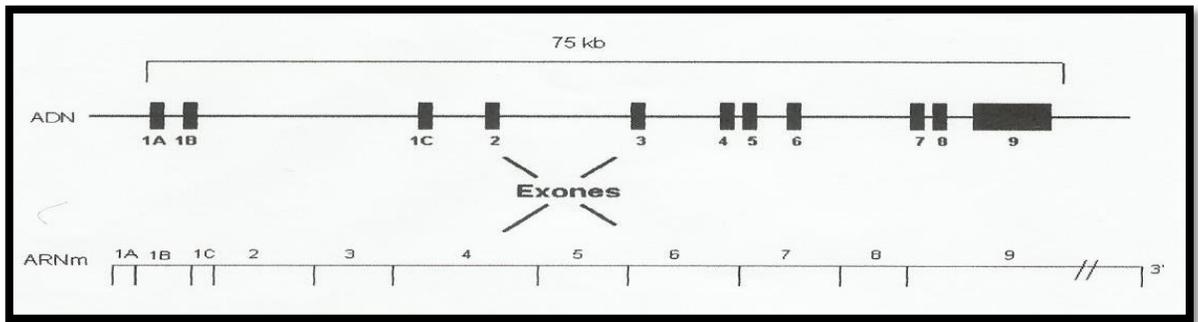
Un reciente estudio realizado en la India determinó que niveles insuficientes o deficientes de Vitamina D están asociados al Lupus Eritematoso Sistémico (LES), así como a otras enfermedades inflamatorias crónicas (63).

Los valores de referencia actuales para clasificar los niveles Vitamina D son (ELISA Kit Millipore):

- Nivel deficiente, <10 ng/ml
- Nivel insuficiente, entre 10 a 29 ng/ml
- Nivel suficiente, de 30 a 100 ng/ml y
- Nivel de intoxicación potencial, >100 ng/ml.

### **3.3.1.2 Gen VDR.**

Este gen está localizado en el cromosoma 12 q13- 14 y fue secuenciado por Miyamoto K. y col. En 1997. Carece de caja TATA, tiene zonas ricas en GC, lo que le confiere una variedad de sitios de unión a distintos factores de transcripción (64). Actualmente se ha obtenido una estructura tridimensional en la que se puede apreciar los diferentes sitios de unión, tanto al ADN como al ligando (41). El gen VDR está formado por 11 exones y sus intrones asociados (figura 3-3). En la zona 5' no codificante se encuentran los exones 1A, 1B, 1C y como consecuencia del proceso de transcripción alternativo de estos exones, se pueden formar tres tipos de mRNA. Los exones del 2 al 9 codifican la estructura de la proteína producto de este gen o VDR propiamente dicho. El exón 2 codifica un primer dedo de zinc de la proteína, formado por 21 aminoácidos aa y el exón 3 codifica el segundo dedo de zinc formado por 16 aa. Estos exones y sus intrones parecen estar bastante conservados en los genes de la familia de receptores nucleares. Lo único que diferencia al gen del VDR humano del resto de los receptores nucleares, es la presencia de un exón 5 adicional que codifica los Aa desde 155 hasta 194 (hélices H1 y H3) (64).



**Figura 0-3. Gen VDR**

### 3.3.1.3 Dominios estructurales del VDR.

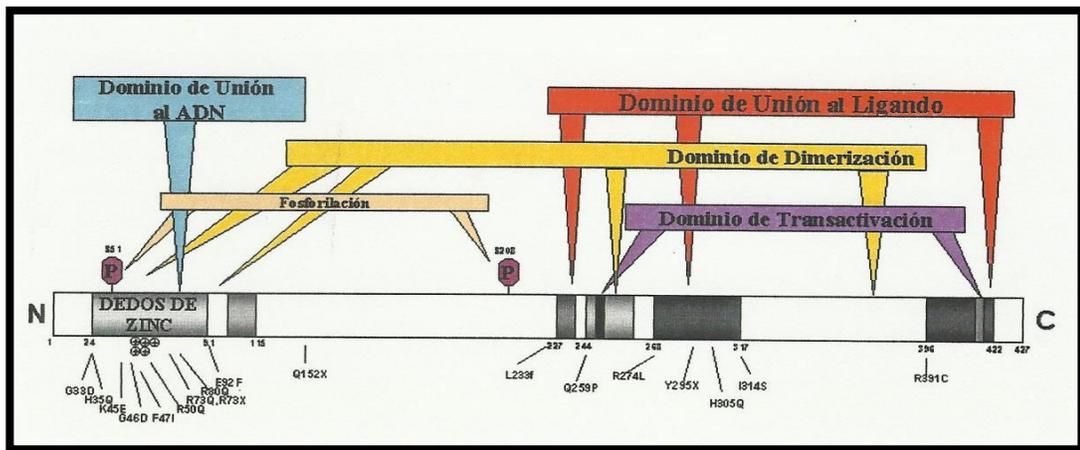
El VDR es un reconocido miembro de la superfamilia de receptores nucleares que regulan la expresión de genes de forma dependiente del ligando. Atendiendo a sus características de dimerización y propiedades de unión al ADN, el VDR está clasificado en la clase II o receptores de las hormonas, de la cual hace parte el receptor de la hormona tiroidea (TR), ácido retinoico (RAR), ácido 9-cis retinoico (RXR) y troglitazona (PPARs). La proteína VDR está formada por distintos dominios con respecto a su acción: el dominio de unión al ADN, el de unión a la hormona, el relacionado con la dimerización y el relacionado con la transactivación (64, 65).

La función del VDR como mediador de las acciones biológicas de la 1,25-dihidroxitamina D3 se puede explicar de la siguiente manera: La 1,25-dihidroxitamina D3 atraviesa la célula hasta el núcleo y allí se une con el VDR. Esta unión produce un drástico cambio conformacional en el VDR, posiblemente producido por la fosforilación de residuos de serina. Una vez que se ha formado el complejo 1,25-dihidroxitamina D-VDR activo (VDR\*), este último se une fuertemente al RXR, constituyendo así el heterodímero que probablemente llevará a cabo la función biológica de la 1,25-dihidroxitamina D3. El RXR no se

encuentra unido a su ligando, ya que cuando esto ocurre se desplaza el heterodímero y se forma un homodímero RXR-RXR.

**Figura 0-4. Dominios estructurales del VDR.**

Begoña Maestro Gutiérrez. Modulación transcripcional del gen del receptor de insulina por la 1,25-dihidroxitamina D3. Universidad complutense de Madrid. 2003, 1: 2 -12.(Modificada)



El heterodímero (VDR\*-RXR) se une a secuencias específicas de ADN que se denominan elementos de respuesta a 1,25-dihidroxitamina D3 (VDREs), situadas en el promotor de genes respondedores a esta hormona. En un paso posterior pueden unirse proteínas co activadoras de receptores esteroides, SRC y factores transcripcionales IIB, entre otros, aumentando la actividad transcripcional del VDR 1,25-dihidroxitamina D3 dependiente (44, 64).

### 3.3.1.4 Polimorfismos en el gen VDR.

Hasta la fecha existen más de 14 polimorfismos diferentes en el gen humano del VDR que pueden actuar modulando la respuesta a la vitamina D en los diferentes órganos diana. De todos los polimorfismos descritos, los más estudiados son 4 SNP (polimorfismo de cambio de nucleótido único) que se nombran con la enzima

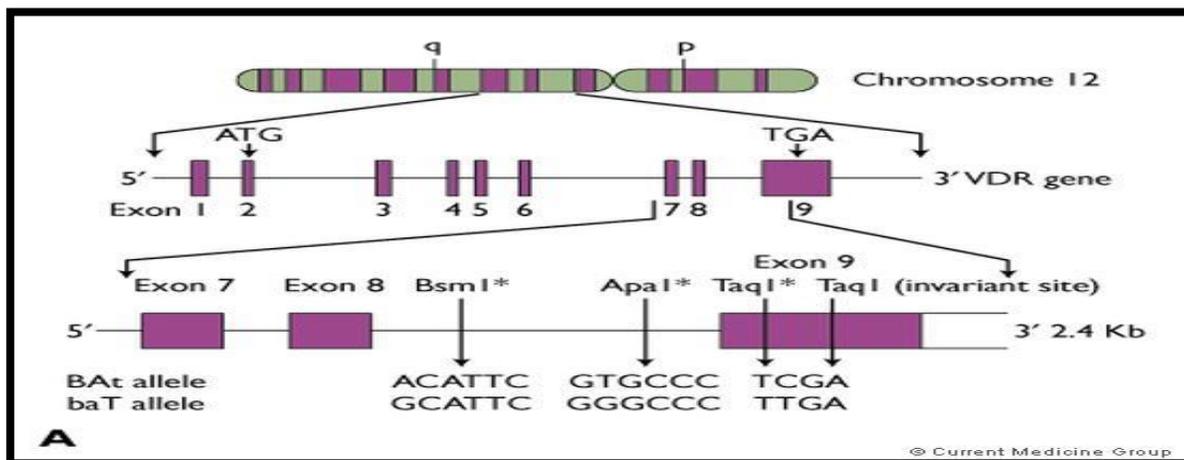
de restricción que permitió su identificación, se denominan Fok I F>f (rs2228570), BsmI B>b (rs1544410), ApaI A>a (rs7975232) y TaqI T>t (rs731236). Los polimorfismos ApaI, BsmI, TaqI están localizados cerca del extremo 3' terminal del gen VDR; el polimorfismo FokI está localizado en el exón 2, BsmI y ApaI están localizados en el intrón 8 y TaqI es un SNP silencioso en el exón 9 (65, 66).

BsmI está situado en el intrón 8 y en él se da una sustitución de guanina por adenina (A- G); Los polimorfismos ApaI y TaqI se encuentran en la región 3' del gen. El polimorfismo ApaI se define por la sustitución de guanina por timina (T -G) en el intrón 8, mientras que el polimorfismo de TaqI, está en el exón 9. En él se da el cambio de citosina por timina (C-T). Lo anterior resulta en el cambio de codón (ATC por ATT), pero manteniendo el mismo aminoácido isoleucina (65, 67). La relevancia funcional de estos polimorfismos se asocia con aumento de la estabilidad del ARN mensajero. El polimorfismo FokI resulta del cambio de una citosina por timina (T-C) la sustitución se da en la unión de intrón 1 con el exón 2, conllevando a la creación de un codón de inicio adicional (ACG → ATG) y tres codones proximales al sitio de inicio de la transcripción. Este polimorfismo puede ser considerado como un marcador genético independiente, ya que no parece ser el desequilibrio de ligamiento (68, 69).

Dichos polimorfismos se asocian a muchas otras enfermedades diferentes entre ellas la diabetes (42), Asma (43), enfermedades cardiovasculares (70), cáncer de próstata, melanomas (71), cáncer ovárico (72), otras enfermedades autoinmunes (73), cáncer de cerebro (74) y otras enfermedades metabólicas (75).

En un estudio realizado en Johannesburgo Sur África con población negra y blanca determinó que las concentraciones de citocromos CYP24A1 eran significativamente mayor en la población negra, coherentemente con la expresión del polimorfismo FokI del VDR y la vitamina D3 (76, 77).

Figura 0-5. Polimorfismos del VDR.



### 3.3.2 La deficiencia de vitamina D en pacientes con LES.

En 1979 se dio el primer informe que sugirió una asociación entre la deficiencia de vitamina D y LES. Fue un estudio de 12 adolescentes con lupus dependientes de glucocorticoides, que mostraron bajos niveles de 1,25 (OH) 2D en siete de ellos (78). En 1995, un estudio realizado en Dinamarca involucro 21 pacientes con LES, 29 con AR, 12 con osteoartritis (OA), y 72 sujetos sanos. Este estudio mostró niveles significativamente más bajos de 25 (OH) Vit D3 en los pacientes con LES cuando se compararon con los pacientes con artrosis y los controles sanos (79). En el 2001, otro estudio evaluó 57 pacientes con LES y encontró deficiencia de vitamina D en 25 pacientes (43.9 %); en nueve de estos pacientes, los niveles de 25 (OH) D3 estaban por debajo de 5 ng / ml . En este estudio también se mostró asociación de niveles bajos de 25 (OH) D3 con mayores niveles de actividad de la enfermedad –SLEDAI (80). En el 2006, en el estado de Carolina del Sur, EE.UU, 123 pacientes con LES y 240 controles sanos fueron evaluados para determinar los niveles de 25 (OH) Vit D3. Después de ajustar los resultados por etnia,

género, tabaquismo, y la estación, los pacientes caucasoides de origen Europeo, tenían niveles significativamente más bajos que los controles ( $21,6 \pm 12,9$  frente a  $27,4 \pm 15,7$  ng / ml,  $0,04$   $p < 0,004$ ) En los pacientes afrodescendientes, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En general, el 67 % de los pacientes tenían deficiencia de vitamina D, y la concentración media de 25 (OH) Vit D3 fue significativamente menor en los pacientes de origen africano, en comparación con los caucasoides ( $15,9 \pm 9,4$  frente a  $31,3 \pm 14,9$  ng / ml ,  $p < 0,01$ ). Los niveles más bajos de la vitamina D3, que fueron definidos como por debajo de 10 ng / ml se encontraron en 22 pacientes con LES y enfermedad renal (81). En el 2008, un estudio realizado en Texas, con 37 mujeres con lupus mostró niveles de 25 (OH) D3 por debajo de 19 ng / ml en el 65 y el 20 % de ellos, respectivamente (82). Ese mismo año, los autores españoles realizaron un estudio de corte transversal en 92 pacientes que mostraron niveles de 25 (OH) Vit D3 por debajo de 30 ng / ml en 69 (75 %) pacientes y por debajo de 10 ng / ml en 14 (15 %) pacientes (83).

En 2009, un estudio realizado en Chicago incluyó 181 mujeres con LES y encontraron niveles de 25 (OH) Vit D3 promedio de  $27,1 \pm 11,9$  ng / ml .En el mismo estudio, el 62,2 % de los pacientes tenían dosis inferiores a 30 ng / ml (84). Ese mismo año, los mismos autores estudiaron a 165 pacientes con LES y 214 controles sanos en Arabia Saudita. Este estudio mostró niveles insuficientes ( $>20$  y  $< 30$  ng / ml ) y deficientes ( $\leq 20$  ng / ml ) de 25 ( OH ) Vit D3 en los casos (98 frente a 55 % y el 89,7 frente al 20 % , respectivamente ,  $p < 0,0001$ ) (85).

En 2010, otros investigadores canadiense estudiaron 124 pacientes con LES y encontraron niveles de 25 (OH) Vit D inferiores a 32 ng / ml en el 66,7 % de los pacientes y por debajo de 16 ng / ml en el 17,9 % de los pacientes (86). Resultados similares se encontraron en un estudio de 198 pacientes realizados en Nueva York (87).

Un estudio con 177 pacientes de Hungría encontró niveles de 25 (OH) D de  $26,88 \pm 13,25$  ng / ml .Un 18,1 % de ellos tuvo niveles normales ( $\geq 30$  ng / ml ) , el 44,6 % insuficiente ( 15-30 ng / ml ) , y 37,3 % deficientes (  $\text{ng} \leq 15$  / ml ) dosis (88).

En 2011, un estudio canadiense analizo 25 pacientes con LES y 25 con fibromialgia y no encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa en los niveles de 25(OH)D<sub>3</sub> entre los grupos (18,6 frente a 20,6 ng/ml,  $p > 0,05$ ), incluso después del ajuste por edad (89). Pocos estudios han examinado los niveles de vitamina D en los niños y adolescentes con LES. Uno de estos estudios midió 25(OH)D<sub>3</sub> en sujetos de 5 a 21 años y 207 controles sanos. Niveles muy bajos de 25 (OH) D, (definida por los autores como menos de 10 ng/ml) se encontraron significativamente más frecuentes en los pacientes con LES que en los controles (36,8 frente a 9,2 %,  $p < 0,001$ ) (90).

En Brasil un grupo de investigadores evaluaron 36 pacientes con LES y 26 controles sanos en São Paulo. La conclusión fue que hay una mayor prevalencia de la deficiencia de vitamina D en los pacientes con LES, especialmente aquellos con la enfermedad activa (91). Un estudio piloto llevado a cabo en Rio Grande do Soul, con la participación 68 pacientes con LES, encontró que los niveles de 25(OH) VITD fueron de 20 ng / ml en el 20% de los casos (92). Otro estudio realizado en Brasil evaluó la prevalencia de insuficiencia de vitamina D en 159 pacientes con LES y su relación con, variables clínicas, demográficas y de laboratorio. También estudiaron la relación entre la insuficiencia de vitamina D y actividad de la enfermedad. La prevalencia de insuficiencia de vitamina D fue de 37,7 % y la deficiencia fue del 8,2 %, y los niveles de 25 (OH) D no se asociaron con de actividad lúpica, duración de la enfermedad, exposición al sol, los suplementos de vitamina D, o el uso de corticosteroides (93).

En 2011, estudios llevados a cabo en poblaciones chinas examinaron la relación entre el 25 (OH) VITD, en pacientes con LES. En uno de ellos Doscientos setenta y siete (96 %) pacientes tenían insuficiencia de vitamina ( $< 30$  ng / ml), y 77 ( 27 %) pacientes tenían deficiencia de vitamina D ( $< 15$  ng / ml) (94, 95).

### **3.3.3 Polimorfismo del gen VDR en pacientes con LES.**

En la literatura se ha descrito una relación entre el polimorfismo Bsml del gen VDR con LES En el 2000, un estudio japonés que involucró 58 pacientes con LES evidenció una frecuencia mayor del genotipo B/B (15,5 frente a 5,7 %,  $p < 0,0001$ ), en comparación con los controles sanos. Además, en esta misma publicación se encontró una mayor frecuencia del genotipo b/b en pacientes con nefritis lúpica. (61,5 frente a 35,7 %,  $p = 0.0034$ ) (96).

En 2002, investigadores chinos estudiaron 47 pacientes con LES y 90 controles sanos y encontraron una mayor frecuencia del alelo B en los casos, 39,4 frente a 8,3 %, OR 07.4,  $p < 0,0001$ . En 2006 y 2010 estudios en 101 pacientes procedentes de Tailandia y 60 de Irán, respectivamente, no encontraron ninguna asociación entre el polimorfismo Bsml y LES. Otro estudio en el 2002, evaluó el polimorfismo FokI en 52 pacientes con LES y 90 controles sanos y no encontró diferencias significativas en las frecuencias de los alelos y el genotipo (97-99).

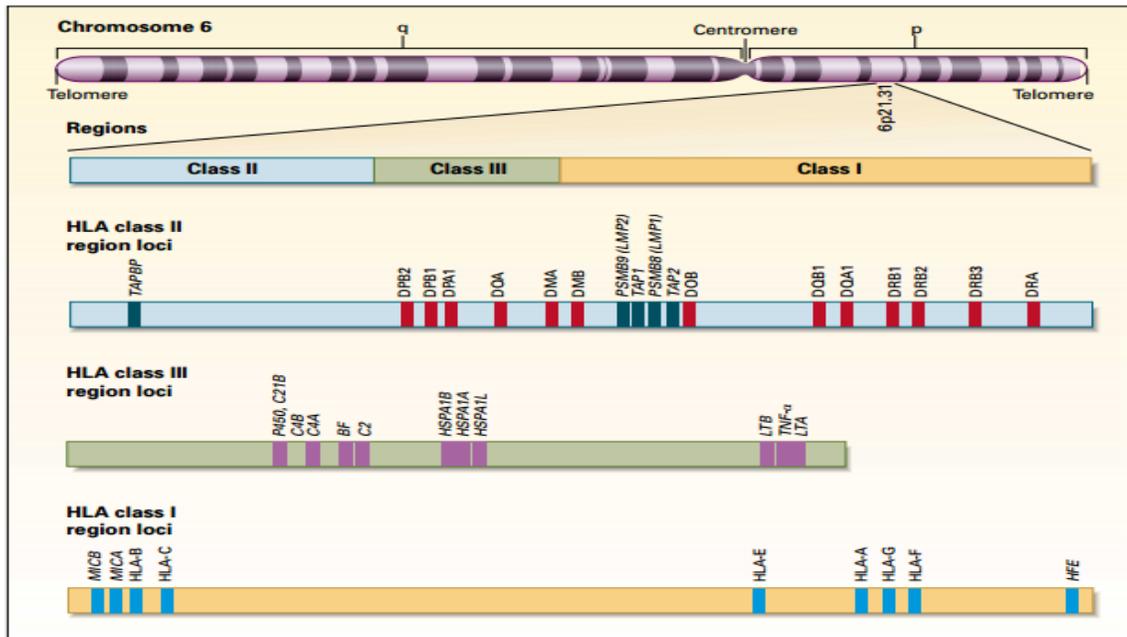
Un meta-análisis publicado en el 2010 evaluó los polimorfismos Bsml y FokI en pacientes con LES. Los autores encontraron que el alelo B de Bsml tiene una significativa asociación con LES (OR:=3.58,  $p = 0.007$ ). Los resultados con el polimorfismo FokI no fueron significativos. Este meta-análisis mostró que estos resultados deben ser interpretados con cautela debido al pequeño número de estudios que se incluyeron; además estos resultados sólo incluyeron estudios de Europa y Asia (100).

Un estudio de casos y controles realizado en Brasil también investigó la relación entre los polimorfismos BsmI y FokI VDR con la susceptibilidad a LES en 195 pacientes caucasoides. Además, se midió 25 (OH) D<sub>3</sub> no hubo asociación entre los polimorfismos BsmI y FokI VDR con la susceptibilidad a LES. Los niveles promedios de 25 (OH) Vit D en suero fueron  $25,51 \pm 11,43$  ng / ml en los pacientes con LES. Los niveles de 25(OH)D<sub>3</sub> fueron significativamente mayores en los pacientes que expresaron el genotipo f/f en comparación con los pacientes portadores del genotipo F/F ( $31,6 \pm 14,1$  frente a  $23,0 \pm 9,2$  ng/ml,  $p=0.004$ ). El polimorfismo FokI no mostro asociación significativa con LES (101).

### **3.4 GENES MHC Y ANTÍGENO LEUCOCITARIO HUMANO HLA.**

El sistema MHC es controlado por los genes ubicados en el brazo corto del cromosoma 6, el cual contiene alrededor de 200 genes. Los loci del sistema HLA forman parte de la región genética conocida como el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) el cual se extiende por unos 4 millones de pares de bases (pb) entre 6p21.31 y 6p21.32.1. La región telomérica Clase I contiene los genes HLA-A,-B, y C, que presentan péptidos antigénicos a las células T CD8 +. La región centromérica contiene los genes *HLA* clase II que comprende los antígenos (glicopéptidos) de superficie celular llamados HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. Estas moléculas están presentes en células inmunocompetentes, tales como linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, células endoteliales y linfocitos T activados. La molécula de HLA de Clase II consiste en dos cadenas cada una codificada por los genes en el "Complejo HLA" en el cromosoma 6. La región Clase III se encuentra entre las regiones I y II y contiene muchos genes relacionados con la respuesta inmune incluyendo las citocinas, TNF  $\alpha$  y linfotóxina  $\alpha$  y los componentes del complemento C2, C4 y factor B (27, 38) (Figura 3-6).

**Figura 0-6. Localización y organización del complejo HLA en el cromosoma 6.**



**Fuente:** (Jan Klein, y Akie Sato., *N Engl J Med* 2000).

Cabe destacar que entre los genes más estudiados en relación a la susceptibilidad al LES están los del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II (MHC-Clase II) describiéndose asociaciones o susceptibilidades para varias moléculas HLA. Se ha reportado por ejemplo los alelos HLA-DRB1\*0301 y HLA-DRB1\*1501 asociados a el LES y a autoanticuerpos (3); así mismo en población colombiana se han descrito desequilibrio de ligamiento entre HLA-DRB1\*0301 y TNF $\alpha$  en pacientes con Lupus (102). El HLA-DR3 que hace parte de un haplotipo “autoinmune” (HLA A1, B8, DR3, DQ2) se ha encontrado en poblaciones blancas en desequilibrio de ligamiento con algunos alelos de TNF $\alpha$  y complemento (C4 nulo) situados muy cerca de la región MHC-III, aunque no es claro que genes en el haplotipo extendido pueden ser responsables de la susceptibilidad a la enfermedad. HLA-DR2 se ha asociado con bajos niveles de TNF $\alpha$  y susceptibilidad a nefritis (103). En población taiwanesa se evaluó la asociación del HLA-DRB1 con LES y con nefritis lúpica encontrando que los alelos HLA-

DRB1\*0301 y HLA-DRB1\*1501 son factores de riesgo significativos para el LES, mientras que el alelo HLA-DRB1\*1202 es de protección para la nefritis lúpica (104).

Otros alelos HLA se han asociado al desarrollo de diversos autoanticuerpos, entre estos están HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DR7 (Anti-Ro), HLA-DQB1 (Anti-DNA), HLA-DR4, HLA-DR7, HLA-DQ6, HLA-B61 (Anti-Sm). Todos estos hallazgos en los diversos estudios del HLA y su relación con LES sugieren que las moléculas HLA-II promueven la expansión de LT específicos para autoantígenos y la producción de autoanticuerpos (3, 27, 105, 106).

En un estudio que incluyó un grupo de 55 pacientes (niños y adolescentes) mestizos de Brasil, evidenció una correlación del alelo HLA-DRB1 con las características clínicas de la enfermedad, los auto-anticuerpos y la clasificación histológica renal, encontrando al HLA-DRB1\*15 como el alelo más frecuente en pacientes con insuficiencia renal, trastornos musculoesqueléticos, cutáneos, hematológicos, cardíacos y neuropsiquiátricos, así como en pacientes positivos para anticuerpos anti-dcDNA, anti-Sm, anti-U1-RNP y anti-SSA/( Anti-Síndrome de Sjogren (A), Autoanticuerpos SSA o Ro ) (107).

Posteriormente un estudio multicéntrico en población caucásica de los Estados Unidos exploró el efecto de diferentes combinaciones de haplotipos HLA clase II en 780 familias con LES. Se encontró que los haplotipos que tienen los alelos DRB1\*1501/DQB1\*0602 (DR2) y DRB1\*0301/DQB1\*0201 (DR3) están presentes en casi dos tercios de los casos de LES asociándose de forma significativa con la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad (108).

En el año 2008 un grupo de investigadores Colombianos de las ciudades de Bogotá y Medellín, realizó un meta-análisis de 11 estudios seleccionados de población latinoamericana, que incluyó 747 casos y 1180 controles. Se demostró una fuerte asociación con el alelo HLA-DRB1\*0301 (OR: 2,14, IC 95%: 1,28 a 3,56). Y un efecto protector para HLA-DR-5 (OR: 0.43, IC 95%: 0.27 hasta 0.67), debido principalmente a la asociación negativa observada entre el HLA-DRB1 \* 1101 alelo y LES (109).

En ese mismo año realizaron un estudio basado en la determinación de HLA-DQB1 en 40 pacientes con LES y 83 individuos sanos del Noreste de Irán, de los cuales 26 pacientes con LES fueron positivos para HLA-DQ\*0601-\*0609. Estos resultados sugieren que DQ6 es el alelo HLA-DQB1 dominante más probablemente asociado con la susceptibilidad genética a la LES, en el noreste de Irán. La asociación apoya la importancia de su origen étnico e indica la importancia de varios genes que se ha observado en diferentes poblaciones de LES (110). De igual forma un estudio realizado en 53 pacientes con LES del Occidente de India, reportó un aumento significativo en la frecuencia de los alelos DQB1\*0302 y DQB1\*0601 vinculándolos al desarrollo de la enfermedad.

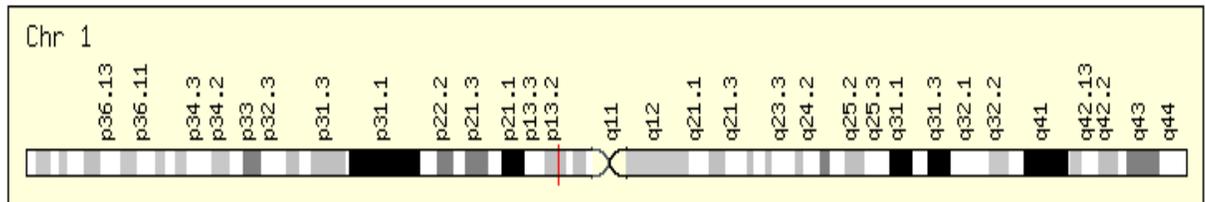
La amplia y diversa información en relación con la asociación entre los diferentes alelos de los exones de los Loci MHC Clase II: DRB\*1 y DQB\*1 se pueden explicar en razón a las diferencias no solo de la estructura genética entre las diferentes poblaciones en los cuales se han llevado a cabo estos estudio sino también debido al extenso polimorfismo de estos dos exones que conlleva a la variabilidad proteica de antígenos HLA( fenotipos) (104, 106, 108, 109).

### **3.5 GEN DE LA PROTEÍNA TIROSINA PHOSPHATASA PTPN22.**

Este gen localizado en el cromosoma 1p13.3-p13.1(Figura 3-7), codifica para la proteína tirosina fosfatasa linfocitaria intracelular LYP, con un peso molecular de 110

KD que contiene un dominio catalítico N-terminal y uno no catalítico C-terminal con 4 dominios ricos en prolina. LYP que es desfosforilada por las cinasas Lck, Fyn, y Zap-70, tiene una gran importancia en la señalización de los LT.

**Figura 0-7. Localización del gen PTPN22 en el cromosoma 1.**



**Fuente:** (*The Gene Cards human gene database*).

Una función descrita de LYP es la inmunomodulación negativa para la activación de los Linfocitos T, Esta función está ligada a su dominio C terminal. Otra proteína, la tirosina cinasa (Csk). Interactúa con LYP en la activación de las células T. Csk es un supresor esencial de las cinasas que participan en la activación de las células. La capacidad de Csk y LYP para inhibir la señalización del receptor de células T requiere de una asociación física. LYP físicamente se enlaza por un motivo rico en prolina (P1) al dominio SH3 de la cinasa Csk (138). Csk actúa fosforilando la tirosina 505 (fosfatasa inhibitoria para Lck), mientras que PTPN22 actúa removiendo el fosfato de activación en la tirosina 394, convirtiendo a Lck en una configuración inactiva, causando una regulación negativa de la vía de señalización de células T. A través de todo este conjunto de eventos biológicos LYP inhibe la activación de los Linfocitos T (111, 112).

Igualmente se ha descrito que la interacción entre LYP y un adaptador de la molécula Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2), juega un papel en la regulación negativa en la función de los linfocitos T. LYP se une al complejo de Grb2 en los dominios ricos de prolina de la molécula CTLA-4 ayudando en la inhibición de la activación de las células T. Grb2 juega un papel importante en la

regulación de la señalización para que se produzca la activación de CD28 que inicia la activación celular. La presencia de los dos dominios ricos en prolina SH2 y SH3 hacen que las moléculas CTLA-4 y CD28 se unan y con la consecutiva unión de Grb2 contribuyen para que la asociación se haga más fuerte y así aumente la inhibición celular (39, 113).

En el gen PTPN22, la sustitución de un triptófano por arginina en el codón 620 (R620W) rs2476601 genera un polimorfismo genético que se ha asociado con la susceptibilidad para se encuentra en diversas enfermedades autoinmunes, dentro de las cuales está LES y la enfermedad tiroidea autoinmune. El polimorfismo PTPN22 C1858CT funcional se encuentra asociado a LES demostrando susceptibilidad al desarrollo de esta patología (114).

El polimorfismo 1858C-T que resulta en un cambio de arginina a triptófano en la posición 620 de la proteína (R620W T) se encuentra localizado en el motivo P1 e interrumpe la interacción entre Lyp y Csk, evitando la unión del complejo, por lo tanto la supresión de la activación de las células T. Así, la asociación del alelo R620W con la enfermedad puede ser el cambio en la regulación de Lck causando la pérdida de la regulación negativa en la vía de señalización del receptor de células T. Es más probable que el polimorfismo R620W cause un cambio del nivel de actividad eficaz de PTPN22 en los compartimientos celulares, como una ganancia de función.

En una revisión realizada por un investigador de la ciudad de New York, puso de manifiesto, la asociación del gen PTPN22 en enfermedad tiroidea autoinmune, incluyendo tanto Enfermedad de Graves y Tiroiditis de Hashimoto, como con otras enfermedades autoinmunes. De igual forma en estudio de revisión realizado en el 2008, se demostró que a diferencia del gen CTLA-4, que se asoció con enfermedad tiroidea autoinmune en diversos grupos étnicos, el gen PTPN22 mostró solo asociaciones en población caucásica. Por otra parte, en un meta-análisis realizado por investigadores de China en cuatro estudios con población

asiática y siete estudios con Caucásicos (China, Japón, Polonia, Reino Unido, Alemania, Túnez, y Rusia), para un total de 3764 casos con Enfermedad tiroidea autoinmune y 3328 controles, a quienes se les había tipificado polimorfismo C1858T del gen PTPN22, encontrando un riesgo significativamente alto para el desarrollo de enfermedad tiroidea autoinmune en todas las poblaciones. Sin embargo en el análisis por subgrupos se encontró mayor riesgo en la población caucásica (115, 116).

### 3.6 TNF ALFA.

El Factor de Necrosis Tumoral es uno de los genes que participa en la regulación del sistema inmunológico y su producto proteico, el TNF- $\alpha$ , ha sido involucrado en la génesis de la inflamación y autoinmunidad a través de la expresión génica de diversos genes (117, 118).

**Figura 0-8. Localización y estructura del TNF-alfa.**

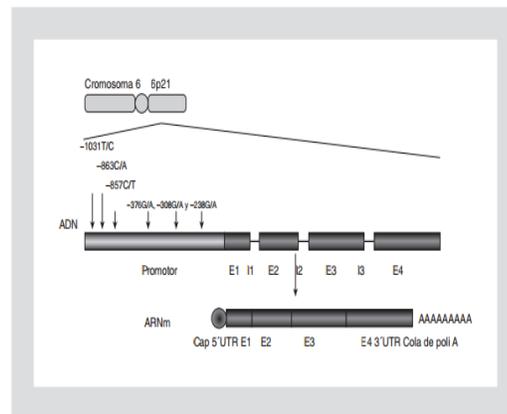
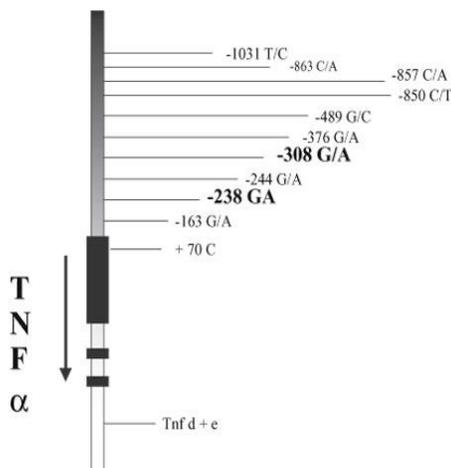


Figura 1. Localización y estructura del TNF- $\alpha$ . El gen TNF- $\alpha$  se encuentra en la región cromosómica 6p21.3; este gen está formado por su región promotora, cuatro exones y tres intrones. Diversos polimorfismos han sido descritos en su región promotora; varios de ellos son SNP funcionales, y se han asociado con EA e inflamatorias cardiovasculares. E: exón, I: intrón.

El gen está formado por una región promotora cuatro exones y e intrones.

Este gen, está ubicado en la región central del MHC, entre los *loci* HLA-B y HLA-D, en el brazo corto del cromosoma 6, en el segmento correspondiente a las moléculas MHC de clase III (figura 9) El TNF $\alpha$  es una molécula secretoria no glicosilada, de 17 kDa, que deriva de una de 26 kDa producida principalmente por macrófagos. En condiciones fisiológicas, forma un homotrímero de 55 kDa, no-covalentemente estabilizado (119). Posee 2 receptores de transmembrana, uno de 55 kDa (TNFR1 o p55R ó CD120a) y otro de 75 kDa (TNFR2 o p75R o CD120b), que serían parte de una familia emergente de receptores. Producto de digestiones proteolíticas del dominio extracelular de TNFR1 y TNFR2 se generan dos tipos de receptores solubles (*TNF binding proteins*), que estarían involucrados en la regulación de los niveles circulantes de la citoquina. El TNF  $\alpha$  es un agente clave en la inmunidad del huésped, con actividad antitumoral, antiviral y antimicrobiana. Induce crecimiento tisular, diferenciación de tejidos e inmunorregulación. En individuos sanos, sus niveles son variables, fluctuando entre 50 pg/ml y no detectables. Los niveles superiores a 100 pg/ml, en general, se asocian con morbilidad (120).

Diversos estudios genéticos han demostrado que esta región genómica está involucrada de manera importante en la patogénesis de varias EA (121, 122). El locus del TNF- $\alpha$  está formado por 2.76 kb e incluye su promotor, cuatro exones, tres intrones y sus regiones no traducidas 5' y 3' (5'-UTR y 3'-UTR) La región 5'-UTR está formada por aproximadamente 180 pb y la 3'-UTR, por 793 pb. De esta manera, la unión de los UTR (tanto de 5' como de 3'), más los cuatro exones, origina un transcrito maduro de 1,772 nucleótidos. El TNF $\alpha$  contiene varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) distribuidos principalmente en la región promotora: -1031T/C, -863C/A, -857C/T, -376G/A, -308G/A, -244G/A y -238G/A . Diversas evidencias experimentales han mostrado que los SNP -857C/T, -376G/A, -308G/A y -238G/A de TNF- $\alpha$  tienen relevancia funcional, es decir, los

alelos de estos polimorfismos afectan a sus niveles de expresión génica (118, 123, 124).

El aumento de la expresión de TNF $\alpha$  con el consiguiente desarrollo de enfermedades crónicas inflamatorias y autoinmunes podría explicarse, además de otros factores, en base a la presencia de determinados polimorfismos en su gen. Se ha sugerido que tanto la variabilidad de las regiones promotoras, como la participación de factores de transcripción asociados, modularían la magnitud de la respuesta secretora de esta citoquina (125).

Respecto al LES, existen estudios contradictorios. Se ha encontrado una asociación en pacientes caucásicos con LES y el alelo TNF2, tanto en la presencia como en la actividad de la enfermedad (126). A diferencia, en otros trabajos, no se encontró asociación entre esta enfermedad y el polimorfismo -308 de TNF $\alpha$

El alelo A del SNP -308G/A mostró asociación con susceptibilidad a LESp en nuestra población; más aún, cuando se estratificó por género, este alelo mostró una fuerte asociación con susceptibilidad a LESp8. Por otro lado, el polimorfismo -238G/A del TNF- $\alpha$  también mostró asociación con LES en la población mexicana (127).

El TNF- $\alpha$ , además de estar involucrado en la síntesis de otras citocinas proinflamatorias, también induce la expresión génica de moléculas de adhesión celular y de anticuerpos contra ADN de doble cadena, antinucleares y anticardiolipinas (características del LES). Se ha comprobado que la síntesis local de TNF- $\alpha$ , a diferencia de la sistémica, ejerce un papel importante en la patogénesis del LES, especialmente en el riñón (128).

### **3.7 BIOMARCADORES ASOCIADOS A LUPUS.**

Las adipocinas son un grupo de Citocinas producidas en el tejido adiposo y juegan un papel crucial en procesos inflamatorios y metabólicos (129). Existen varias adipocinas, pero para nuestro estudio solo vamos a considerar la adiponectina y la leptina.

#### **3.7.1 Adiponectinas.**

La adiponectina es una hormona producida en el tejido adiposo, la cual tiene, entre otras acciones, la de ser insulino-sensibilizante, antiinflamatoria, anti aterogénica, hepato protectora y anti angiogénica. Tiene acción autocrina, paracrina y endocrina Estructuralmente, la Adiponectina está constituida por tres regiones, a saber: Región variable (Aa 20-40), región colágena (Aa 41-106) y dominio c- globular (Aa 107- 244). La región colágena es susceptible de modificación postraduccional, mientras que el dominio C-globular es estructuralmente homóloga a TNF- $\alpha$ . Adiponectina contrarresta los efectos pro inflamatorios del TNF- $\alpha$ , así mismo suprime la secreción y señalización del TNF- $\alpha$  en Macrófagos y Células Endoteliales. En un estudio realizado en Francia asocia los niveles de Adiponectina con la Artritis Reumatoide y con la progresión del daño articular. Este fue realizado en una cohorte de 791 pacientes. En dicho estudio se evidenció relación entre la Adiponectina con la progresión articular. De igual manera, estudio realizado en Seúl demostró la asociación entre Adiponectina e insulinoresistencia en pacientes con arterosclerosis y Artritis. En Corea se demostró que la Adiponectina induce la producción de Prostaglandina E2 en los fibroblastos sinoviales en pacientes con Artritis. En la universidad de Jordan Amman, se encontró significancia estadística entre los niveles de Adiponectina y los polimorfismos ADIPO G276T relacionados con Diabetes tipo II e Hipertensión arterial (130, 131).

### 3.7.2 Leptina.

La Leptina pertenece a la superfamilia de las citocinas de clase 1 y es producida en el Tejido Adiposo Blanco (TAB) de los adipocitos, además puede ser sintetizada en placenta, ovarios, corazón, músculo esquelético e hígado. Esta citocina se secreta en pulsos que son directamente proporcionales a la TSH, ácidos grasos libres y melatonina e inversamente proporcional a las hormonas ACTH y Cortisol. La proteína madura comprende 167 aminoácidos con una secuencia señal de 21 aa, peso molecular de 16 KDa y presenta una estructura terciaria similar a las citocinas clásicas de hélice larga, como la IL-2.

Una de las características esenciales para su funcionamiento es la presencia de puentes disulfuro. El gen que codifica la Leptina se denomina *ob* y fue descubierto por clonación posicional, que reveló un transcrito de mRNA de 4.5 kb altamente conservado. Dicho gen está localizado en el cromosoma 7 región 31.3 del brazo q y consta de 650 kb, presentando tres exones separados por dos intrones; la región codificadora de la proteína se localiza en el exón 2 y 3.

Se han identificado varios elementos reguladores para la Leptina como el AMP y elementos de respuesta a glucocorticoides, proteína unida a incrementadores CCAAT de tipo alfa (C/EBPa) y también sitios de unión a proteínas específicas de tipo 1 (SP1). El receptor para la Leptina es de cadena simple y presenta seis isoformas: Ob-Ra (plexos coroides), Ob-Rb (hipotálamo), Ob-Rc (plexos coroides), Ob-Rd, Ob-Re (forma soluble del receptor) y Ob-Rf. Cinco de estas poseen dominios transmembranales, pero solo Ob-Rb contiene el segmento intracelular necesario para la activación de las cinasas, llamado región Box 2, que permite la activación de JAK (Janus cinasa) y STAT (signal transducers and activators of transcription), al igual que la originada por IL-6 y todos los receptores de clase I.

Las JAK son una familia de tirosina cinasas intracelulares que presentan dos sitios activos inducidos principalmente por receptores de tipo citocina.

Leptina participa en un sinnúmero de procesos, entre los que cabe destacar la respuesta inflamatoria, en tanto que dicha hormona posee capacidad para estimular e iniciar la proliferación de células LTCD4+, así como de otras citocinas. En cuanto a la inmunidad, Leptina aumenta la activación de los Linfocitos T, los NK y los Macrófagos. También incrementa la proliferación de citocinas pro-inflamatorias, potencializando mayormente la respuesta Th1 y en menor medida la Th2 (132, 133).

### **3.7.3 El papel de las adipocinas en LES.**

#### **3.7.3.1 Leptina.**

Los resultados de los estudios que evalúan la concentración de Leptina en el plasma de los pacientes con LES son generalmente consistentes e indican que los niveles de Leptina sérica se encuentran elevados y pueden contribuir a la inflamación sistémica en los pacientes con LES. Se ha demostrado que la Leptina en suero se encuentra en niveles más elevados en las mujeres con LES que en los controles sanos. Chung y colaboradores hicieron hincapié en que la diferencia en los niveles de Leptina en suero entre los pacientes con LES y los controles fue independiente de la edad, raza, género y el IMC. Estos hallazgos sugieren que la producción de Leptina en el LES está influenciada por factores adicionales, que pueden estar causalmente vinculados a la iniciación y progresión de este trastorno. Un estudio llevado a cabo por Wislowska no encontró diferencias en los niveles de leptina entre pacientes con LES y sujetos sanos. Mientras que otro en otro estudio desarrollado por Harle et al, (134, 135) sí se encontró correlación

### **3.7.3.2 Adiponectina.**

En un informe de Sada et al (136), se encontró que los niveles séricos de adiponectina estuvieron significativamente elevados en el LES en comparación con los controles sanos, y se observaron niveles más bajos de adiponectina en pacientes con LES con lesión renal en comparación con los sujetos sin compromiso renal. El aumento de las concentraciones plasmáticas de adiponectina en pacientes con LES también fueron observados por Chung et al (129). Estos autores encontraron una correlación negativa entre adiponectina plasmática y el IMC, la presencia de síndrome metabólico, la presión arterial sistólica, y la dislipemia en pacientes que sufren de este trastorno. En otro estudio llevado a cabo por Rovin et al (137), los autores mostraron que los niveles de adiponectina en suero son más altos en los pacientes con LES y lesión renal que en los controles sanos y en pacientes con LES sin compromiso renal. Además, durante la reactivación del LES renal, la pérdida de adiponectina en orina se incrementó notablemente. Es de destacar el hecho de que la isoforma de adiponectina HMW recientemente se ha encontrado en la orina de pacientes con nefritis y lupus activo, pero no en la orina de los individuos sanos, y su contenido se correlaciona con la gravedad del lupus (136, 137).

### **3.8 AUTOANTICUERPOS EN EL LUPUS.**

Como se mencionó anteriormente, uno de los criterios utilizados en la práctica clínica para establecer y precisar el diagnóstico del paciente con LES es la presencia de autoanticuerpos entre los que se encuentra en primera medida la determinación de Anticuerpos Antinucleares (ANA), ya que estos juegan un papel importante en la muerte celular por la formación de complejos inmunes. Le siguen los anticuerpos anti-DNA de doble cadena (dsDNA) ya que su presencia en el paciente define el perfil inmunológico de este. Además de estos, se han caracterizado y ligado otros autoanticuerpos, por ejemplo, anticuerpos anti-dsDNA

los cuales se encuentran asociados a la presencia de anticuerpos anti-histonas así como al complejo DNA-histona (nucleosoma).

Similarmente, los anticuerpos anti-Sm y anti-RNP se encuentran juntos con frecuencia. Sm y RNP son complejos de ribonucleoproteínas que residen en el núcleo y participan en el procesamiento de ARN. Por otra parte, se ha aceptado ampliamente que ciertos autoanticuerpos, principalmente anti-dsDNA contribuyen a la lesión glomerular. Por tanto, los pacientes con NL tienen mayor probabilidad que aquellos con LES sin compromiso renal de tener títulos elevados de anti-dsDNA. También hay evidencia de que los anti-nucleosomas desempeñan un papel importante en la NL humana y experimental como son anti-Sm, anti-RNP, anti-SS-A/Ro, anti-SS-B/La, anti-P-Ribosomal (138, 139). La presencia de autoanticuerpos anti-Sm está asociada con expresiones más severas del LES, incluyendo la NL. Los anti-dsDNA producen daño renal a través de una lesión directa sobre antígenos in situ (DNA, histonas, núcleos), componentes de la membrana basal glomerular (laminina, colágeno IV y heparán sulfato) o bien a través de la formación previa de complejos inmunes con nucleosomas que se depositan posteriormente sobre la membrana basal glomerular (140).

También existen estudios que evidencian que los anticuerpos anti-Ro participan en la patogénesis de la NL, al igual que los anticuerpos anti-P ribosomales. Recientes investigaciones han mostrado que la nefritis es más prevalente en pacientes lúpicos adultos que tienen anti-P ribosomal positivo que en pacientes lúpicos anti-P ribosomal negativo y que el nivel de anticuerpos se correlaciona con la actividad de la nefritis. Por último, los anticuerpos anti-P ribosomales se encuentran con mayor frecuencia en pacientes pediátricos que en pacientes adultos (141).

Los anticuerpos anti-alfa-actinina también se han asociado con anticuerpos anti-dsDNA en LES. En pacientes adultos, se han encontrado más significativamente asociados con la glomerulonefritis y con la actividad de la enfermedad los anticuerpos anti-alfa-actinina que los anti-dsDNA. Se cree que esta reactividad de los anticuerpos anti-alfa-actinina se relaciona con alta avidéz de los anticuerpos anti-dsDNA. En conjunto, estos estudios indican que la detección de anti-alfa-actinina, en asociación con anti-dsDNA, puede constituir un nuevo marcador en la nefritis lúpica del adulto (142).

Otro tipo de autoanticuerpo relacionado con la NL es el anti-lipoproteína lipasa (anti-LPL) del cual se ha reportado estar presente en el 40% de pacientes con LES y además estar relacionado con altos niveles de triglicéridos séricos, por lo que también ha llamado la atención debido a su posible papel en la aceleración de la aterosclerosis en LES. En pacientes adultos que presentan anti-LPL y anti-P ribosomal, se ha encontrado una asociación mucho más fuerte con la nefritis (143). La frecuencia de patrones de los autoanticuerpos se ha informado como un evento de gran diversidad en LES adulto y pediátrico de se relaciona de acuerdo al grupo étnico que se esté estudiando. Algunos estudios que han examinado esta relación han informado una alta prevalencia de anti-SM y anti-RNP en pacientes afroamericanos. Adicionalmente, los anticuerpos anti-Ro se han asociado con lupus cutáneo, no obstante como se ha planteado, la prevalencia y valor pronóstico de estos anticuerpos así como de ANA y anti-dsDNA difieren de acuerdo al origen étnico de la población (144).

## **4. OBJETIVOS DE LOS PROYECTOS DE LA TESIS**

### **4.1 PROYECTO I.**

**Asociación de los sistemas PTPN22, VDR, MHC y los niveles séricos de vitamina D en adultos del Caribe Colombiano con lupus eritematoso sistémico sin daño renal.**

#### **4.1.1 Objetivo General.**

Identificar variantes genéticas de los sistemas VDR, MHC, PTPN22 y determinar los niveles séricos de Vit D, la concentración de Leptina y adiponectina en adultos del caribe colombiano con lupus eritematoso sistémico sin daño renal.

#### **4.1.2 Objetivos Específicos.**

- Determinar la frecuencia alélica y haplotípicas de los sistemas VDR, MHC, PTPN22 en pacientes sufriendo de LES.
- Asociar las frecuencias alélicas y haplotípicas de los sistemas VDR, MHC, PTPN22 con la susceptibilidad para desarrollar LES.
- Establecer las concentraciones séricas de Vit D en pacientes sufriendo de LES
- Asociar los polimorfismos y variantes genéticas de los sistemas genéticos VDR, MHC, PTPN22 con los niveles de Vit D para identificarlos como factores de riesgo al desarrollo de LES.

## **4.2 PROYECTO II.**

**Asociación de Polimorfismos de los Sistemas genéticos *VDR*, *MHC*, *TNF-alfa*, *PTPN22* y del biomarcador molecular Vitamina D con el endotipo NEFRITIS LÚPICA CLASE IV en Pacientes adultos colombianos.**

### **4.2.1 Objetivo general.**

Identificar marcadores genéticos de los sistemas *VDR*, *MHC*, *TNF-alfa*, *PTPN22* y su asociación con los niveles séricos de Vitamina D en pacientes Colombianos sufriendo de Nefritis Lúpica Clase IV y asociarlos con la susceptibilidad al desarrollo del endotipo.

### **4.2.2 Objetivos Específicos.**

- Determinar las frecuencias alélicas y haplotípicas de los sistemas *PTPN22*, *TNF alfa*, *VDR* y *MHC*, en pacientes sufriendo de nefritis Lúpica clase IV.
- Asociar las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los sistemas *PTPN22*, *TNF alfa*, *VDR* y *MHC*, con la susceptibilidad para desarrollar nefritis lúpica clase IV.
- Describir las concentraciones séricas de Vitamina D en pacientes sufriendo de nefritis Lúpica clase IV.
- Estimar la asociación de las variantes genéticas de los sistemas *VDR*, *MHC*, *TNF alfa*, *PTPN22* con los niveles séricos de Vitamina D, identificándolos como factores de riesgo al desarrollo de nefritis Lúpica clase IV.

### **4.3 PROYECTO III.**

**Estudio de asociación de variantes genéticas VDR, TNF-alfa PTPN22, MHC-DRB/DQB y biomarcadores séricos vitamina D y adipocinas con la actividad clínica de la nefritis lúpica en escolares colombianos.**

#### **4.3.1 Objetivo General.**

Identificar variantes genéticas de los sistemas VDR, MHC, PTPN22 y TNF-alfa y determinar los niveles séricos de Vit D, la concentración de Leptina y adiponectina en niños Colombianos sufriendo de nefritis Lúpica y asociarlas con la presencia de autoanticuerpos nefrofílicos

#### **4.3.2 Objetivos Específicos.**

- Determinar la frecuencia alélica y haplotípicas de los alelos de los sistemas VDR, HLA-DRB1\*/DQB1\*, PTPN22 y los SNPs del TNF(-308/-238), en escolares sanos y en niños con nefritis lúpica.
- Describir y estimar la asociación de concentraciones séricas de Vitamina D, Leptina, adiponectina y la presencia de autoanticuerpos nefrofílicos en escolares sanos y en niños con nefritis Lúpica.
- Asociar el polimorfismo de los sistemas VDR, HLA-DRB1\*/DQB1\*, PTPN22 y los SNPs del TNF alfa con la presencia de Autoanticuerpos nefrofílicos en pacientes mestizos escolares con nefritis lúpica.



## **5. METODOLOGÍA DEL PROYECTO DE LA TESIS**

### **5.1 METODOLOGIA DESARROLLADA**

Tipo de estudio: Estudio observacional, analítico y de corte transversal, de casos y controles.

Para el cálculo de la muestra en el componente de casos y controles se usó el OR de la población Latinoamericana (95% CI: 1.28–3.56) de estudios previos. (161). Todos los sujetos que se vincularon al estudio fueron diagnosticados por médicos especialistas en Reumatología y reunieron los criterios para LES del Colegio Americano de Reumatología (ACR) de 1982 modificada en 1997. El cálculo de la muestra asume una probabilidad de error tipo 1 del 10% con un poder del 90%. El mínimo riesgo relativo indirecto, previsto para los marcadores genéticos será de 4 para garantizar diferencias significativas en el análisis de la data.

Por otra parte, los individuos participantes lo hicieron de forma voluntaria firmando para ello el consentimiento informado. Este proyecto fue aprobado por el comité de bioética de la División ciencias de la salud de la Universidad del Norte en Barranquilla Colombia.

### **5.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.**

Ser ciudadano colombiano.

Tener un diagnóstico de LES de acuerdo a los criterios de ACR. Es decir, que el paciente haya manifestado por lo menos cuatro de los criterios aunque estos no sean simultáneos, pero que uno de estos sea la presencia de autoanticuerpos; y un SLEDAI igual o mayor a 2.

pacientes con diagnóstico de LES que hayan nacido en una ciudad del

Caribe Colombiano, no relacionados familiarmente, cuyos padres y sus tres última generaciones hallan vivido en Colombia, sin ascendencia u origen diferente a la población triétnica colombiana.

Colombianos en edades comprendidas entre 5 - 49 años

### **5.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

Pacientes quienes no hayan firmado el consentimiento informado

Pacientes que sufran de otras enfermedades autoinmunes o de origen inmunológico

Pacientes de Origen o ascendencia diferente a la población triétnica del caribe colombiano

Pacientes sufriendo de Raquitismo.

### **5.4 VARIABLES DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS, PARACLÍNICAS Y DE HISTORIA FAMILIAR.**

Las siguientes variables fueron evaluadas en el registro utilizado:

*Variables demográficas y clínicas.* Nombre completo, documento de identidad número de historia clínica, centro asistencial de referencia sexo, edad en el momento de ingreso a el estudio, dirección y teléfono de residencia, corregimiento municipio o ciudad de nacimiento, corregimiento, municipio o ciudad en el momento de ingreso a el estudio, peso y talla al ingresar al estudio y fecha del mismo diagnóstico clínico, duración y evolución de la enfermedad, clasificación de la severidad de el LES. Diagnóstico clínico, Presencia o ausencia de enfermedades autoinmunes.

*Variables paraclínicas:* El suero obtenido de cada paciente y de cada control se guardó a -70 grados C en el laboratorio de inmunología y biología molecular de la universidad del Norte hasta la realización de los análisis que se llevaran a cabo. Los equipos para el desarrollo de estas pruebas fueron calibrados con un registro calificado y acreditado. El control de calidad y la reproducción de los resultados se confirmó de manera aleatoria para cada una de las pruebas serológicas en un laboratorio de referencia, certificado con ISO 9000. Todas las pruebas de laboratorio fueron realizadas por duplicado. El almacenamiento de la información y la base de datos tuvieron copias de seguridad, de las cuales, el investigador principal fue el responsable toda la información. Ellas se almacenaron en un solo computador y su acceso a la misma estuvo restringido por personal autorizado, a través del uso de un código de seguridad. La data fue almacenada en el Main Frame de la Universidad del Norte.

## **5.5 MUESTRA.**

Se involucraron 47 sujetos residentes en el Caribe Colombiano no relacionados familiarmente, cuyos padres y sus familiares hasta la tercera generación hubieran estado radicados en el litoral caribe colombiano, su distribución por proyecto fueron así:

Proyecto 1: Lupus eritematoso Sistémico; 133 contra 100 controles adultos sanos (subgrupo de controles sanos tomados al azar del proyecto 2)

Proyecto 2: nefritis lúpica clase IV (adultos): 49 casos contra 146 controles adultos sanos.

Proyecto 3: nefritis Lúpica en escolares: 92 contra 100 controles pediátricos sanos.

Todos los pacientes involucrados en este proyecto debieron tener un diagnóstico clínico de LES. Estos sujetos que participaron en el estudio provinieron de la consulta externa de los hospitales universitarios y fueron reclutados en un periodo

entre febrero del 2012 y junio del 2013. Los pacientes involucrados en los proyectos I y II tuvieron un diagnóstico anatomopatológico, realizado por el mismo patólogo en el mismo servicio de patología

La muestra biológica fue obtenida por punción venosa periférica con tubos al vacío B-D con EDTA para la obtención del ADN y tubos al vacío sin aditivo para la obtención del suero. Un total de 10 cc de sangre venosa periférica fue obtenido de cada individuo. Todos los individuos ayunaron al menos 12hs antes de la toma de la muestra y la venopunción se llevó a cabo antes de las 7 am. Ninguno de los sujetos había estado tomando Vit D a los menos tres meses antes de su ingreso al proyecto. Cada uno de los tubos se rotulo con una etiqueta para su respectiva identificación que incluye:

Nombre completo del paciente, número del documento de identidad y fecha de toma de la muestra. Un código asignado y seguido de una numeración, que utilizo números arábigos, de 4 cifras, iniciándose con el cero, (0) servirá para la el tráfico de la muestra al interior del laboratorio y permitió la confidencialidad y salvaguardo la privacidad del sujeto de estudio. Las muestras de sangre periférica se procesaron para obtener el suero y el buffy coat de cada sujeto. Tanto el suero como el buffy coat se almacenaron a -70oC, salvaguardadas de la luz solar y cubiertas con papel oscuro, hasta su respectivo procesamiento

## **5.6 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE VIT D Y ADIPONECTINAS EN SUERO**

Los niveles de VitD se medieron por enzimoimmunoanálisis utilizando un estuche comercial 25-hydroxy vitamina D EIA de *immuno Diagnostic System*. Este es un inmunoensayo enzimático biotilado, que detecta a 1,25 OH VitD3.

Las concentraciones fueron clasificadas según el punto de corte establecidos por el *Institute of Medicine* (IOM); donde <10 ng/mL de 25(OH) D corresponde a niveles deficientes; 10 a < 30 ng/mL como vitamina D insuficiente; ≥30 a <100 ng/mL como vitamina D suficiente y ≥100 ng/mL como posible intoxicación de vitamina D.

**5.6.1. Determinación cuantitativa de la 25-hidroxivitamina D en plasma o suero por el método EIA 25-Hydroxy Vitamin D (Inmunodiagnosicsystems) REF AC-57F1/AC-57F**

- ✓ Sembrar 5 µL de la muestra, en su respectivo pozo.
- ✓ Adicionar 200 µL de la solución 25-D BIOTIN a cada pozo con muestra.
- ✓ Sellar la micro-placa e incubarla por 2 horas a 18-25 °C.
- ✓ Lavar los pozos tres veces con 300 µL de la solución de lavado.
- ✓ Adicionar 200 µL del ENZIMO-CONJUGADO.( Suero tamponado con fosfato que contiene avidina marcada con peroxidasa de rábano, proteína, estabilizadores de enzima y conservante).
- ✓ Sellar la micro-placa e incubar por 30 minutos a 18-25 °C.
- ✓ lavar los pozos tres veces con 300 µL de la solución de lavado.
- ✓ Adicionar 200 µL del SUBSTRATO TMD (Tetrametil-Bencidina y peróxido de hidrógeno) a cada pozo con muestra.
- ✓ Sellar la micro-placa e incubar por 30 minutos a 18-25 °C.
- ✓ Adicionar 100 µL de solución AC-STOP (Ácido clorhídrico 0,5 M).
- ✓ Leer a 450 nm

## 5.6.2 Las adiponectinas

se cuantificaron por ELISA estuche millipore . Los valores de referencia para la Adiponectina son: 1.56 a 100 ng/ml para todos los sexos. (ELISA Kit Millipore). Human Adiponectin RIA. Specifications, 2007 (109, 145). Los valores referenciados para la Leptina son; hombres, entre 2.0 a 5.6 ng/ml y mujeres, entre 3.7 a 11.1 ng/ml .

### 5.6.2.1 Determinación de los niveles de Leptina humana por el método ELISA Kit Millipore Merck REF EZHL-80SK:

- ✓ Diluir el buffer de lavado.
- ✓ Agregar 300 µL de buffer de lavado.
- ✓ Incubar 5 minutos.
- ✓ Aspirar o decantar.
- ✓ Adicionar 75 µL de Assay buffer (0.05M PBS pH 7.4, EDTA 0.025M, Azida sódica 0,08%, BSA 1% y Triton X-100 0.05%) a cada pozo.
- ✓ Adicionar:
  - 25 µL de assay buffer al pozo blanco
  - 25 µL de cada uno de los ocho calibradores en su pozo respectivo.
  - 25 µL de cada uno de los dos controles de calidad en su pozo respectivo.
- ✓ Agregar 25 µL de cada muestra de paciente en su pozo respectivo.
- ✓ Incubar 2 horas en agitación a temperatura ambiente.
- ✓ Aspirar o decantar.
- ✓ Lavar 3 veces con 300 µL de HRP Wash Buffer 1X.
- ✓ Adicionar 100 µL de Detection Antibody (Anticuerpos anti Leptina de ratón Biotinados) a cada pozo.
- ✓ Incubar 30 minutos en agitación a temperatura ambiente
- ✓ Aspirar o decantar.
- ✓ Adicionar 100 µL de Enzyme Solution a cada pozo.

- ✓ Incubar 30 minutos en agitación a temperatura ambiente.
- ✓ Lavar 5 veces con 300  $\mu$ L.
- ✓ 100  $\mu$ L de Substrate Solution a cada pozo.
- ✓ Incubar 5-20 minutos en agitación a temperatura ambiente.
- ✓ Adicionar 100  $\mu$ L de Stop Solution a cada pozo.
- ✓ Mesclar manualmente.
- ✓ Leer absorbancia a 450 nm (590 nm).

**5.6.2.2. Determinación de los niveles de Adiponectina humana por el método ELISA Kit Millipore Merck REF EZHADP-61K:**

- ✓ Lavar 3 veces el número requerido de pozos con 300  $\mu$ L de buffer de lavado (10X 50 mM Tris Buffer Salino y Tween-20: Preparar a 1x).
- ✓ Aspirar o decantar.
- ✓ Adicionar 60  $\mu$ L de Assay Buffer A (100 mM buffer fosfato a pH 7.5, Azida sódica 0.08% , BSA 1%) en cada pozo.
- ✓ Adicionar:
  - 20  $\mu$ L de Assay Buffer A al pozo blanco.
  - 20  $\mu$ L de cada standard previamente preparados con las siguientes concentraciones: 100ng/ml, 50ng/ml, 25ng/ml, 12.5ng/ml, 6.25ng/ml, 3.125ng/ml y 1.56ng/ml (en orden de concentración descendente).
  - 20  $\mu$ L de cada uno de los dos controles de calidad (1 y 2) en su pozo respectivo.
  - 20  $\mu$ L de cada muestra de paciente en su pozo respectivo.
  - 20  $\mu$ L de Detection Antibody (Anticuerpos anti Adiponectina humana biotinados) a cada pozo (estándar, muestras y controles).
- ✓ Incubar 2 horas en agitación (400-500 rpm) a temperatura ambiente.
- ✓ Aspirar o decantar.
- ✓ Lavar 3 veces con 300  $\mu$ L.

- ✓ Aspirar o decantar.
- ✓ Adicionar 100  $\mu$ L de Enzyme Solution (Conjugado de estreptavidina peroxidasa boffer) a cada pozo.
- ✓ Incubar 30 minutos en agitación a temperatura ambiente.
- ✓ Aspirar o decantar.
- ✓ Lavar 5 veces con 300  $\mu$ L HRP Wash Buffer 1x.
- ✓ Aspirar o decantar.
- ✓ Adicionar 100  $\mu$ L de Substrate Solution (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidina en buffer) a cada pozo.
- ✓ Incubar 5-20 minutos en agitación a temperatura ambiente.
- ✓ Adicionar 100  $\mu$ L de Stop Solution (HCL 0.3 M) a cada pozo.
- ✓ Mezclar manualmente.
- ✓ Leer absorbancia a 450 nm (590 nm) durante los próximos 5 minutos.

### **5.7. IDENTIFICACIÓN DE AUTOANTICUERPOS.**

A partir de las muestras de suero se detectó la presencia y concentración de autoanticuerpos Anti-dsDNA, Anti-SM, Anti-SM, Anti-P ribosomal y Anti-RNP mediante microelisa.

### **5.8 OBTENCIÓN DE ADN.**

El ADN se obtuvo por la técnica de salting out modificada y se conservó en TE a (-) 20C hasta su análisis. A todas y cada una de las muestras se les evaluó su pureza y se determinó su concentración por espectrofotometría. Previo a la amplificación, se evaluó la integridad de los ADN a través de una electroforesis en gel de agarosa (146). El ADN se extrajo mediante TECNICA SALTING-OUT, la cual consta de las siguientes etapas, a saber:

**Preparación de las células a partir de sangre periférica.**

- ✓ Centrifugar la muestra de sangre total para obtener el Buffy coat, el cual se trata con solución de lisis de glóbulos rojos hasta eliminar dichas células y que solamente quede el pellet de glóbulos blancos.

#### **Aislamiento del ADN y purificación.**

- ✓ Suspender el pellet leucocitario en 3 ml de lisis de glóbulos blancos.
- ✓ Agregar 50  $\mu$ L de solución de proteinasa K y se mezcla suavemente,
- ✓ Añadir 50  $\mu$ L de SDS al 10% .
- ✓ Incubar a 37°C en baño de maría con agitación a 50 rpm.

#### **Precipitación:**

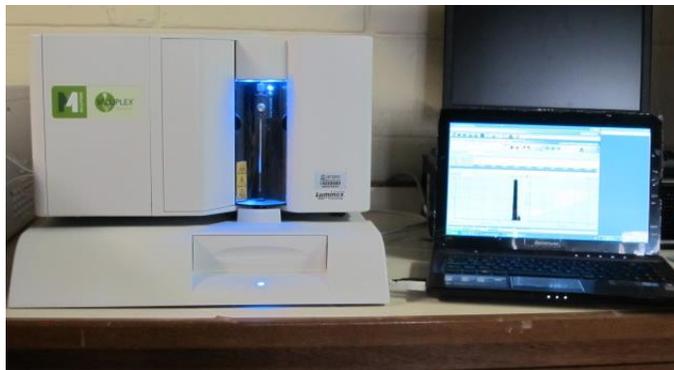
- ✓ Agregar 3 ml de cloruro de sodio 5M.
- ✓ Agitar vigorosamente por 15 segundos y hacer un vortex por 5 segundos.
- ✓ Centrifugar a 3000 rpm x 25 minutos.
- ✓ Transferir el sobrenadante a otro tubo Falcon de 15 ml y se agrega igual volumen de Etanol al 95% frío.
- ✓ Mezclar suavemente hasta observar el precipitado del ADN.
- ✓ Re-suspensión del precipitado de ADN y lectura en 0.5 ml de TE 1x e incubar a 37 °C toda la noche. La Medición de la concentración y pureza se empleó el equipo Nano Drop 2000 de Thermo Scientific.

### **5.9 GENOTIPIFICACIÓN HLA.**

La tipificación molecular mediante la tecnología xMAP en plataforma LUMINEX se aplica el uso de micro esferas marcadas. Los patrones de las sondas se interpretan a través del software QUICKTYPE.

La genotipificación para HLA-B,C, DRB1 y DQB1 se realizó mediante mediante técnica de Luminex. Se dispuso de kits LIFECODES HLA-SSO (Gen-Probe para uso con Luminex®) cuyo principio se basa en la hibridación de productos de PCR (cadena sencilla de ADN) a sondas de Oligonucleótidos de Secuencia Específica (SSO). La amplificación de ADN mediante una PCR tradicional emplea cantidades

equimolares de dos tipos de *primers* (*forward* y *reverse*) para generar un producto de ADN de doble cadena. Sin embargo, si la cantidad de un *primer* está en exceso con relación al otro, la reacción va a generar productos de ADN de cadena sencilla además de ADN de doble cadena. Durante el ciclo inicial del paso de amplificación LIFECODES, se genera ADN de doble cadena; una vez el *primer* en cantidad limitada se agota, el *primer* restante utiliza el producto de doble cadena como molde para la generación de ADN de cadena sencilla. Por tanto, este método genera tanto ADN de doble hebra como de cadena sencilla, los que pueden participar en la reacción de hibridación, las sondas están diseñadas de modo que cada una se hibride preferencialmente a una región complementaria que puede o no estar presentes en el ADN amplificado.



Equipo LUMINEX®

Cada una de las diferentes sondas puede ser homóloga a una secuencia en el ADN amplificado que es único para un alelo o grupo de estos. En otras palabras, estas sondas están diseñadas de modo que cada una se hibride preferencialmente a una región complementaria que puede o no estar presentes en el ADN amplificado. Además, el ADN amplificado se hibrida también a una o más sondas homólogas a las secuencias consenso presentes en todos los alelos de un locus. El análisis de los resultados de la tipificación de SSO se puede utilizar

para determinar la presencia o ausencia de secuencias particulares de ADN en el ADN amplificado y para identificar los alelos posibles en la muestra.

En los kit utilizados, LIFECODES, las sondas están unidas a microesferas Luminex diseñadas para ser utilizadas en el equipo Luminex. Una sonda SSO diferente se puede unir a cada distinta microesfera, por lo que en una mezcla de varias sondas, estas se pueden distinguir en virtud de su asociación con microesferas de fluorescencia particular. El equipo Luminex tiene la capacidad de cuantificar las cantidades relativas de producto de PCR marcado que se hibridan a cada microesfera Luminex. Por lo tanto, la señal relativa obtenida con las sondas SSO en el ensayo LIFECODES, como con otros métodos SSOP, se puede utilizar para asignar las sondas con reactividad positiva o negativa con la muestra de ADN amplificado. Esto a su vez proporciona la información necesaria para determinar el fenotipo de HLA de la muestra.

Procedimiento:

- ✓ Preparar 20  $\mu\text{L}$  de las muestras de ADN a 20  $\text{ng}/\mu\text{L}$  utilizando como diluyente  $\text{H}_2\text{O}$  MQ.
- ✓ Dar vórtex a la *Master Mix* (MX) de cada kit por lo menos por 10 segundos.
- ✓ Preparar en un eppendorf la mezcla de PCR:
  - Agregar 10  $\mu\text{L}$  de ADN diluido en agua, en los tubos respectivos.
  - Agregar 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  MQ en los tubos Control Negativo.
  - Agregar 40  $\mu\text{L}$  de la respectiva mezcla anterior.
  - Tapar y mezclar con suaves golpes.
- ✓ **Amplificación:** Programar el termociclador MJ *Research*® así:
  - 1 ciclo a 95°C durante 5 minutos.
  - 8 ciclos: 95°C 30 segundos, 60°C 45 segundos, 72°C 45 segundos.
  - 32 ciclos: 95°C 30 segundos, 63°C 45 segundos, 72°C 45 segundos.
  - 1 ciclo a 72°C durante 15 minutos.
- ✓ **Hibridación:** Resuspender el buffer y las perlas.

- ✓ Recalentar las perlas de cada kit (el frasco completo) a 56-60°C en un horno (calor seco) durante 5-10 minutos.
- ✓ Agregar 5 µL del amplificado a pozos específicos para el equipo Luminex, que previamente se hayan marcado (obscuridad).
- ✓ Sacar las perlas del horno, realizar vórtex al menos 15 segundos. Agregar 15 µL de perlas en cada pozo. Hacer lo mismo para la otra tipificación.
- ✓ Programar el termociclador de la siguiente manera:
  - 1 ciclo a 97°C durante 5 minutos.
  - 1 ciclo a 47°C durante 30 minutos.
  - 1 ciclo a 56°C durante 10 minutos.
  - 1 ciclo a 56°C continuos.
- ✓ Utilizar el SA-PE (R-phycoerythrin conjugated Streptavidin), previo vórtex y preparar la siguiente mezcla para n+1 reacción, de la siguiente manera en un Falcon:
- ✓ Mezclar y dejar en oscuridad.
- ✓ Agregar en cada pozo 170 µL de la mezcla anterior, al terminar la hibridación.
- ✓ Colocar los pozos en la placa del equipo, llevarlos al Luminex y hacer la lectura.

El análisis de los resultados de la tipificación de SSO se utiliza para determinar la presencia o ausencia de secuencias particulares en el ADN amplificado y para identificar los alelos posibles en la muestra.

#### **5.10. GENOTIPIFICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS VDR, PTPN22, TNF .**

Los polimorfismos de los sistemas *PTPN22*, *TNF* y *VDR* se genotipificaron mediante PCR en tiempo real (RT-PCR) utilizando los estuches disponibles comercialmente (TaqMan® SNP Genotyping respectivamente) de la casa Applied Biosystems, Foster City, CA, USA. Los ensayos de genotificación se realizaron en

un equipo de RT-PCR ABI Prism 7300, de Applied Biosystems. La asignación genotípica se realizó automáticamente mediante la aplicación *Allelic Discrimination* (Applied Biosystems), la cual tuvo en cuenta una calidad de amplificación  $\geq 90\%$  por muestra.

La técnica se basa en sondas de hibridación método que usa dos sondas de oligonucleótidos marcados con dos colorantes diferentes (fluoresceína y lighthCycler- Red 640) que hibridan sobre la secuencia interna de ADN blanco. Los colorantes solo interactúan cuando se han unido a la secuencia de ADN.

En la fase de anillamiento en el ciclo de PCR los oligonucleótidos hibridizan en la región adyacente del ADN blanco, Los fluoróforos que están perfectamente acoplados a los oligonucleótidos hibridan muy cercanos, La sonda donadora F1 marcada en su extremo 3' con fluoróforo que es excitado por una luz externa entonces pasa esa excitación como energía a la sonda F2 o aceptora marcada en el extremo 5' emitiendo luz que se puede medir a 640 nm cual es captada por el equipo para crear la curva de amplificación, esta sonda debe ser bloqueada en su extremo 3' con un grupo fosfato para evitar su extensión durante la reacción. Las diferencias de la temperatura de los picos de meeting nos permiten evaluar los picos de los genotipos homocigoto silvestre, heterocigoto y homocigoto mutado.

### **5.10.1 PROCEDIMIENTO PARA REALIZACION DE RT-PCR: VDR**

- ✓ Ajuste de la concentración de ADN:
- ✓ Una vez extraído y cuantificado el ADN, su concentración se ajusta entre 200 y 300 ng/ $\mu$ L con solución TE 1x.
- ✓ Dispensar en los pozos : 6  $\mu$ L de muestra de ADN.
- ✓ Agregar 14  $\mu$ L de la master mix a cada pozo

master mix: Buffer taqman master mix 10 ul

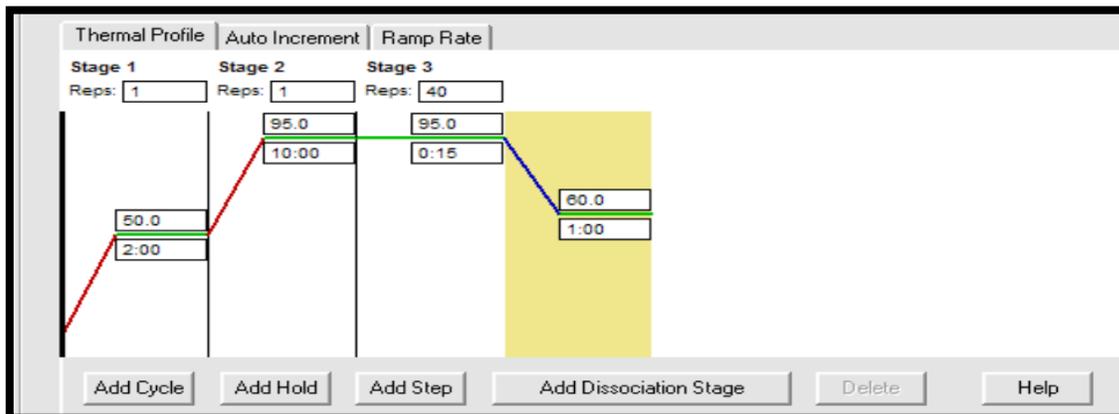
- Enzima 0.25  $\mu$ L
- Agua 3.75  $\mu$ L.
- ✓ mezclar y compactar el volumen de reacción.

- ✓ Llevar al termociclador en tiempo real 7500 Real Time PCR System, Applied Biosystem.

Los Primers empleados para cada SNPs evaluado fueron:

- BsmI (rs1544410): f 5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3'  
r 5'-AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG-3'  
PRODUCTO PCR (pb): 825 pb
- Apal (rs7975232) : f 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3'  
r 5'-GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC-3'  
PRODUCTO PCR (pb): 740 pb
- TaqI (rs731236): f 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3'  
r 5'-GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC-3'  
PRODUCTO PCR (pb): 740 pb
- FokI (rs2228570): f 5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT-3'  
r 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3'  
PRODUCTO PCR (pb): 265 pb

Temperaturas de la reacción:



### 6.10.2. PROCEDIMIENTO PARA REALIZACION DE RT-PCR: PTPN22

Genotipificación del alelo C1858T (rs2476601) (PTPN22) Protein tyrosine phosphatasa N22 Tipificación molecular del SNP rs2476601: se determinó

mediante tecnología de PCR en Tiempo real. (7500 System SDS. Applied Biosystems). para lo cual se utilizarán los siguientes primers:

5'-CCAGCTTCCTCAACCACAATAAATG-3' (sense) y  
5'-CAACTGCTCCAAGGATAGATGATGA-3' (antisense).

Igualmente se usarán sondas Taqman menores :

5'-caggtgtccatacagg-3' y 5'-caggtgtccgtacagg-3' marcadas con las sustancias fluorescentes VIC y FAM respectivamente.

Assay ID	Gene Symbol	Gene Name	Entrez Gene ID	Transcript Accession	Species	Cytogenetic Band	NCBI Assembly Build Number	Chromosome	Location on NCBI Genome Assembly
C_16021387_20	PTPN22	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)	26191	NA	Homo sapiens	1p13.2b	37	1	114377568

Assay ID	Reporter 1 Dye	Reporter 1 Quencher	Reporter 2 Dye	Reporter 2 Quencher	Context Sequence
C_16021387_20	VIC	NFQ	FAM	NFQ	ACCACAATAAATGATTTCAGGTGTCC[A/G]TACAGGAAGTGGAGGGGGGATTCA

- ✓ Trabajar en cámara de flujo laminar todo el montaje.
- ✓ Preparar 10 µL de las muestras de ADN a 4.5 ng/µL utilizando como diluyente H<sub>2</sub>O MQ. Cada ADN stock llevarlo a 900 ng en 200 uL, para que quede a 4.5 ng/µL
- ✓ Tomar una placa de 96 posos
- ✓ Dar vórtex a la *Master Mix* (MX) por lo menos por 10 segundos.
- ✓ Montar la reacción de PCR (En oscuridad):
  - Agregar 6,0 µL de ADN diluido en agua, en los posos respectivos.
  - Agregar 6,0 µL de H<sub>2</sub>O MQ en el poso Control Negativo.
- ✓ Preparar en un eppendorf la siguiente mezcla (por muestra):
  - H<sub>2</sub>O MQ            6,0 µL
  - Master mix        12,5 µL
  - SNP                0,5 µL (Queda a una concentración de 1.6 X)

**Nota: el SNP viene de la casa comercial a una concentración de 80X**

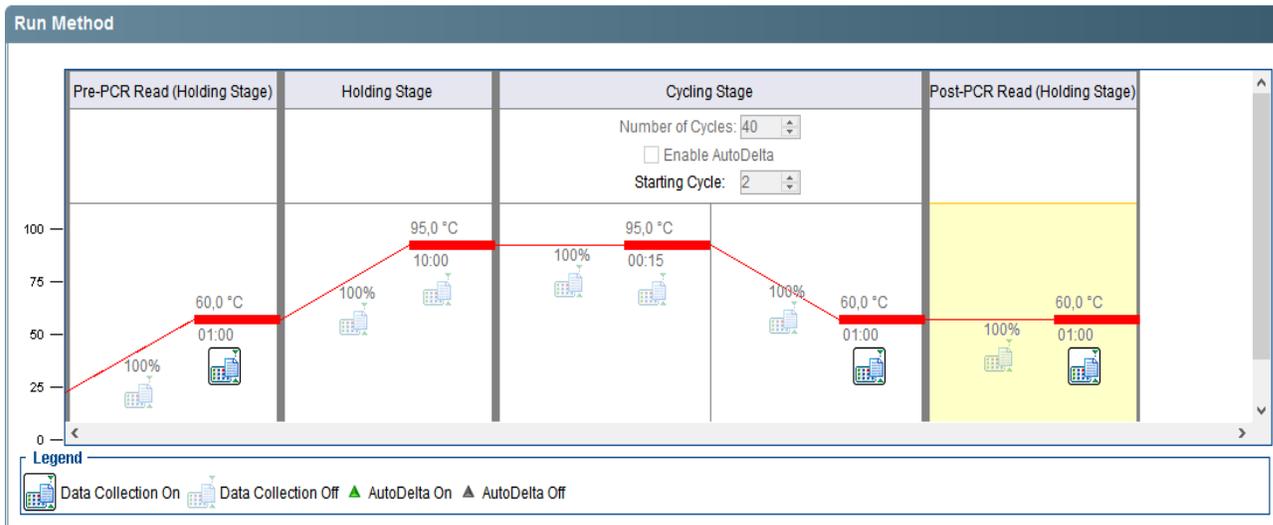
- ✓ Agregar 19,0 uL de la respectiva mezcla anterior.
- ✓ Mezclar mediante una ligera centrifugación.
- ✓ **Amplificación:** Programar el termociclador (7500 System SDS. Applied Biosystems). así:

	Lectura previa a la PCR	Amplificación			Lectura posterior a la PCR
Fase/Paso	Fase de espera	Fase de espera	Ciclo (50 ciclos)		Fase de espera
			Desnaturalización	Hibridación/ extensión	
Temperatura	60 °C	95 °C	92 °C	60 °C	60 °C
Tiempo (hh:mm:ss)	00:00:30	00:10:00	00:00:15	00:01:00	00:00:30
Recogida de datos	Sí	No	No	Sí	Sí

- Colocar la placa en el equipo e interpretar.

### 5.10.3. PROCEDIMIENTO PARA REALIZACION DE RT-PCR: TNF $\alpha$

- ✓ Cuantificar y ajustar el ADN final con una concentración total de 54 ng/ $\mu$ L.
- ✓ preparar master mix por reacción:
  - **Buffer taqman mastermix**--10  $\mu$ L
  - **Enzima**----- 0.25  $\mu$ L
  - **Agua**----- 3.75  $\mu$ L
  - **ADN**----- 6  $\mu$ L (se agrega en el pozo directamente)
  - Total volumen**-----20  $\mu$ L de reacción
- ✓ Sembrar mezcla anterior y sellar
- ✓ centrifugar y llevar al termociclador en tiempo real (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystem).



Ciclos de temperatura

Distribuido por Applied Biosystems- Catalogo # 4351379

DATOS DEL SNP: **TNF $\alpha$ -238 o rs361525**

<b>SNP ID:</b> rs361525		
<b>Gene :</b> ▶LOC100287329_▶LTA_▶LTB_▼TNF		
<b>Gene Name:</b> tumor necrosis factor		
<b>Chromosome Location:</b> Chr.6: 31543101 - 31543101 on NCBI Build 37		
<b>Polymorphism:</b> A/G, Transition Substitution		
<b>Context</b>	<b>Sequence</b>	<b>[VIC/FAM]:</b>
	GGCCCAGAAGACCCCCCTCGGAATC[ <b>A/G</b> ]	GAGCAGGGAGGATGGGGAGTGTGAG

DATOS DEL SNP : **TNF $\alpha$ -308 o rs1800629**

<b>SNP ID:</b> rs1800629		
<b>Gene :</b> ▶LOC100287329_▶LTA_▶LTB_▼TNF		
<b>Gene Name:</b> tumor necrosis factor		
<b>Chromosome Location:</b> Chr.6:31543031 on NCBI Build 37		
<b>Polymorphism:</b> A/G, Transition Substitution		
<b>Context Sequence [VIC/FAM]:</b>		
GAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATG[ <b>A/G</b> ]GGACGGGGTTCAGCCTCCAGGGTCC		

### 5.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis de la data utilizara el programa software estadístico SPSS v20 (IBM® SPSS® Statistics 20; IBM Corp., USA). La información recolectada en el instrumento utilizado, se almaceno en una base de datos del programa Excel para luego ser exportada a SSP20. El análisis incluyo el estudio de las características inmunológicas, sociodemográfica, los resultados de la dosificación de Vit D y adipocinas en suero y los marcadores genéticos obtenidos. Se calcularon las frecuencias alélicas y fenotípicas. Se hizo chi cuadrado para identificación de asociaciones, se calculó el OR para cada alelo y cada genotipo y haplotipo, se determinó equilibrio de Hardy-Weimberg.

La fuerza de asociación se calculó usando el programa *power and simple size calculation* versión 2.1.30. La diferencias se consideran estadísticamente significativas cuando el valor de p fue  $<0.05$ , se utilizaron la corrección de Bonferroni cuando fue necesario para corregir la data obtenida en cada genotipo.

Para el componente descriptivo de las variables clínicas se utilizaran estadísticos de tendencia central y paramétricos. Se utilizaron ANOVA cuando se requirió.

La data fue analizada por regresión lineal y regresión logística y análisis estadístico multivariado, con el fin de estudiar la relación entre los resultados de las pruebas serológica de Vit D y adiponectinas Con los polimorfismos estudiados

La distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas fueron testeadas con el Test de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg y comparadas entre los casos y controles usando el Test de diferenciación de muestras de Arlequin v3.5. Las asociaciones de las frecuencias genotípicas y alélicas con la enfermedad se realizaron mediante la prueba de  $\chi^2$  de Pearson con razón de verosimilitud. A las comparaciones múltiples se les realizó corrección de Bonferroni. Además, se

calcularon factores de riesgo (OR) y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% usando modelos de regresión logística ajustada (edad y sexo).

El análisis de haplotipo empleó el paquete estadístico “Haplo.stats v1.6.8” (R versión 3.0.2; <http://www.r-project.org>), con este paquete se corrieron las funciones Haplo.em (estimación de frecuencias haplotípicas), Haplo.score (estimación de asociaciones de haplotipos con rasgos categóricos o cuantitativos), Haplo.cc (Modelos de regresión logística para la estimación de riesgo - OR [95% IC] ajustado por edad y sexo, excluyendo alelos con frecuencias  $\leq 1\%$ , y 10.000 simulaciones que refinan el valor de  $p$  [*Psim*]). La significancia estadística fue interpretada como  $p < 0.05$ .

## **6. RESULTADOS**

## **6.1 PROYECTO I.**

### **ASOCIACIÓN DE LOS SISTEMAS PTPN22, VDR, MHC Y LOS NIVELES SÉRICOS DE VITAMINA D EN ADULTOS DEL CARIBE COLOMBIANO CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO SIN DAÑO RENAL.**

Con la finalidad de analizar la asociación genética de los loci de *PTPN22* (rs2476601), *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1* y *VDR* (*TaqI* [rs731236], *ApaI* [rs7975232], *FokI* [rs2228570] y *BsmI* [rs1544410]) con LES y el biomarcador Vitamina D. De la distribución de la enfermedad, se demostró un comportamiento sexo dependiente, siendo más frecuente en mujeres con LES (94%; n=125) en comparación a las mujeres control (59%; n=59) ( $p=0.00$ ) comportándose como un factor de riesgo para LES [OR:10.8; 95%IC: 4.7 - 24.6].

La distribución según sexos del LES demostró un comportamiento sexo dependiente, siendo más frecuente en mujeres, (94%) en comparación con la distribución demográfica normal en Colombia (59% de mujeres ( $p=0.00$ )) comportándose como un factor de riesgo para LES [OR:10.8; 95%IC: 4.7 - 24.6].

#### **6.1.1 Distribución de los loci de *PTPN22* (rs2476601), *TNF* (rs1800629, rs361525) y *VDR* (*TaqI* [rs731236], *ApaI* [rs7975232], *FokI* [rs2228570] y *BsmI* [rs1544410]).**

La distribución del polimorfismo rs2476601 de *PTPN22*, demostró que el genotipo AA no se encuentra presente en la población de estudio. Sin embargo el alelo A se encuentra en el 3.4% de la población. La distribución de esta variante genética es similar entre casos y controles por lo tanto este polimorfismo de *PTPN22* no se asocia con la enfermedad (**Tabla 6.1-1**)

**Tabla 0-1. Asociación del locus PTPN22 con LES.**

	Casos		H-W†	Controles		H-W†	OR	95% IC	Valor de p‡
	n=133	%		n=100	%				
<b>PTPN22 [rs2476601]</b>									
AA	---	---		---	---		---	---	
AG	7	5.3		1	1		5.5	0.6 - 45.4	0.57
GG	126	94.7		99	99		0.18	0.02 - 1.50	
A	7	2.6	1.00	1	0.5	1.00	5.37	0.6 - 44	0.059
G	259	97.4		199	99.5		0.18	0.02 - 1.5	

\*: Valor de  $p < 0,05$  con corrección de Bonferroni.

†: Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

‡: Razón de verosimilitud de Chi2.

OR [95%IC]: Modelos de regresión logística.

Por otra parte, entre los SNPs evaluados de *VDR*, *FokI* se asoció con LES a nivel de alelos. La distribución genotípica de este polimorfismo demostró el genotipo AA en el 18% (n=20) de los casos a diferencia de los controles (12%; n=12), seguido por el heterocigoto AG en el 45.9% (n=51) de los casos y 37% (n=37) de los controles; en cuanto a GG el 36% (n=40) de los casos portaron este genotipo mientras que en los controles fue del 51% (n=51) (p=0.08). En cuanto a la distribución alélica, el alelo A se portó como un factor de riesgo para LES [OR:1.58; 95%IC: 1.05 - 2.36] (p=0.025) a diferencia del alelo G. La distribución del equilibrio de Hardy-Weinberg demostró que los SNPs *Apal* (Controles) y *BsmI* (Casos) no se encontraron en equilibrio genético (Tabla 6.1 - 2).

**Tabla 0-2 Asociación del locus VDR con LES.**

	Casos		H-W†	Controles		H-W†	OR	95% IC	Valor de p‡
	n=111	%		n=100	%				
<b>FokI [rs2228570]</b>									
AA	20	18.0	1.00	12	12	1.00	2.12	0.9 - 4.8	0.081
AG	51	45.9		37	37		1.75	0.9 - 3.17	
GG	40	36.0		51	51		0.47	0.20 - 1.07	
A	91	41.0		61	30.5		<b>1.58</b>	<b>1.05 - 2.36</b>	
G	131	59.0		139	69.5		<b>0.63</b>	<b>0.42 - 0.94</b>	
<b>Apal [rs7975232]</b>									
AA	25	22.5	1.00	24	24	0.03*	0.61	0.2 - 1.4	0.317
AC	59	53.2		60	60		0.58	0.2 - 1.1	
CC	27	24.3		16	16		1.62	0.7 - 3.7	
A	109	49.1		108	54		0.82	0.56 - 1.20	
C	113	50.9		92	46		1.21	0.83 - 1.78	
<b>TaqI [rs731236]</b>									
AA	67	60.4	1.00	56	56	1.00	2.39	0.6 - 8.3	0.371
AG	40	36		36	36		2.22	0.6 - 8.0	
GG	4	3.6		8	8		0.41	0.1 - 1.46	
A	174	78.4		148	74.0		1.27	0.81 - 1.99	
G	48	21.6		52	26.0		0.78	0.5 - 1.23	
<b>BsmI [rs1544410]</b>									
CC	55	49.5	0.04*	55	55	1.00	2.33	0.5 - 9.4	0.169
CT	53	47.7		38	38		3.25	0.7 - 13.4	
TT	3	2.7		7	7		0.42	0.1 - 1.7	
C	163	73.4		148	74		0.97	0.62 - 1.49	
T	59	26.6		52	26		1.03	0.6 - 1.59	

\*: Valor de  $p < 0,05$  con corrección de Bonferroni.

†: Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

‡: Razón de verosimilitud de Chi<sup>2</sup>.

OR [95%IC]: Modelos de regresión logística.

### 6.1.2 Distribución de los loci *HLA-DRB1* y *HLA-DQB1*.

El locus \*DRB1 mostró 49 variantes distintas en general; 39 entre los casos y 41 en los controles estimando una diferencia significativa en cuanto a la distribución alélica entre los dos grupos ( $p=0.00$ ). En los casos los alelos \*0807, \*0813, \*0901, \*1103, \*1316, \*1406, \*1409 y \*1503 se presentaron únicamente en ellos a diferencia de los controles (Tabla 6.1- 3).

Tabla 0-3. Distribución alélica del locus HLA-DRB1 y su asociación con LES.

HLA DRB1	Casos		H-W†	Controles		H-W†	Valor de p Intergrupos§
	2n=266	%		2n=200	%		
*0101	8	3,0		12	6,0		
*0102	5	1,9		1	0,5		
*0103	1	0,37		7	3,5		
*0301	25	9,4		13	6,5		
*0302	17	6,4		3	1,5		
*0401	12	4,5		4	2,0		
*0402	6	2,3		2	1,0		
*0403	8	3,00		3	1,5		
*0404	6	2,3		4	2,0		
*0405	3	1,1		4	2,0		
*0406	1	0,37		1	0,5		
*0407	16	6,01		7	3,5		
*0408	---	---		1	0,5		
*0409	---	---		1	0,5		
*0411	6	2,25		13	6,5		
*0415	---	---		3	1,5		
*0701	23	8,6		27	13,5		
*0801	---	---		6	3,0		
*0802	7	2,63		4	2,0		
*0803	2	0,8		2	1,0		
*0804	4	1,50		3	1,5		
*0807	1	0,4		---	---		
*0813	1	0,4		---	---		
*0901	4	1,50		---	---		
*1001	2	0,75	0,34	5	2,5	0,56	0.00*
*1101	8	3,0		9	4,5		
*1102	5	1,9		8	4,0		
*1103	2	0,8		---	---		
*1104	4	1,50		3	1,5		
*1105	---	---		1	0,5		
*1201	3	1,1		5	2,5		
*1301	9	3,4		11	5,5		
*1302	6	2,25		5	2,5		
*1303	5	1,9		2	1,0		
*1304	2	0,8		1	0,5		
*1305	---	---		1	0,5		
*1312	---	---		1	0,5		
*1316	2	0,8		---	---		
*1401	8	3,00		7	3,5		
*1402	8	3,00		4	2,0		
*1406	2	0,75		---	---		
*1409	1	0,37		---	---		
*1417	---	---		1	0,5		
*1501	17	6,4		9	4,5		
*1502	1	0,37		1	0,5		
*1503	18	6,76		---	---		
*1601	---	---		1	0,5		
*1602	7	2,63		3	1,5		
*1604	---	---		1	0,5		

\*: Valor de p <0,05 con corrección de Bonferroni.

†: Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

§: Test exacto de diferenciación de muestras basada en las frecuencias haplotípicas, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov. ¥: Razón de verosimilitud de Chi2. OR [95%IC]: Modelos de regresión logística.

Al agrupar los alelos, el grupo de alelos \*03 y \*15 se comportaron como factores de riesgo para LES dada su distribución entre los casos 15.8% (n=42) y 13.5% (n=36), respectivamente con valores de OR de 2.15 (95%IC: 1.17 - 3.96) y 2.97 (95%IC: 1.43 - 6.14) (Tabla 6.1-4).

**Tabla 0-4. Distribución alélica del locus HLA-DRB1 (grupos) y su asociación con LES.**

	Casos		H-W†	Controles		H-W†	Valor de <i>p</i> Intergrupos§	OR	95% IC	Valor de <i>p</i> alelo específica¥
	2n=266	%		2n=200	%					
<b>HLA DRB1</b>										
*01	14	5,3		20	10,0		0.5	0.2 - 1.0	0.053	
<b>*03</b>	<b>42</b>	<b>15,8</b>		<b>16</b>	<b>8,0</b>		<b>2.15</b>	<b>1.17 - 3.96</b>	<b>0.01*</b>	
*04	58	21,8		43	21,5		1.01	0.65 - 1.59	0.937	
*07	23	8,6		27	13,5		0.60	0.33 - 1.09	0.096	
*08	15	5,6		15	7,5		0.73	0.35 - 1.54	0.420	
*09	4	1,5		---	---		---	---	<b>0.034*</b>	
*10	2	0,8	0,56	5	2,5	0,35	<b>0.002*</b>	0.05 - 1.53	0.124	
*11	19	7,1		21	10,5		0.65	0.34 - 1.25	0.203	
*12	3	1,1		5	2,5		0.44	0.10 - 1.88	0.262	
*13	24	9,0		21	10,5		0.84	0.45 - 1.56	0.594	
*14	19	7,1		12	6,0		1.20	0.57 - 2.54	0.623	
<b>*15</b>	<b>36</b>	<b>13,5</b>		<b>10</b>	<b>5,0</b>		<b>2.97</b>	<b>1.43 - 6.14</b>	<b>0.002*</b>	
*16	7	2,6		5	2,5		1.05	0.33 - 3.37	0.929	

\*: Valor de *p* <0,05 con corrección de Bonferroni.

†: Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

§: Test exacto de diferenciación de muestras basada en las frecuencias haplotípicas, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

¥: Razón de verosimilitud de Chi<sup>2</sup>.

OR [95%IC]: Modelos de regresión logística.

En cuanto al locus \*DQB1 mostró 23 variantes distintas en general; 18 entre los casos y 20 en los controles estimando una diferencia significativa en cuanto a la distribución alélica entre los dos grupos (p=0.00). En los casos los alelos \*0309, \*0609 y \*0611 se presentan únicamente entre los casos (Tabla 6.1 - 5).

**Tabla 0-5. Distribución alélica del locus HLA-DQB1 y su asociación con LES.**

	Casos		H-W†	Controles		H-W†	Valor de p Intergrupos§
	2n=266	%		2n=200	%		
<b>HLA DQB1</b>							
*0102	---	---		1	0,5		
*0201	27	10,15		25	12,5		
*0202	20	7,51		13	6,5		
*0203	5	1,87		1	0,5		
*0301	52	19,54		47	23,5		
*0302	45	16,91		30	15,0		
*0303	4	1,5		5	2,5		
*0304	---	---		1	0,5		
*0305	1	0,4		1	0,5		
*0309	6	2,25		---	---		
*0401	---	---		1	0,5		
*0402	19	7,14	0,36	16	8,0	0,76	<b>0.005*</b>
*0501	27	10,2		23	11,5		
*0502	4	1,50		3	1,5		
*0503	6	2,3		4	2,0		
*0511	---	---		1	0,5		
*0601	3	1,12		5	2,5		
*0602	36	13,5		9	4,5		
*0603	4	1,5		7	3,5		
*0604	2	0,75		6	3,0		
*0609	4	1,50		---	---		
*0611	1	0,37		---	---		
*0629	---	---		1	0,5		

\*: Valor de p <0,05 con corrección de Bonferroni.

†: Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

§: Test exacto de diferenciación de muestras basada en las frecuencias haplotípicas, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

¥: Razón de verosimilitud de Chi<sup>2</sup>.

OR [95%IC]: Modelos de regresión logística.

El análisis por grupo de alelos no demostró asociación con la enfermedad ( $p=0.57$ ) (Tabla 6.1-6).

**Tabla 0-6. Distribución del locus HLA-DQB1 (grupos) y su asociación con LES.**

	Casos		H-W†	Controles		H-W†	Valor de p Intergrupos§	OR	95% IC	Valor de p alelo específica¥
	2n=266	%		2n=200	%					
<b>HLA DQB1</b>										
*01	---	---		1	0,5			---	---	0.193
*02	52	19,54		39	19,5			1.0	0.6 - 1.59	0.989
*03	108	40,60	0,45	84	42,0	0,57	0.57	0.94	0.6 - 1.37	0.761
*04	19	7,14		17	8,5			0.82	0.41 - 1.63	0.588
*05	37	13,90		31	15,5			0.88	0.52 - 1.47	0.631
*06	50	18,79		28	14,0			1.42	0.8 - 2.35	0.167

\*: Valor de  $p < 0,05$  con corrección de Bonferroni.

†: Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

§: Test exacto de diferenciación de muestras basada en las frecuencias haplotípicas, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

¥: Razón de verosimilitud de Chi<sup>2</sup>.

OR [95%IC]: Modelos de regresión logística.

### 6.1.3 Análisis por Haplotipo.

El análisis por haplotipo demostró que en el locus *VDR* el haplotipo A/C/C/A [*TaqI*-*Apal*-*BsmI*-*FokI*] se comporta como un factor de riesgo para LES [OR:2.28; 95%IC: 1.12 - 4.66] ( $p=0.0$  y  $P_s=0.00$ ) teniendo como referencia el haplotipo A/C/CG (Tabla 6.1-7).

Mientras que en el loci de HLA \*DRB1 y \*DQB1 los haplotipos \*0701 / \*0201 y \*0411 / \*0302 se comportan como factores protectores con valores OR de 0.10 y 0.22 respectivamente ( $P_s=0.00$  y  $P_s=0.03$ , respectivamente) (Tabla 6.1- 8).

Tabla 0-7. Asociación de haplotipos de VDR como factores de riesgo de LES.

TaqI [rs731236]	ApaI [rs7975232]	BsmI [rs1544410]	FokI [rs2228570]	Frec. Haplotípica	Frec. Haplotípica	Valor de p $\text{¥}$	Valor de p Simulado $\text{§}$	OR	95% IC
				(%) Controles	(%) Casos				
A	A	C	G	0.23	0.158	0.052	0.058	0.90	0.4 - 1.7
G	A	T	G	0.13	0.107	0.114	0.107	0.95	0.4 - 2.2
A	C	C	G	0.298	0.215	0.135	0.137	1	---
G	A	T	A	0.103	0.0726	0.666	0.669	0.94	0.4 - 2.2
A	A	C	A	0.0601	0.0642	0.593	0.600	1.28	0.4 - 3.6
<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>0.14</b>	<b>0.259</b>	<b>0.00*</b>	<b>0.00*</b>	<b>2.28</b>	<b>1.12 - 4.66</b>
A	A	T	G	0.0094	0.0575	0.00*	0.00*	14.7	0.2 - 767

$\text{¥}$ : valor de p empírico.

$\text{§}$ : valor de p simulado

$\text{£}$ : Valor de Referencia para el modelo de regresión logística

**Tabla 0-8. Asociación de haplotipos de los loci \*DRB1-\*DQB1 como factor de riesgo de LES.**

HLA DRB1	HLA DQB1	Frecuencia Haplótipica (%) Controles	Frecuencia Haplótipica (%) Casos	OR	95% IC	Valor de p <sup>¥</sup>	Valor de p Simulado <sup>§</sup>
<b>*0701</b>	<b>*0201</b>	<b>0.045</b>	<b>0.003</b>	<b>0.10</b>	<b>0.0 - 0.88</b>	<b>0.005*</b>	<b>0.003*</b>
<b>*0411</b>	<b>*0302</b>	<b>0.055</b>	<b>0.018</b>	<b>0.22</b>	<b>0.0 - 0.85</b>	<b>0.030*</b>	<b>0.038*</b>
*0101	*0501	0.055	0.022	0.35	0.0 - 1.33	0.059	0.046
*1101	*0301	0.040	0.015	0.21	0.0 - 1.0	0.087	0.122
*1301	*0603	0.035	0.015	0.24	0.0 - 1.19	0.154	0.141
*1102	*0301	0.040	0.018	0.41	0.0 - 1.78	0.162	0.168
*0701	*0202	0.064	0.056	0.61	0.2 - 1.7	0.707	0.756
*1401	*0503	0.020	0.022	1.18	0.2 - 5.4	0.848	0.748
*1402	*0301	0.020	0.022	0.49	0.0 - 2.6	0.848	0.749
*0802	*0402	0.020	0.022	0.91	0.1 - 4.1	0.848	0.781
*0301	*0201	0.060	0.082	1	---	0.336	0.357
*1501	*0602	0.035	0.063	1.22	0.3 - 3.8	0.169	0.219
*0407	*0302	0.025	0.060	1.86	0.5 - 6.4	0.094	0.103
<b>*0302</b>	<b>*0301</b>	<b>0.005</b>	<b>0.047</b>	<b>7.89</b>	<b>0.8 - 71</b>	<b>0.009*</b>	<b>0.008*</b>

¥: valor de p empírico.

§: valor de p simulado

**En cuanto a la influencia de los loci de *PTPN22*, *VDR* y *HLA-DQB1* sobre los niveles séricos de de la vitamina D, estos no mostraron asociación alguna. Solo el *HLA-DRB1\*16* se mostró como factor de riesgo para la insuficiencia de vitamina D (OR: 4.43; 95%IC: 1.3 - 14.3) (p=0.021) (Tabla 6.1-9).**

**Tabla 0-9. Distribución alélica del locus HLA-DRB1 y su asociación con la vitamina D.**

	Insuficientes		Suficiencia		Valor de <i>p</i> <i>Intergrupos</i> §	OR	95% IC	Valor de <i>p</i> <i>alelo</i> <i>especifica</i> ¥
	n=68	%	n=398	%				
<b>HLA DRB1</b>								
*01	6	8,8	28	7,0	0.203	1.27	0.5 - 3.21	0.609
*03	7	10,3	51	12,8		0.78	0.3 - 1.8	0.552
*04	9	13,23	92	23,1		0.50	0.2 - 1.06	0.055
*07	11	16,2	39	9,8		1.77	0.8 - 3.6	0.136
*08	4	5,9	26	6,5		0.89	0.3 - 2.6	0.838
*09	2	2,9	2	0,50		6.0	0.8 - 43	0.093
*10	1	1,5	6	1,5		0.97	0.1 - 8.2	0.981
*11	5	7,35	35	8,8		0.82	0.3 - 2.1	0.689
*12	2	2,9	6	1,5		1.98	0.3 - 10	0.436
*13	5	7,4	40	10,1		0.71	0.2 - 1.8	0.472
*14	6	8,82	25	6,3		1.44	0.5 - 3.6	0.454
*15	5	7,35	41	10,3		0.69	0.2 - 1.8	0.435
<b>*16</b>	<b>5</b>	<b>7,35</b>	<b>7</b>	<b>1,8</b>		<b>4.43</b>	<b>1.3 - 14.3</b>	<b>0.021*</b>

\*: Valor de *p* <0,05 con corrección de Bonferroni.

§: Test exacto de diferenciación de muestras basada en las frecuencias haplotípicas, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

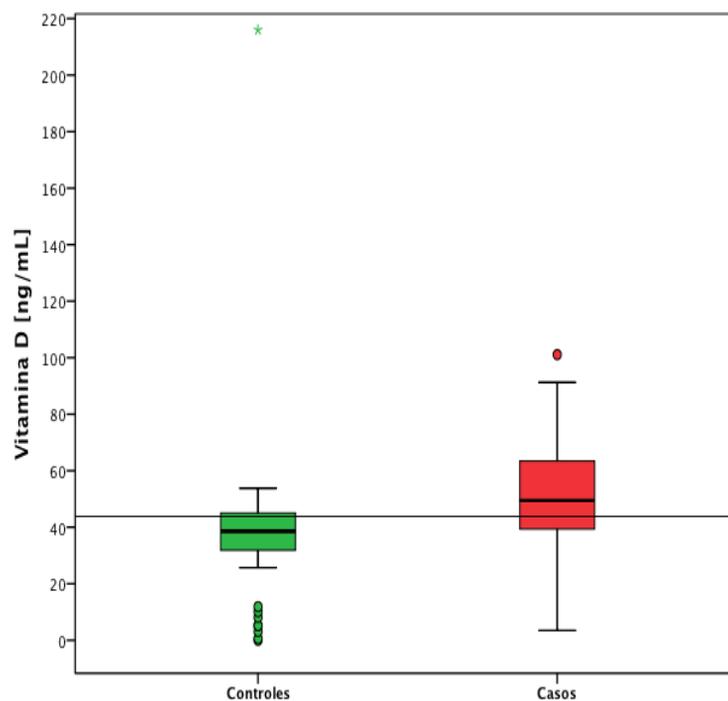
¥: Razón de verosimilitud de Chi2.

OR [95%IC]: Modelos de regresión logística.

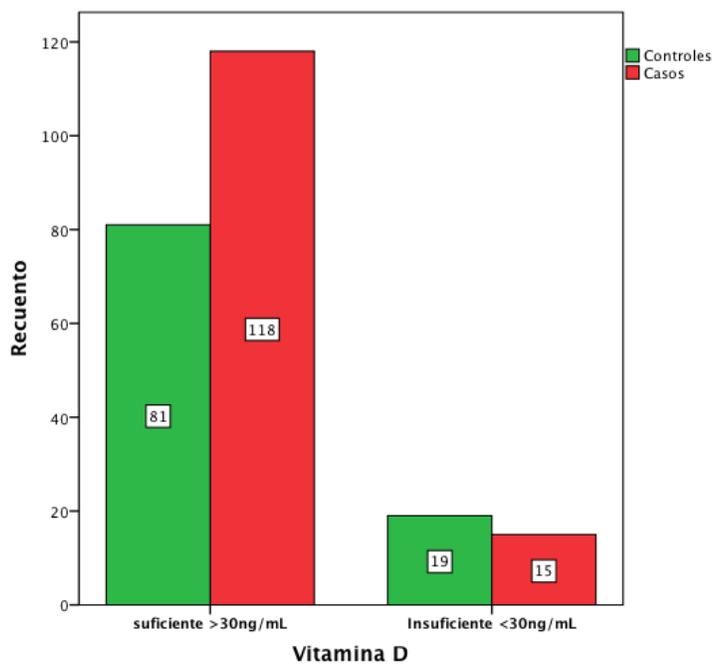
#### 6.1.4 Marcadores Séricos.

Se analizó la expresión sérica de vitamina D. Aunque entre los casos y controles los niveles séricos de Vitamina D se encuentran entre los niveles suficientes - 88.7% (n=118) de los casos y el 81% (n=81) de los controles - los casos presentan niveles significativamente mayores, en comparación a los casos (49.5 ± 24.06 ng/ml y 38.6 ± 13.23 ng/ml, respectivamente) (p=0.00) (**Figura 6.1.1, 6.1.2**).

**Figura 0.1 Concentraciones séricas de vitamina D en casos con LES.**



**Figura 0.2 Concentración de vitamina D según valores de referencia.**



## **6.2 PROYECTO II.**

### **ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DE LOS SISTEMAS GENÉTICOS *VDR*, *MHC*, *TNF-ALFA*, *PTPN22* Y DEL BIOMARCADOR MOLECULAR VITAMINA D CON EL ENDOTIPO NEFRITIS LÚPICA CLASE IV EN PACIENTES ADULTOS COLOMBIANOS.**

Se realizó un estudio de casos y controles en 49 sujetos con diagnóstico de “Lupus eritematoso sistémico (LES) con endotipo de “Nefritis Lúpica Tipo IV (NF-IV)” y 97 individuos sanos de Colombia con un promedio de edad de  $32 \pm 10.4$  años; el diagnóstico de la enfermedad se determinó según los criterios de la ACR.

Dentro de los criterios clínicos de evaluación de la enfermedad, el 79.6% (n=39) de los casos presentaron un Índice de actividad de LES - SLEDAI “Severo” (Score  $\geq 8$ ). Este pico de severidad se asoció significativamente con la edad promedio de diagnóstico, la cual se observó entre la segunda y tercera década de la vida en el 71.4% (n=35) de los individuos afectados; ( $p=0.00$ ). Por otra parte, la enfermedad demostró un comportamiento sexo dependiente, siendo más frecuente en mujeres que en hombres (79.5% [n=39] Vs 20.4% [n=10];  $p=0.01$ ). En cuanto a los antecedentes familiares de enfermedad autoinmune, el 16.3% (n=8) de los casos refirió algún padecimiento; el 8.2% (n=4) de ellos hizo mención de antecedentes de artritis reumatoide, LES (4.1%), síndrome antifosfolípidos (2%) y otras enfermedades del tejido conectivo (2%) (**Tabla 6.2-1**).

**Tabla 6.2-1. Descripción de la población de estudio.**

	Casos		Controles		OR	95% IC	Valor de p <sup>¥</sup>
	n=49	%	n=97	%			
<b>Sexo</b>							
	Masculino	10 20.4	40 41.2		0.36	0.16 - 0.81	<b>0.01*</b>
	Femenino	39 79.5	57 58.7		2.73	1.22 - 6.11	
<b>Edad</b>							
	≤ 20 años	7 14.3			---	---	
	21 a 40 años	32 65.3			---	---	
	≥ 41 años	10 20.4			---	---	
<b>Edad Dx de LES</b>							
	≤ 20 años	9 18.4	0,0 0,0		---	---	<b>0.00*</b>
	21 a 40 años	35 71.4	0,0 0,0		---	---	
	≥ 41 años	5 10.2	0,0 0,0		---	---	
	N/A	0 0,0	97 100,0		---	---	
<b>SLEDAI</b>							
	Severo (Score ≥ 8)	39 79.6	0,0 0,0		---	---	<b>0.00*</b>
	Moderado (Score 4 - 7.9)	7 14.3	0,0 0,0		---	---	
	Leve (Score 2 - 3.9)	1 2,0	0,0 0,0		---	---	
	Inactividad (Score < 2)	2 4.1	97 100		---	---	
<b>Antecedente Familiar de Enf. Autoinmune</b>							
	Presente	8 16.3	0,0 0,0		---	---	<b>0.00*</b>
	Ausente	41 83.7	97 100		---	---	
	Artritis Reumatoide	4 8.2	0,0 0,0		---	---	<b>0.00*</b>
	Lupus Eritematoso Sistémico	2 4.1	0,0 0,0		---	---	
	Síndrome Antifosfolípidos	1 2,0	0,0 0,0		---	---	
	Enf. del Tejido Conectivo	1 2,0	0,0 0,0		---	---	

\*: Valor de p < 0,05. ¥: Razón de verosimilitud de Chi<sup>2</sup>.

En el presente estudio se evaluaron marcadores genéticos de los loci de *PTPN22* (rs2476601), *HLA-C*, *HLA-B*, *TNF* (rs1800629, rs361525), *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1*, *VDR* (*FokI* [rs2228570], *Apal* [rs7975232], *TaqI* [rs731236] y *BsmI* [rs1544410]) con la finalidad de identificar asociaciones genéticas con endofenotipo de LES como es el diagnóstico de nefritis Lúpica tipo IV.

Las distribuciones alélicas de las variantes genéticas de *PTPN22*, *TNF-alfa*, *VDR*, *HLA-DRB1* y *HLA-DQB1* genotificadas no mostraron una desviación significativa del equilibrio de Hardy – Weinberg tanto en el grupo de casos como de controles. Sin embargo, *HLA-C* no se encontró en equilibrio H-W en el grupo control, al igual

que HLA-B en el cual ambos grupos se desviaron del equilibrio genético H-W (Tabla 6.2-2 a 6.2-8).

### 6.2.1 Distribuciones genotípicas y alélicas del SNP rs2476601 [A/G] en el gen PTPN22 [Chr: 1p13.2] y riesgo de nefritis lúpica NL-IV en casos y controles.

A propósito de la distribución alélica, el alelo A fue el alelo de menor distribución en toda la población de estudio con un 2.4% (2n=7) de frecuencia. A su vez este alelo mostró una diferencia estadística en su distribución entre casos y controles (6.1% [2n=6] Vs 0.5% [2n=1], respectivamente comportándose como un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad con un OR de 12.5 (95% IC=1.49-106; p=0.02) en comparación al alelo G cuyo OR fue de 0.79 (95% IC=0.0-0.06; p=0.02) (Tabla 6-2-2).

**Tabla 6.2-2. Asociación del SNP rs2476601 del gen PTPN22 con NF-IV.**

	Casos			Controles			OR	95% IC	Valor de p $\ddagger$
	n=49	%	H-W $\dagger$	n=97	%	H-W $\dagger$			
<b>rs2476601</b>									
AA	---	---		---	---		---	---	
AG	6	12.2		1	1,0		<b>13.39</b>	<b>1.56 – 114</b>	<b>0.00**</b>
GG	43	87.8		96	99,0		<b>0.75</b>	<b>0.00 - 0.63</b>	
A	6	6.1	1,00	1	0.5	1,00	<b>12.58</b>	<b>1.49 – 106</b>	<b>0.00*</b>
G	92	93.9		193	99.5		<b>0.79</b>	<b>0.00 - 0.067</b>	

\*: Valor de p <0,05 con corrección de Bonferroni.

$\dagger$ : Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

$\ddagger$ : Razón de verosimilitud de Chi<sup>2</sup>.

OR [95%IC]: Modelos de regresión logística ajustado por sexo.

### 6.2.2 Distribuciones genotípicas y alélicas de los SNPs rs1800629 [A/G] y rs361525 [A/G] en el gen TNF [Chr: 6p21.3] y riesgo de nefritis lúpica NL-IV en casos y controles.

En cuanto al SNP rs1800629, las frecuencias de los genotipos AA y AG exhibieron un incremento no significativo en los individuos con NF-IV (4.1% [n=2] y 20.4% [n=10], respectivamente), a diferencia de los controles (1% [n=1] y 13.4% [n=13]),

con OR de 4.48 (95% IC=0.3-51;  $p=0.26$ ) y 1.72 (95% IC=0.69-4.2;  $p=0.24$ ) respectivamente, teniendo como referencia el genotipo GG el cual fue más frecuente en los controles en un 85.6% [ $n=83$ ]. Por otra parte, el alelo A fue el de menor distribución en un 9.9% [ $2n=29$ ] del total de sujetos estudiados. A su vez no se observó diferencia significativa en la distribución alélica de este polimorfismo entre casos y controles (**Tabla 6.2-3**).

Con respecto al SNP rs361525, el genotipo AA estuvo ausente entre los casos, a diferencia de los sujetos controles cuya frecuencia fue del 2.1% [ $n=2$ ]. En cambio, el genotipo homocigoto GG fue el más frecuente en ambos grupos (casos - 87.8% [ $n=43$ ] Vs controles - 87.6% [ $n=85$ ]) seguido del heterocigoto AG (casos - 12.2% [ $n=6$ ] Vs controles - 10.3% [ $n=10$ ]). A pesar de la distribución genotípica de este SNP, su distribución entre los casos y controles no mostraron diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.41$ ). Algo similar ocurrió con las frecuencias alélicas, donde el alelo A fue el menos frecuente (6.8% [ $2n=20$ ]) en el total de la población de estudio ( $p=0.81$ ) (**Tabla 6.2-3**).

**Tabla 6.2-3. Distribución genotípica y alélica del locus TNF.**

	Casos			H-W†	Controles			OR	95% IC	Valor de $p$ ‡
	n=49	%			n=97	%	H-W†			
<b>TNF</b>										
rs1800629	AA	2	4.1	0.23	1	1	0.44	4.48	0.30 - 51	0.25
	AG	10	20.4		13	13.4		1.72	0.69 - 4.29	
	GG	37	75.5		83	85.6		0.22	0.02 - 2.53	
	A	14	14.3		15	7.7		1.89	0.91 - 4.30	
	G	84	85.7		179	92.3		0.5	0.23 - 1.08	
rs361525	AA	0	0.0	1.0	2	2.1	0.07	---	---	0.41
	AG	6	12.2		10	10.3		1.18	0.40 - 3.48	
	GG	43	87.8		85	87.6		1.01	0.35 - 2.88	
	A	6	6.1		14	7.2		0.83	0.31 - 2.25	
	G	92	93.9		180	92.8		1.19	0.44 - 3.20	

\*: Valor de  $p < 0,05$  con corrección de Bonferroni.

†: Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

‡: Razón de verosimilitud de Chi2.

OR [95%IC]: Modelos de regresión logística ajustado por sexo.

### **6.2.3 Distribuciones genotípicas y alélicas de los SNPs FokI [rs2228570 A/G], Apal [rs7975232 A/C], TaqI [rs731236 A/G] y BsmI [rs1544410 C/T] en el gen VDR [Chr: 12q13.11] y riesgo de nefritis lúpica NL-IV en casos y controles.**

De los cuatro SNPs de VDR evaluados, *FokI* mostró asociación con la NL-IV. Ejemplo de esto es que los genotipos AA y AG se comporten como factores de riesgo con valores de OR de 3.47 y 3.95 respectivamente; mostrando una diferencia estadísticamente significativa en su distribución entre casos y controles. A diferencia del genotipo homocigoto GG el cual se comporta como factor protector con un OR de 0.28 (95% IC=0.09-0.84;  $p=0.00$ ) (**Tabla 6.2-4**).

A propósito de las distribuciones alélicas, el alelo A fue el alelo de menor frecuencia en la población de estudio en un 36% ( $2n=105$ ) de los individuos. A su vez, este alelo se mostró como factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad con un OR de 2.16 (95% IC=1.3-3.56;  $p=0.01$ ) con relación al alelo G el cual se exhibió como factor protector con un OR de 0.46 (95% IC=0.2-0.7;  $p=0.01$ ) (**Tabla 6.2-4**).

En cuanto a los SNPs Apal [rs7975232], TaqI [rs731236] y BsmI [rs1544410], a pesar de presentar diferencias en la distribución de sus genotipos entre el grupo de casos y el grupo de controles, estas no fueron estadísticamente significativas. A propósito de las frecuencias alélicas, los alelo C (45% [ $2n=130$ ]), G (27% [ $2n=78$ ]), y T (27% [ $2n=78$ ]) de estos SNPs respectivamente, fueron los menos comunes en la población de estudio. Que al igual que las distribuciones genotípicas no exhibieron diferencias significativas (**Tabla 6.2-4**).

**Tabla 6-2-4. Asociación del locus VDR con la presencia de NF-IV.**

	Casos			Controles			OR	95% IC	Valor de p $\ddagger$
	n=49	%	H-W $\dagger$	n=97	%	H-W $\dagger$			
<b>FokI [rs2228570]</b>									
AA	9	18,4	0,25	12	12,4	0,14	<b>3,47</b>	<b>1,17 - 10,26</b>	<b>0,00*</b>
AG	29	59,2		34	35,1		<b>3,95</b>	<b>1,74 - 8,96</b>	
GG	11	22,4		51	52,6		<b>0,28</b>	<b>0,09 - 0,84</b>	
A	47	48,0		58	29,9		<b>2,16</b>	<b>1,30 - 3,56</b>	
G	51	52,0		136	70,1		<b>0,46</b>	<b>0,28 - 0,76</b>	
<b>Apal [rs7975232]</b>									
AA	17	34,7	0,77	24	24,7	0,10	1,25	0,45 - 3,51	0,36
AC	23	46,9		57	58,8		0,71	0,27 - 1,85	
CC	9	18,4		16	16,5		0,7	0,28 - 2,21	
A	57	58,2		105	54,1		1,17	0,72 - 1,92	
C	41	41,8		89	45,9		0,84	0,51 - 1,38	
<b>TaqI [rs731236]</b>									
AA	23	46,9	0,29	55	56,7	0,42	1,67	0,33 - 8,48	0,21
AG	24	49		34	35,1		2,82	0,55 - 14,48	
GG	2	4,1		8	8,2		0,59	0,11 - 3,03	
A	70	71,4		144	74,2		0,86	0,50 - 1,49	
G	28	28,6		50	25,8		1,15	0,66 - 1,98	
<b>BsmI [rs1544410]</b>									
CC	25	51	1,00	54	55,7	0,79	0,81	0,21 - 3,02	0,86
CT	20	40,8		36	37,1		0,97	0,25 - 3,73	
TT	4	8,2		7	7,2		1,23	0,33 - 4,60	
C	70	71,4		144	74,2		0,86	0,50 - 1,49	
T	28	28,6		50	25,8		1,15	0,66 - 1,98	

\*: Valor de  $p < 0,05$  con corrección de Bonferroni.

$\dagger$ : Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

$\ddagger$ : Razón de verosimilitud de Chi<sup>2</sup>.

OR [95%IC]: Modelos de regresión logística ajustado por sexo.

#### 6.2.4 Distribuciones alélicas de los loci HLA-C, HLA-B, HLA-DRB1 y HLA-DQB1 en la ubicación Chr: 6p21.3 y riesgo de nefritis lúpica NL-IV en casos y controles.

La distribución alélica para *HLA-C*, *HLA-B*, *HLA-DRB1* y *HLA-DQB1* en la población estudiada, demostró 14 alelos para el locus \*C, 29 alelos para el locus \*B, 44 alelos para \*DRB1 y 22 alelos para el locus \*DQB1. En cuanto al locus *HLA-C*, tanto los casos como los controles comparten los mismos alelos sin presentar diferencia significativa entre ambos grupos. Solo el alelo *HLA-C\*07* se mostró como factor de riesgo para el desarrollo de NF-IV con un OR de 3.36 (95%

IC=1.64-6.87;  $p=0.00$ ) debido a su distribución entre casos y controles (31.6% [2n=31] Vs 19.6% [2n=38], respectivamente) (**Tabla 6.2-5**).

**Tabla 6.2-5. Distribución alélica del locus HLA-C.**

	Casos		H- W†	Controles		H- W†	Valor de $p$ Intergrupos§	OR	95% IC	Valor de $p$ alelo específica‡
	n=98	%		n=194	%					
<b>HLA C</b>										
*01	4	4.1		22	11.3		0.45	0.14 - 1.42	0.15	
*02	9	9.2		23	11.9		0.98	0.40 - 2.39	0.97	
*03	12	12.2		31	16.0		0.93	0.41 - 2.11	0.86	
*04	14	14.3		37	19.1		0.64	0.29 - 1.43	0.27	
*05	3	3.1		2	1.0		4.22	0.74 - 23.9	0.09	
*06	4	4.1		3	1.5		2.78	0.59 - 12.9	0.19	
<b>*07</b>	31	31.6	0.09	38	19.6	<b>0.00*</b>	<b>3.36</b>	<b>1.64 - 6.87</b>	<b>0.01*</b>	
*08	5	5.1		14	7.2	0.1	0.57	0.17 - 1.86	0.33	
*12	2	2.0		6	3.1		0.78	0.14 - 4.18	0.77	
*14	2	2.0		5	2.6		0.98	0.17 - 5.59	0.99	
*15	4	4.1		3	1.5		2.04	0.39 - 10.5	0.39	
*16	5	5.1		3	1.5		2.78	0.59 - 12.9	0.19	
*17	2	2.0		4	2.1		0.98	0.17 - 5.59	0.99	
*18	1	2.0		3	1.5		0.65	0.6 - 6.44	0.7	

\*: Valor de  $p < 0,05$  con corrección de Bonferroni.

†: Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

§: Test exacto de diferenciación de muestras basada en las frecuencias haplotípicas, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

‡: Razón de verosimilitud de Chi2.

OR [95%IC]: Modelos de regresión logística ajustado por sexo.

Respecto al locus *HLA-B*, se observó una diferencia estadísticamente significativa con relación al número de alelos presentes en cada grupo (Casos - 20 alelos Vs Controles - 27 alelos;  $p=0.00$ ) compartiendo solo 18 alelos entre ambos grupos, como es HLA-B\*08 el cual se mostró como factor de riesgo para la enfermedad con un OR de 12.1 (95% IC=2.5-58.1;  $p=0.02$ ) y HLA-B\*27 el cual tiende a ser un posible factor protector dada su distribución entre casos y controles (1% [2n=1] Vs 6.7% [2n=13]. respectivamente) ( $p=0.057$ ) (**Tabla 6.2-6**).

**Tabla 6.2-6. Distribución alélica del locus HLA-B.**

	Casos		H- W†	Controles		H- W†	Valor de <i>p</i> Intergrupos§	OR	95% IC	Valor de <i>p</i> alelo específica¥
	n=98	%		n=194	%					
<b>HLA B</b>										
*03	--	--		2	1.03		---	---		0.36
*07	15	15.3		19	9.79		1.88	0.83 - 4.23		0.12
<b>*08</b>	11	11.22		2	1.03		<b>12.1</b>	<b>2.5 - 58.1</b>		<b>0.00*</b>
*14	6	6.12		8	4.12		1.46	0.43 - 4.86		0.54
*15	9	9.18		16	8.24		1.23	0.49 - 3.05		0.65
*18	4	4.08		7	3.6		1.34	0.36 - 5.02		0.65
*27	1	1.02		13	6.7		0.13	0.01 - 1.06		<b>0.01*</b>
*30	--	--		1	0.51		---	---		0.36
*35	14	14.28		33	17.01		0.88	0.40 - 1.95		0.76
*37	--	--		2	1.03		---	---		0.19
*38	1	1.02		2	1.03		0.99	0.08 - 11.01		0.99
*39	2	2.04		11	5.67		0.41	0.08 - 2.0		0.23
*40	8	8.0		10	5.0		1.69	0.62 - 4.61		0.30
*41	--	--		3	1.54		---	---		0.19
*42	1	1.02	<b>0.02*</b>	5	2.57	<b>0.00*</b>	<b>0.02*</b>	0.48	0.05 - 4.45	0.49
*44	4	4.08		14	7.21		0.38	0.10 - 1.41		0.12
*45	2	2.04		2	1.03		2.02	0.27 - 14.8		0.49
*48	--	--		2	1.03		---	---		0.19
*49	1	1.02		6	3.09		0.31	0.03 - 2.7		0.23
*50	2	2.04		4	2.06		1.33	0.21 - 8.25		0.76
*51	7	7.14		18	9.27		0.62	0.21 - 1.82		0.37
*52	1	1.02		2	1.03		2,00	0.12 - 32.6		0.63
*53	6	6.12		6	3.09		1.72	0.49 - 5.95		0.39
*55	--	--		1	0.51		---	---		0.36
*57	1	1.02		--	--		---	---		0.13
*58	--	--		2	1.03		---	---		0.19
*67	--	--		2	1.03		---	---		0.19
*70	--	--		1	0.51		---	---		0.36
*78	1	1.02		--	--		---	---		0.13

\*: Valor de *p* <0,05 con corrección de Bonferroni.

†: Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

§: Test exacto de diferenciación de muestras basada en las frecuencias haplotípicas, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

¥: Razón de verosimilitud de Chi<sup>2</sup>.

OR [95%IC]: Modelos de regresión logística ajustado por sexo.

Dentro de las moléculas MHC clase II, HLA-DRB1 presentó diferencia significativa en el número de alelos según el grupo de estudio, los casos reportaron 31 alelos, mientras que los sujetos sanos presentaron 40 alelos (*p*=0.00), compartiendo 26 alelos comunes en ambos grupos. Tal es el caso de HLA-DRB1\*0102, el cual se

reporta con mayor frecuencia en el grupo de casos (4.08% [2n=4]) en comparación al grupo control (0.5% [2n=1]), comportandose como un posible factor de riesgo con un OR de 8.53 (95% IC=0.9-78; p=0.058). A diferencia del alelo HLA-DRB1\*0103 el cual se presentó solo entre los controles con una frecuencia 3,6% (2n=7). HLA-DRB1\*1503 estuvo presente solo entre los casos con una distribución de 7.14% (2n=7) (Tabla 6.2-7).

**Tabla 6.2-7. Distribución alélica del locus HLA-DRB1.**

	Casos		H- W†	Controles		H- W†	Valor de p Intergrupos§	OR	95% IC	Valor de p alelo específica¶
	n=98	%		n=194	%					
<b>HLA DRB1</b>										
*0101	2	2.04		11	5,7			0.33	0.07 - 1.56	0.12
*0102	4	4.08		1	0,5			8.53	0.92 - 78.5	<b>0.03*</b>
*0103	--	--		7	3,6			--	--	<b>0.01*</b>
*0301	10	10.2		12	6,2			1.59	0.62 - 4.0	0.33
*0302	5	5.1		3	1,5			3.56	0.81 - 15.5	0.08
*0401	1	1.02		4	2,1			0.48	0.05 - 4.45	0.49
*0402	1	1.02		2	1,0			0.99	0.08 - 11.1	0.99
*0403	--	--		3	1,5			--	--	0.11
*0404	3	3.06		4	2,1			2.04	0.39 - 10.5	0.39
*0405	3	3.06		4	2,1			1.51	0.32 - 7.05	0.6
*0406	--	--		1	0,5			--	--	0.36
*0407	5	5.1		6	3,1			1.72	0.49 - 5.95	0.39
*0408	--	--		1	0,5			--	--	0.36
*0409	1	1.02		1	0,5			2,0	0.12 - 32.6	0.63
*0410	1	1.02		--	--			--	--	0.13
*0411	2	2.04		12	6,2			0.3	0.06 - 1.40	0.08
*0415	--	--	0.42	3	1,5	0.55	<b>0.00**</b>	--	--	0.11
*0701	10	10.2		27	13,9			0.53	0.22 - 1.28	0.14
*0801	1	1.02		6	3,1			0.38	0.04 - 3.37	0.34
*0802	2	2.04		4	2,1			0.98	0.17 - 5.59	0.99
*0803	--	--		2	1,0			--	--	0.19
*0804	4	4.08		3	1,5			2.78	0.59 - 12.9	0.19
*0901	1	1.02		--	--			--	--	0.13
*1001	3	3.06		5	2,6			1.2	0.27 - 5.24	0.81
*1101	3	3.06		8	4,1			0.72	0.18 - 2.8	0.64
*1102	1	1.02		8	4,1			0.23	0.02 - 1.9	0.1
*1104	1	1.02		3	1,5			0.65	0.06 - 6.4	0.7
*1105	--	--		1	0,5			---	--	0.36
*1201	2	2.04		5	2,6			0.778	0.14 - 4.18	0.77
*1301	2	2.04		11	5,7			0.33	0.07 - 1.56	0.12
*1302	5	5.1		5	2,6			1.72	0.49 - 5.9	0.39
*1303	2	2.04		2	1,0			2,0	0.27 - 14.8	0.49
*1304	--	--		1	0,5			--	--	0.36

*1305	--	--	1	0,5	--	--	0.36
*1312	--	--	1	0,5	--	--	0.36
*1401	1	1.02	7	3,6	0.31	0.03 - 2.70	0.23
*1402	--	--	4	2,1	--	--	0.06
*1417	--	--	1	0,5	--	--	0.36
*1501	9	9.18	9	4,6	2.2	0.81 - 5.9	0.12
*1502	1	1.02	1	0,5	2,0	0.12 - 32.6	0.63
*1503	7	7.14	--	--	--	--	<b>0.00*</b>
*1601	1	1.02	--	--	--	--	0.13
*1602	4	4.08	3	1,5	2.78	0.59 - 12.9	0.19
*1604	--	--	1	0,5	--	--	0.36

\*: Valor de  $p < 0,05$  con corrección de Bonferroni.

†: Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

§: Test exacto de diferenciación de muestras basada en las frecuencias haplotípicas, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

¥: Razón de verosimilitud de  $\chi^2$ .

OR [95%IC]: Modelos de regresión logística ajustado por sexo.

Referente a HLA-DQB1, el grupo de casos reportó 14 alelos mientras que el grupo de controles presentó 20 ( $p=0.03$ ), compartiendo solo 12 alelos. Dentro de los cuales HLA-DQB1\*0502 y \*0602 son considerados como factores de riesgo para la presencia de la enfermedad con valores de OR de 5.39 (95% IC=1.008-28;  $p=0.03$ ) y 4.9 (95% IC=1.9-12.6;  $p=0.00$ ) respectivamente. Por otra parte los alelos HLA-DQB1\*0309 y \*0609 se reportan únicamente en el grupo de casos con frecuencias de 3.06% ( $2n=3$ ;  $p=0.01$ ) y 2.04% ( $2n=2$ ;  $p=0.03$ ). Contrario a esto el alelo HLA-DQB1\*0601 se presentó solo en los individuos controles con una frecuencia de 2.57% ( $2n=5$ ;  $p=0.04$ ) (**Tabla 6.2-8**).

**Tabla 6.2-8. Distribución alélica del locus HLA-DQB1.**

	Casos		H- W†	Controles		H- W†	Valor de <i>p</i> Intergrupos§	OR	95% IC	Valor de <i>p</i> alelo específica‡
	n=98	%		n=194	%					
<b>HLA DQB1</b>										
*0102	--	--		1	0.51		--	--		0.36
*0201	10	10.2		25	12.88		0.68	0.29 - 1.61		0.37
*0202	10	10.2		13	6.7		1.65	0.66 - 4.10		0.28
*0203	--	--		1	0.51		--	--		0.36
*0301	15	15.3		45	23.19		0.54	0.26 - 1.14		0.1
*0302	14	14.28		28	14.43		0.88	0.40 - 1.95		0.76
*0303	2	2.04		5	2.57		0.78	0.14 - 4.18		0.77
*0304	--	--		1	0.51		--	--		0.36
*0305	--	--		1	0.51		--	--		0.36
*0309	3	3.06		--	--		--	--		<b>0.01*</b>
*0401	--	--	0.25	1	0.51	0.63	--	--		0.36
*0402	7	7.14		16	8.24		<b>0.03*</b>	0.34 - 2.40		0.85
*0501	10	10.2		22	11.34		0.81	0.34 - 1.94		0.64
<b>*0502</b>	5	5.1		2	1.03		<b>5.39</b>	<b>1.008 - 28</b>		<b>0.03*</b>
*0503	1	1.02		4	2.06		0.48	0.05 - 4.45		0.49
*0511	--	--		1	0.51		--	--		0.36
*0601	--	--		5	2.57		--	--		<b>0.04*</b>
<b>*0602</b>	15	15.3		9	4.63		<b>4.9</b>	<b>1.90 - 12.6</b>		<b>0.00*</b>
*0603	2	2.04		7	3.6		0.64	0.12 - 3.32		0.58
*0604	2	2.04		6	3.09		0.64	0.12 - 3.32		0.58
*0609	2	2.04		--	--		--	--		<b>0.03*</b>
*0629	--	--		1	0.51		--	--		0.36

\*: Valor de *p* < 0,05 con corrección de Bonferroni.

†: Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

§: Test exacto de diferenciación de muestras basada en las frecuencias haplotípicas, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

‡: Razón de verosimilitud de Chi<sup>2</sup>.

OR [95%IC]: Modelos de regresión logística ajustado por sexo.

### 6.2.5 Distribuciones haplotípicas de los loci HLA-C, HLA-B, TNF-rs1800629, TNF-rs361525, HLA-DRB1, HLA-DQB1 [Chr: 6p21.3] y riesgo de nefritis lúpica NL-IV en casos y controles.

El análisis de haplotipos de la región 6p21.3, arrojó un total de 227 combinaciones de haplotipos posibles en esta población. Para identificar asociaciones de estos haplotipos con la presencia de la enfermedad, se empleó el paquete estadístico

“Haplo.stat”. Este excluyó a todos aquellos haplotipos cuya frecuencia fue  $\leq 1\%$  y realizó 10.000 simulaciones para el refinamiento del análisis, arrojando un Score estadístico, un valor de OR (95% IC) y un valor de  $p$  simulado ( $P_{sim}$ ). A partir de este análisis, el haplotipo C\*07/ B\*08 / A / G / DRB1\*0301 / DQB1\*0201 se asociaron significativamente con la enfermedad ( $P_{sim}=0.00$ ) comportandose como un factor de riesgo para el desarrollo de NF-IV con un OR 2.04 (95% IC=1.43-2.9;  $p=0.00$ ) teniendo como referencia el haplotipo C\*07/ B\*07 / G / G / DRB1\*1501 / DQB1\*0602 (**Tabla 6.2-9**).

#### **6.2.6 Distribuciones haplotípicas de los SNPs FokI [rs2228570 A/G], ApaI [rs7975232 A/C], TaqI [rs731236 A/G] y BsmI [rs1544410 C/T] en el gen VDR [Chr: 12q13.11] y riesgo de NF-IV en casos y controles.**

A partir del análisis de haplotipos de los SNPs genotipificados de *VDR*, se obtuvieron 13 combinaciones posibles de estos. Se observó que el haplotipo A / C / C / A se asoció significativamente con la enfermedad ( $P_{sim}=0.02$ ) comportandose como factor de riesgo con un OR de 3.54 (95% IC=1.1-10.6) teniendo como referencia el haplotipo A / C / C / G (**Tabla 6.2-10**).

Tabla 6.2-9. Frecuencias haplotípicas de los loci TNF-HLA y su asociación con la enfermedad.

HLA C	HLA B	TNF		HLA DRB1	HLA DQB1	Frecuencia Haplotípica (%)	Frecuencia Haplotípica (%)	OR	95% IC	Valor de p $\text{¥}$	Valor de p Simulado $\text{§}$
		rs1800629	rs361525			Controles	Casos				
*04	*35	G	G	*0101	*0501	3,090	---	---	---	0,08	<b>0,01*</b>
*01	*27	G	G	*0103	*0301	2,060	---	---	---	0,21	<b>0,03*</b>
*02	*27	G	G	*0701	*0202	---	---	---	---	0,21	<b>0,03*</b>
*03	*40	G	G	*0411	*0302	1,550	---	---	---	0,21	<b>0,03*</b>
*04	*35	G	G	*1501	*0602	1,550	---	---	---	0,21	<b>0,03*</b>
*04	*44	G	G	*0701	*0202	1,550	---	---	---	0,71	1,00
*04	*35	G	G	*0404	*0302	1,030	---	---	---	0,99	0,85
*04	*35	G	G	*1401	*0503	1,030	---	0,17	0,00 - 3,04	0,99	1,00
*07	*39	G	G	*0411	*0302	1,030	---	---	---	0,99	1,00
*04	*35	G	G	*1602	*0301	0,520	2,040	0,42	0,01 - 9,9	0,22	0,55
*03	*40	G	G	*0407	*0302	---	3,060	0,38	0,02 - 4,9	0,20	0,34
<b>*07</b>	<b>*07</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>*1501</b>	<b>*0602</b>	1,030	7,140	1	---	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>
<b>*07</b>	<b>*08</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>*0301</b>	<b>*0201</b>	---	6,120	<b>2,04</b>	<b>1,43 - 2,9</b>	<b>0,00*</b>	<b>0,00*</b>

$\text{¥}$ : Valor de p empírico.

$\text{§}$ : Valor de p simulado

Tabla 6.2-10. Asociación de haplotipos de VDR como factores de riesgo de NF-IV.

TaqI [rs731236]	ApaI [rs7975232]	BsmI [rs1544410]	FokI [rs2228570]	Frec. Haplotípica (%)	Frec. Haplotípica (%)	OR	95% IC	Valor de p $\text{¥}$	Valor de p Simulado $\text{§}$
				Controles	Casos				
<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>3.0</b>	<b>1.4</b>	<b>1</b>	£	<b>0.02*</b>	<b>0.02*</b>
A	A	C	G	2.3	1.8	1.32	0.5 - 3.3	0.21	0.22
G	A	T	G	1.3	1.3	1.59	0.4 - 5.3	0.56	0.55
G	A	T	A	9.9	1.0	2.18	0.7 - 6.0	0.34	0.36
A	A	C	A	6.0	8.4	2.70	0.7 - 10.4	0.13	0.14
<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>1.3</b>	<b>2.5</b>	<b>3.54</b>	<b>1.1 - 10.6</b>	<b>0.02*</b>	<b>0.02*</b>
A	A	T	A	8.4	2.9	5.40	1.2 - 23.0	---	---
A	A	T	G	9.5	3.1	5.40	1.2 - 23.0	---	---
A	C	T	G	1.3	1.25	5.40	1.2 - 23.0	---	---
G	A	C	A	---	3.6	---	---	---	---
G	A	C	G	5.9	3.8	5.40	1.2 - 23.0	---	---
G	C	C	G	4.7	---	5.40	1.2 - 23.0	---	---
G	C	T	G	1.6	---	5.40	1.2 - 23.0	---	---

$\text{¥}$ : Valor de p empírico.

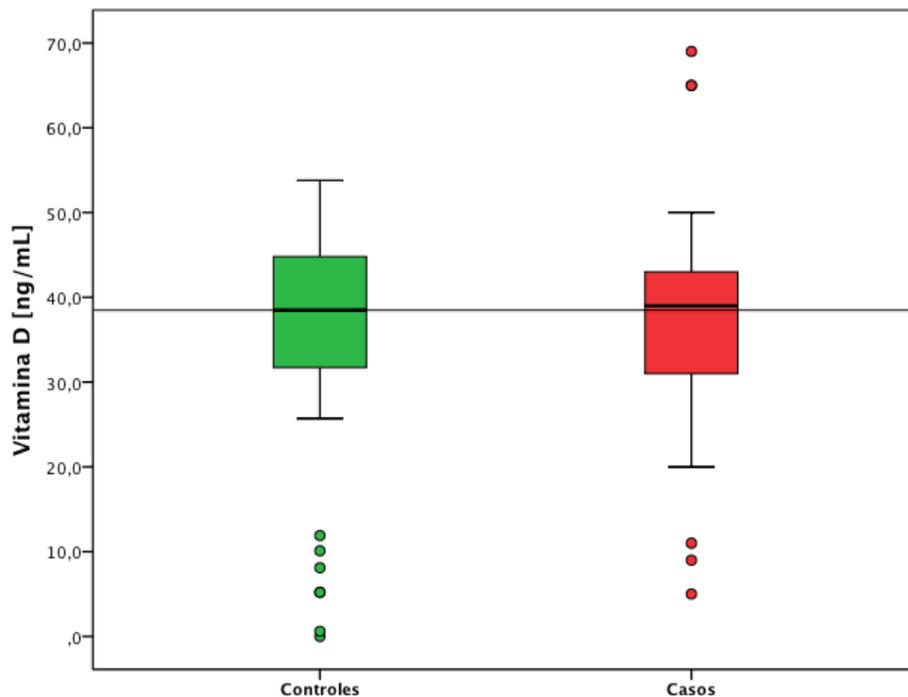
$\text{§}$ : Valor de p simulado

£: Valor de Referencia para el modelo de regresión logística

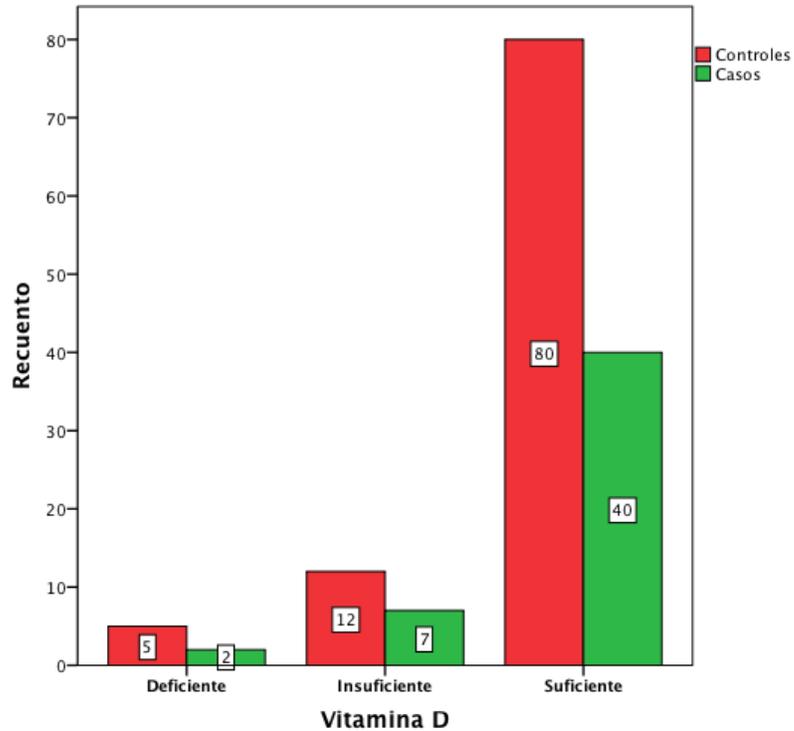
### 6.2.7 Asociación de los loci PTPN22, TNF, VDR y MHC.

A propósito de los niveles séricos de vitamina D, el 82.2% (n=120) del total de participantes en el estudio presentaron suficiencia de este heterolípido (30 – 100 ng/mL), exhibiéndose concentraciones similares entre los casos y controles (37.2 ng/mL  $\pm$  12.2 Vs 36.5 ng/mL  $\pm$  11.1;  $p=0.82$ ). De igual forma, no se observó diferencia significativa entre la proporción de casos con concentraciones insuficientes de esta vitamina (18.4% [n=9]) con relación a los controles (17.5% [n=17]) ( $p=0.90$ ) (Figura 6.2-1, 6.2-2).

Figura 6.2-1 Concentraciones séricas de vitamina D en individuos con NFIV.



**Figura 6.2-2 Concentración de vitamina D según valores de referencia.**



Posteriormente se estimó la asociación entre los polimorfismos evaluados y la vitamina D. De los loci PTPN22, TNF y VDR, el SNP *FokI* [rs2228570] de VDR se asoció con la i

nsuficiencia de esta vitamina, específicamente el genotipo homocigoto AA se comporta como un factor de riesgo para el desarrollo de insuficiencia vitamina D con un OR de 3.73 (95%IC: 1.05-13.2; p=0.002) a diferencia del homocigoto GG el cual se comportó como factor protector (**Tabla 6.2-11**)

**Tabla 6.2-11. Asociación de los loci PTPN22, TNF y VDR con la vitamina D.**

		Insuficiencia de Vitamina D		Suficiencia de Vitamina D		OR	95% IC	Valor de p $\neq$
		n=26	%	n=120	%			
<b>PTPN22</b>								
<b>rs2476601</b>								
	AA	0	0,0	0	0,0	---	---	
	AG	2	92,3	5	4,2	1,91	0,03 - 10,4	0,47
	GG	24	7,7	115	95,8	0,5	0,09 - 2,8	
<b>TNF</b>								
<b>rs1800629</b>								
	AA	1	3,8	2	1,7	2,5	0,2 - 28,9	
	AG	5	19,2	18	15,0	1,3	0,4 - 4,17	0,68
	GG	20	76,9	100	83,3	0,4	0,03 - 4,6	
<b>rs361525</b>								
	AA	0	0,0	2	1,7	---	---	
	AG	3	11,5	13	10,8	1,05	0,2 - 3,9	0,67
	GG	23	88,5	105	87,5	---	---	
<b>VDR</b>								
<b>rs2228570</b>								
	AA	6	23,1	15	12,5	<b>3,73</b>	<b>1,05 - 13,2</b>	
	AG	14	53,8	49	40,8	2,6	0,95 - 7,4	<b>0,02**</b>
	GG	6	23,1	56	46,7	<b>0,26</b>	<b>0,07 - 0,95</b>	
<b>rs7975232</b>								
	AA	6	23,1	35	29,2	0,68	0,18 - 2,5	
	AC	15	57,7	65	54,2	0,92	0,29 - 2,8	0,80
	CC	5	19,2	20	16,7	1,45	0,3 - 5,39	
<b>rs731236</b>								
	AA	14	53,8	64	53,3	0,87	0,16 - 4,5	
	AG	10	38,5	48	40	0,83	0,15 - 4,5	0,97
	GG	2	7,7	8	6,7	1,14	0,2 - 5,9	
<b>rs1544410</b>								
	CC	14	53,8	65	54,2	0,57	0,13 - 2,4	
	CT	9	34,6	47	39,2	0,51	0,11 - 2,3	0,69
	TT	3	11,5	8	6,7	1,74	0,41 - 7,4	

$\neq$ : Razón de verosimilitud de Chi<sup>2</sup>.

\*\* : Valor de p <0,05 con corrección de Bonferroni.

El análisis por haplotipos no mostró asociación entre los sistemas TNF-MHC y VDR con la vitamina D (Tabla 6.2.12)

**Tabla 6.2-12. Frecuencias haplotípicas de los loci TNF-HLA y su asociación con la vitamina D.**

HLA C	HLA B	TNF		HLA DRB1	HLA DQB1	Frecuencia Haplotípica (%)	Frecuencia Haplotípica (%)	Frecuencia Haplotípica (%)	Haplo-Score	Valor de p <sup>¥</sup>	Valor de p Simulado <sup>§</sup>
		rs1800629	rs361525				Suficiente	Insuficiente			
*02	*27	G	G	*0701	*0202	1,03%	1,55%	---	-2,40	<b>0,01**</b>	<b>0,03**</b>
*04	*35	G	G	*1501	*0602	1,03%	1,55%	---	-2,35	<b>0,01**</b>	<b>0,01**</b>
*07	*08	A	G	*0301	*0201	2,40%	---	6,12%	-1,93	0,05	0,06
*04	*35	G	G	*1602	*0301	1,03%	---	2,04%	-1,54	0,12	0,13
*03	*40	G	G	*0407	*0302	1,71%	---	3,06%	-0,78	0,44	0,43
*04	*35	G	G	*0404	*0302	1,03%	1,03%	---	-0,02	0,98	0,98
*07	*07	G	G	*1501	*0602	3,08%	0,52%	7,14%	-0,02	0,99	0,98
*07	*39	G	G	*0411	*0302	1,03%	1,03%	---	0,37	0,71	0,68
*04	*44	G	G	*0701	*0202	1,37%	1,55%	---	0,39	0,69	0,68
*04	*35	G	G	*0101	*0501	2,06%	3,09%	---	0,65	0,52	0,50
*01	*27	G	G	*0103	*0301	1,03%	1,55%	---	1,05	0,29	0,28
*03	*40	G	G	*0411	*0302	1,03%	2,06%	---	1,41	0,16	0,17
*04	*35	G	G	*1401	*0503	1,03%	0,52%	---	1,61	0,11	0,11

¥: Valor de p empírico.

§: Valor de p simulado

**Tabla 6.2-13. Frecuencias haplotípicas del locus VDR y asociación con la vitamina D.**

rs731 236	rs7975 232	rs1544 410	rs2228 570	Frecue ncia Haplotí pica (%)	Frecue ncia Haplotí pica (%) Suficie nte	Frecue ncia Haplotí pica (%) Insufici ente	Haplo- Score	Val or de p $\text{¥}$	Valor de p Simula do $\text{§}$
G	A	T	A	10,72%	9,98%	10,55%	-1,897	0,0 58	0,052
G	A	T	G	12,67%	13,10%	13,84%	-0,462	0,6 44	0,632
A	C	C	A	17,06%	13,79%	25,55%	-0,416	0,6 78	0,698
A	C	C	G	25,45%	30,00%	15,04%	0,006	0,9 95	0,996
G	A	C	G	1,71%	0,59%	4,04%	0,204	0,8 38	0,835
A	A	C	A	7,09%	6,05%	8,78%	0,384	0,7 01	0,696
G	C	T	G	1,23%	1,65%	---	0,705	0,4 81	0,440
A	A	C	G	21,60%	23,36%	17,88%	1,330	0,1 84	0,174

$\text{¥}$ : Valor de p empírico.

$\text{§}$ : Valor de p simulado

### 6.3 PROYECTO III.

#### ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS VDR, TNF-ALFA PTPN22, MHC-DRB/DQB Y BIOMARCADORES SÉRICOS VITAMINA D Y ADIPOCINAS CON LA ACTIVIDAD CLÍNICA DE LA NEFRITIS LÚPICA EN ESCOLARES COLOMBIANOS.

Se realizó un estudio de casos y controles en 92 niños con diagnóstico de “Lupus eritematoso sistémico (LES) con endotipo de “Nefritis Lúpica” y 100 niños sanos. El promedio de edad fue de  $16,19 \pm 3,48$  años. La distribución de la enfermedad demostró ser dependiente del género, siendo más frecuente en niñas (78.26% [n=72] Vs 58% [n=58];  $p=0.004$ ). El diagnóstico de LES se estimó en un promedio de  $4.47 \pm 3.53$ , y en la actualidad los casos presentan un tiempo con el diagnóstico de LES de  $11.91 \pm 2.88$  años. Por otra parte, el 35.8% de los casos reportaron antecedentes familiares de enfermedad autoinmune (**Tabla 6-3-1**).

**Tabla 6.3-1. Descripción de la población de estudio.**

	Casos		Controles		p valor	OR	95%IC	General	
	n=92	%	n=100	%				n=192	%
<b>Sexo</b>									
	Masculino	20 21,74	42 42		<b>0,004*</b>	0,38	0,20 - 0,72	62	32,29
	Femenino	72 78,26	58 58			2,6	1,38 - 4,91	130	67,71
<b>Edad (años)</b>		$16,19 \pm 3,48$	$5,18 \pm 0,98$		<b>0,00*</b>			$10,07 \pm 5,99$	
<b>Debut de LES (años)</b>		$4,47 \pm 3,53$							
<b>Tiempo con Dx de LES (años)</b>		$11,91 \pm 2,88$							
<b>Antecedentes Familiares de EAI</b>		33 35,87							
<b>Antecedentes Personales de EAI</b>		35 38,04							

EAI: Enfermedad Autoinmune; LES: Lúpus Eritematoso Sistémico; Dx: Diagnóstico.

\*:  $p < 0.05$

### **6.3.1 Asociación de los SNP rs2476601 de PTPN22 como factor de riesgo al desarrollo de NLp.**

De los marcadores evaluados, el rs2476601 de *PTPN22* se encontró asociado con la susceptibilidad a Nefritis Lúpica en los sujetos de estudio. Por su parte, el genotipo homocigoto GG fue el de mayor frecuencia estando presente en el 90.6% de los individuos, mostrando una diferencia estadísticamente significativa en su distribución entre casos y controles. El genotipo AA no estuvo presente entre los controles mientras que el 4.35% de los casos portaban este genotipo. El genotipo AG se comporta como un factor de susceptibilidad para nefritis lúpica siendo más frecuente entre los casos (11.9% [n=11]) [OR: 5.23; 95%IC: 1.35-20.1;  $p=0.005$ ]. En cuanto a la distribución alélica, el alelo A fue el alelo de menor frecuencia con un 5.73% [2n=22] en toda la población de estudio; comportandose como un factor de riesgo para padecer nefritis lúpica reportando un OR de 8.29 (95% IC= 2.35 – 29.1;  $p=0.00$ ) a diferencia del alelo G el cual exhibió un comportamiento protector de la enfermedad, cuyo OR es de 0.12 (95% IC=0.03 - 0.42;  $p=0.00$ ). La distribución alélica de este SNP se encontró en equilibrio genético de Hardy Weinberg en el grupo control, a diferencia de los casos los cuales presentaron una desviación del equilibrio H-W (**Tabla 6.3-2**)

### **6.3.2 Estudio de asociación de los SNPs rs1800629 [A/G] y rs361525 [A/G] del gen del factor de necrosis tumoral (TNF) y los SNPs TaqI [rs731236 A/G], ApaI [rs7975232 A/C], BsmI [rs1544410 C/T] y FokI [rs2228570 A/G ] de gen VDR) con NLp.**

En cuanto a los SNPs de *TNF* y *VDR*, no se observó asociación estadística entre los genotipos o alelos de estos polimorfismos y la nefritis lúpica pediátrica a excepción del genotipo heterocigoto AC del SNP ApaI [rs7975232] el cual mostró un OR de 2.6 (95%IC: 1.2-5.3). Por otra parte, el grupo de casos se desviaron del equilibrio genético de Hardy Weinberg en el SNP rs1800629 de *TNF* (**Tabla 6.3-2**)

Tabla 6.3-2. Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs de PTPN22, TNF y VDR.

	General		H-W†	Casos		H-W†	Controles		H-W†	OR	95%IC	p valor ‡
	n=192	%		n=92	%		n=100	%				
<b>PTPN22 [rs2476601]</b>												
AA	4	2,08		4	4,35		---	---		---	---	
AG	14	7,29		11	11,96		3	3		<b>5,23</b>	<b>1,35 - 20,1</b>	<b>0,005*</b>
GG	174	90,63		77	83,70		97	97		1	---	
A	22	5,73	<b>0,0013*</b>	19	10,33	<b>0,0057*</b>	3	1,5	1,00	<b>8,29</b>	<b>2,35 - 29,1</b>	<b>0,00*</b>
G	362	94,27		165	89,67		197	98,5		<b>0,12</b>	<b>0,03 - 0,42</b>	
<b>TNF [rs361525]</b>												
AA	---	---		---	---		---	---		---	---	
AG	16	8,30		10	10,90		6	6		2,09	0,7 - 6,2	0,33
GG	176	91,70		82	89,10		94	94		0,47	0,16 - 1,41	
A	16	4,16	1,00	11	5,43	1,00	6	3	1,00	2,03	0,7 - 5,8	0,31
G	368	95,83		173	94,56		194	97		0,49	0,1 - 1,4	
<b>TNF [rs1800629]</b>												
AA	3	1,60		3	3,30		---	---		---	---	
AG	27	14,10		11	12,00		16	16		0,73	0,3 - 1,7	0,148
GG	162	84,40		78	84,80		84	84		1	---	
A	33	8,60	0,14	19	9,23	<b>0,024*</b>	16	8	1,00	1,11	0,5 - 2,3	0,71
G	351	91,40		165	90,76		184	92		0,89	0,4 - 1,8	
<b>FokI [rs2228570]</b>												
AA	38	19,80		18	19,60		20	20		1,41	0,6 - 3,2	
AG	95	49,50		51	55,40		44	44		1,24	0,5 - 2,6	0,206
GG	59	30,70		23	25,00		36	36		0,7	0,3 - 1,6	
A	171	44,53	1,00	89	47,28	0,40	84	42	0,41	1,23	0,8 - 1,8	0,29
G	213	55,46		95	52,71		116	58		0,8	0,5 - 1,2	
<b>Apal [rs7975232]</b>												
AA	55	28,94		18	20,00		37	37		0,47	0,2 - 1,11	
AC	93	48,94		51	56,70		42	42		<b>2,6</b>	<b>1,27 - 5,33</b>	<b>0,31</b>
CC	42	22,10		21	23,30		21	21		2,09	0,8 - 4,8	
A	203	53,42	0,88	87	48,33	0,290	116	58	0,215	0,66	0,4 - 1,01	0,6
C	177	46,57		93	51,66		84	42		1,49	0,9 - 2,2	
<b>TaqI [rs731236]</b>												
AA	101	52,60		46	50,00		55	55		0,62	0,2 - 1,8	
AG	75	39,10		37	40,20		38	38		1,27	0,6 - 2,37	0,693
GG	16	8,30		9	9,80		7	7		1,61	0,5 - 4,7	
A	277	72,13	0,72	130	69,56	0,80	148	74	1,00	0,78	0,4 - 1,2	0,363
G	107	27,86		54	30,43		52	26		1,28	0,8 - 2,0	
<b>BsmI [rs1544410]</b>												
CC	108	56,50		50	54,90		58	58		1,31	0,3 - 5,0	
CT	73	38,20		37	40,70		36	36		1,25	0,6 - 2,3	0,747
TT	10	5,20		4	4,40		6	6		0,75	0,1 - 2,9	
C	289	75,65	0,70	137	75,27	0,57	152	76	0,91	0,94	0,5 - 1,5	0,808
T	93	24,34		45	24,72		48	24		1,06	0,6 - 1,7	

†: Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

‡: Razón de verosimilitud de Chi<sup>2</sup>.

OR [95%IC]: Modelos de regresión logística ajustado por sexo.

### 6.3.3 Polimorfismos de los Loci HLA-DRB1 y HLA-DQB1 como factores de riesgo de Nefritis Lúpica Pediátrica.

Se observa que el alelo HLA-DQ\*O5O4 está presente solo en el grupo de casos, esto mismo ocurre con los alelos HLA-DR\*O1O3, \*O4O8, \*O5O1, \*O8O6, \*O8O7, \*O8O9, \*11O3, \*14O6, \*16O1. En cuanto al equilibrio de Hardy Weinberg la distribución alélica de HLA-DQ se encontraron en equilibrio, a diferencia de la frecuencia alélica de HLA-DR (Tabla 6.3-3, 6.3.4).

**Tabla 6.3-3. Frecuencias alélicas del locus HLA-DQB.**

HLA-DQ*	Casos		H-W†	Controles		H-W†	p valor ¥
	n=90	%		n=100	%		
O2O1	14	7,00		14	7,6		
O2O2	27	13,50		18	9,8		
O3O1	55	27,50		29	15,8		
O3O2	27	13,50		30	16,3		
O3O3	2	1,00		5	2,7		
O3O4	2	1,00		1	0,5		
O3O5	---	---		1	0,5		
O4O1	3	1,50		1	0,5		
O4O2	16	8,00		17	9,2		
O5O1	16	8,00	0,366	13	7,1	0,61	<b>0,043*</b>
O5O2	1	0,50		5	2,7		
O5O3	1	0,50		2	1,1		
O5O4	1	0,50		---	---		
O6O1	2	1,00		2	1,1		
O6O2	16	8,00		35	19,0		
O6O3	10	5,00		7	3,8		
O6O9	3	1,50		2	1,1		
O611	1	0,5		2	1,1		
O624	1	0,50					

†: Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

¥: Razón de verosimilitud de Chi2.

Tabla 6.3-4. Frecuencias alélicas de HLA-DRB1.

HLA-DR*	Casos		H-W†	Controles		H-W†	p valor ‡
	n=90	%		n=100	%		
O1O1	7	3,80		2	1,00		
O1O2	1	0,50		6	3,00		
O1O3	3	1,60		---	---		
O3O1	11	6,00		13	6,50		
O3O2	7	3,80		19	9,50		
O3O6	---	---		1	0,50		
O4O1	3	1,60		6	3,00		
O4O2	1	0,50		4	2,00		
O4O3	1	0,50		1	0,50		
O4O4	12	6,50		4	2,00		
O4O5	---	---		6	3,00		
O4O7	12	6,50		5	2,50		
O4O8	1	0,50		---	---		
O410	1	0,50		1	0,50		
O411	1	0,50		10	5,00		
O412	---	---		1	0,50		
O418	---	---		1	0,50		
O5O1	1	0,50		---	---		
O7O1	21	11,40		26	13,00		
O8O1	1	0,50		4	2,00		
O8O2	13	7,10		5	2,50		
O8O3	1	0,50		---	---		
O8O4	2	1,10		10	5,00		
O8O6	1	0,50		---	---		
O8O7	1	0,50		---	---		
O8O9	1	0,50		---	---		
O9O1	3	1,60		3	1,50		
10O1	2	1,10		5	2,50		
11O1	9	4,90		12	6,00		
11O2	2	1,10		2	1,00		
11O3	1	0,50		---	---		
11O4	3	1,60		3	1,50		
12O1	---	---		3	1,50		
13O1	8	4,30		13	6,50		
13O2	3	1,60		5	2,50		
13O3	4	2,20		3	1,50		
13O4	---	---	0,145	1	0,50	0,007*	0,00*
14O1	2	1,10		3	1,50		
14O2	5	2,70		4	2,00		
14O6	1	0,50		---	---		
15O1	26	14,10		3	1,50		
15O2	---	---		1	0,50		
15O3	6	3,30		7	3,50		
16O1	2	1,10		---	---		
16O2	4	2,20		7	3,50		

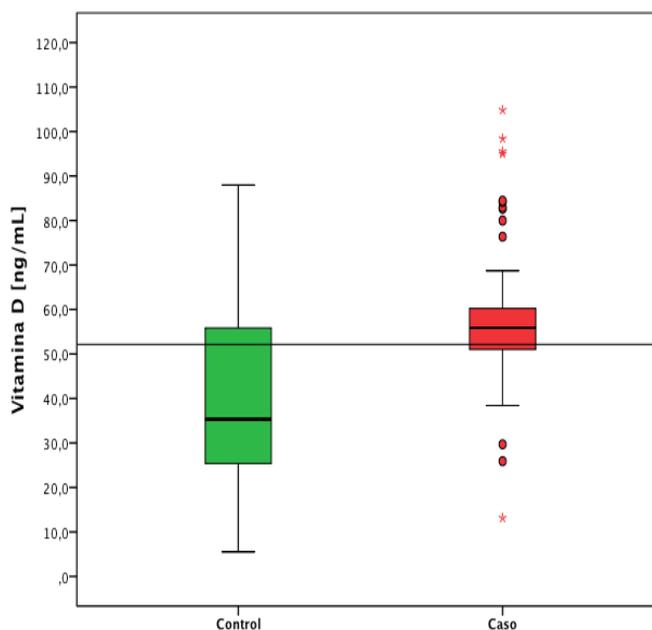
†: Test de Equilibrio de Hardy-Weinberg, mejorado con 100.000 pasos de la cadena Markov.

¥: Razón de verosimilitud de Chi2.

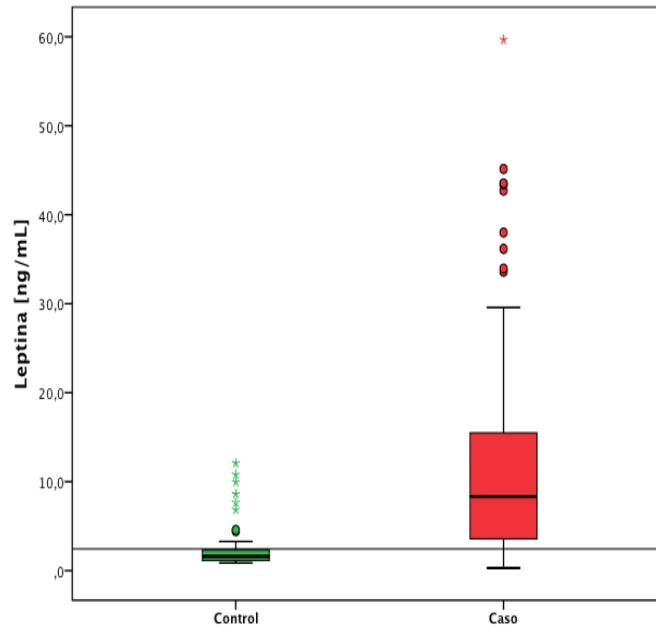
### 6.3.4 Estudio de Biomarcadores séricos en los pacientes con NLp.

En el presente estudio también se analizaron las concentraciones plasmáticas de biomarcadores séricos como la vitamina D, Leptina, adiponectina y autoanticuerpos nefrofilicos. Como se puede observar en la **(Figura 6-5, 6-6, 6-7)** el grupo de casos presentan concentraciones mayores de vitamina D, leptina y adiponectina (57.2 ng/mL; 11.9 ng/mL y 15.8 µg/mL; respectivamente) en comparación a los controles, mostrando una diferencia estadísticamente significativa. Por otra parte, entre los casos, el 3.85% son negativos a autoanticuerpos anti-dsDNA, 5.13% anti-SM, 93.5% anti-P ribosomal y 71.7% anti-RNP. Por su parte el 100% de los casos son positivos para anti-C1q **(Tabla 6.3-5)**.

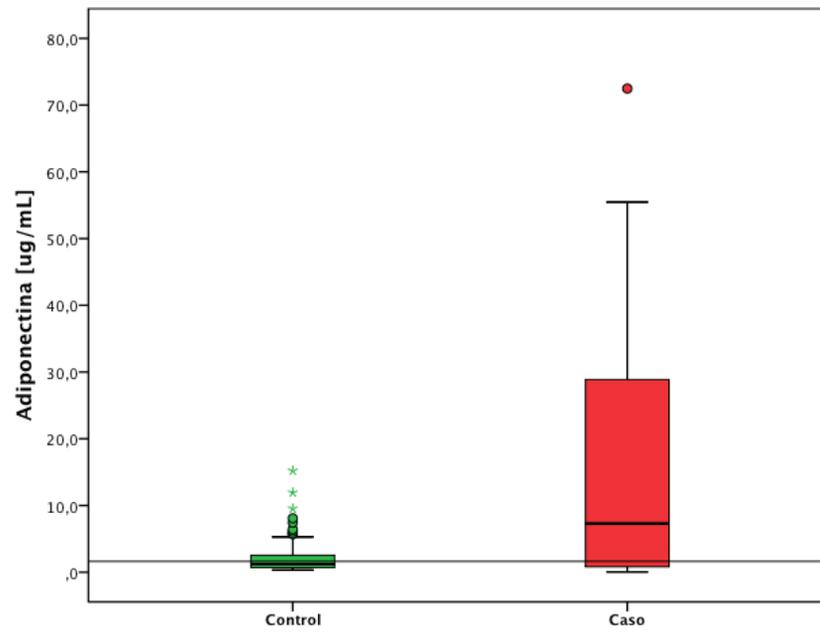
**Figura 6.3-1 Vitamina D en niños con NLp.**



**Figura 6.3.2 Leptina en niños con NLp.**



**Figura 6.3.3 Adiponectina en niños con NLp.**



**Tabla 6.3-5. Concentraciones de biomarcadores séricos.**

	Casos			
	n=78	%	Media [UI/mL]	DE
<b>Anti - dsDNA</b>			537,73	272,42
	Negativo	3	3,85	
	Positivo débil	9	11,54	
	Positivo moderado	53	67,95	
	Positivo fuerte	13	16,67	
<b>Anti – SM</b>			43,12	26,40
	Negativo	4	5,13	
	Positivo débil	43	55,13	
	Positivo moderado	21	26,92	
	Positivo fuerte	10	12,82	
<b>Anti - C1q</b>			181,54	203,53
	Negativo	---	---	
	Positivo débil	---	---	
	Positivo moderado	15	19,23	
	Positivo fuerte	63	80,77	
<b>Anti - P ribosomal</b>			17,22	85,53
	Negativo	73	93,59	
	Positivo débil	---	---	
	Positivo moderado	2	2,56	
	Positivo fuerte	3	3,85	
<b>Anti – RNP</b>			28,98	42,52
	Negativo	56	71,79	
	Positivo débil	3	3,85	
	Positivo moderado	6	7,69	
	Positivo fuerte	13	16,67	

¥: U de Mann–Whitney test

Por otra parte, de todos los polimorfismos evaluados, solo el SNP rs2476601 de *PTPN22* fue el único cuyos alelos y genotipos se asociaron con los biomarcadores séricos antes mencionados. El alelo A se asoció con concentraciones mayores de Vitamina D [ $59.7 \pm 19.5$  ng/mL] y Leptina [ $9.96 \pm$

9.73 ng/mL] con relación al alelo G, mostrando diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.00$  y  $0.01$ , respectivamente). En cuanto a los auto-anticuerpos, este mismo alelo se asocia con títulos significativamente bajos de anti-SM [ $29.7 \pm 14.7$  UI/mL], anti-C1q [ $105.4 \pm 37.4$  UI/mL] y anti-P ribosomal [ $1.21 \pm 0.56$  UI/mL] a diferencia del alelo G (Tabla 6.3-6).

**Tabla 6.3-6. Asociación del locus PTPN22 con biomarcadores séricos.**

	Vitamina D [ng/mL]		p valor ¥	Leptina [ng/mL]		p valor ¥	Adiponectina [ug/mL]		p valor ¥
	Media	DE		Media	DE		Media	DE	
<b>rs2476601</b>									
AA	69,28	24,14		8,42	6,02		14,50	16,57	
AG	54,30	16,04	0,07	10,84	11,57	0,08	8,79	14,11	0,90
GG	47,60	19,06		6,49	9,68		8,24	13,81	
A	59,74	19,50	<b>0,008*</b>	9,96	9,73	<b>0,010*</b>	11,07	14,50	0,77
G	47,86	18,95		6,66	9,76		8,26	13,78	
	<b>Anti - dsDNA [UI/mL]</b>			<b>Anti - SM [UI/mL]</b>			<b>Anti - C1q [UI/mL]</b>		
AA	389,41	294,33		28,59	20,86		85,24	15,05	
AG	497,00	261,82	0,50	31,09	8,13	0,21	128,46	43,46	0,10
GG	550,84	273,37		45,24	27,47		192,83	217,16	
A	439,62	263,80	0,15	29,76	14,71	<b>0,031*</b>	105,41	37,48	<b>0,014*</b>
G	548,17	271,18		44,54	26,90		189,64	211,52	
	<b>Anti - P Ribosomal [UI/mL]</b>			<b>Anti - RNP [UI/mL]</b>					
AA	0,96	0,37		10,77	15,01				
AG	1,49	0,64	<b>0,044*</b>	3,20	1,41	0,12			
GG	19,84	92,12		32,76	44,65				
A	1,21	0,56	<b>0,002*</b>	7,24	10,62	0,05			
G	18,93	89,54		31,29	43,84				

¥: Kruskal Wallis y U de Mann-Whitney

### **6.3.5 Análisis por haplotipos de los loci VDR y TNF-HLA como factor de riesgo de Nefritis lúpica pediátrica.**

A partir del análisis de haplotipos de los SNPs genotipificados de *VDR*, se obtuvieron 15 combinaciones posibles de estos. Para la estimación de riesgo se excluyeron aquellos con una frecuencia menor al 1%. Como haplotipo de referencia se tomó al haplotipo *A/C/C/A* [*TaqI*/*ApaI*/*BsmI*/*FokI*] por ser el haplotipo más común (21%). Se observó que el haplotipo *A/A/C/G* se comporta como un posible factor protector debido a su distribución en el 12.9% de los casos ( $p: 0.028$  y  $Psim: 0.026$ ) (**Tabla 6-3-7**).

En cuanto a los loci TNF-HLA, se observaron 103 combinaciones posibles, sin embargo para el análisis de estimación de riesgo se incluyeron 14 haplotipos TNF-HLA. Tomando como referencia al haplotipo *G/G/DR\*O7O1/DQ\*O2O2* (rs1800629/rs361525/DR\*/DQ\*) se observaron los haplotipos *G/G/DR\*O411/DQ\*O3O2* y *G/G/DR\*O8O4/DQ\*O3O1* como posibles factores protectores dada su distribución significativamente menor entre el grupo de casos. Caso contrario ocurre con el haplotipo *G/G/DR\*O4O4/DQ\*O3O2* el cual podría comportarse como factor de riesgo debido a que el 5.4% de los casos portan este haplotipo. Sin embargo, el haplotipo *G/G/DR\*15O1/DQ\*O6O2* se comporta como como factor de riesgo con un OR de 9.42 (95% IC=2.1-40.8;  $Psim=0.00$ ) (**Tabla6.3-7**).

**Tabla 6.3-7. Asociación de haplotipos de los loci VDR y TNF-HLA como factores de riesgo de Nefritis lúpica pediátrica.**

<i>TaqI</i> [rs731236]	<i>Apal</i> [rs7975232]	<i>BsmI</i> [rs1544410]	<i>FokI</i> [rs2228570]	Frec. Haplotípica (%) General	Frec. Haplotípica (%) Controles	Frec. Haplotípica (%) Casos	Valor de <i>p</i> ‡	Valor de <i>p</i> Simulado§	OR	95% IC
A	C	C	A	21%	19,24%	23,46%	0,35	0,35	1	
A	A	C	G	15%	18,57%	12,90%	<b>0,028*</b>	<b>0,026*</b>	0,49687	0,2 - 1,1
G	A	C	G	2%	4,37%	2,02E-08	0,14	0,15	0,4228	0,0 - 2,1
A	A	C	A	13%	13,45%	12,27%	0,68	0,69	1,08164	0,4 - 2,5
G	A	T	G	14%	12,94%	13,90%	0,75	0,79	1,07744	0,4 - 2,4
G	C	C	A	3%	2,08%	2,67%	0,37	0,38	1,7463	0,4 - 6,1
A	C	C	G	20%	17,95%	19,75%	0,27	0,29	1,57287	0,6 - 3,6
G	A	T	A	6%	4,63%	8,13%	0,19	0,21	1,82403	0,5 - 6,4

TNF		HLA DRB1	HLA DQB1	Frecuencia Haplotípica (%) General	Frecuencia Haplotípica (%) Controles	Frecuencia Haplotípica (%) Casos	Valor de <i>p</i> ‡	Valor de <i>p</i> Simulado§	OR	95% IC
rs1800629	rs361525									
G	G	O7O1	O2O2	10,4%	12,5%	6,9%	0,19	0,19	1,00	£
G	G	O411	O3O2	2,3%	4,0%	0,5%	<b>0,023*</b>	<b>0,038*</b>	0,12	0,0 - 1,2
G	G	O8O4	O3O1	2,6%	5,0%	1,1%	0,07	<b>0,047*</b>	0,33	0,0 - 2,2
G	G	13O1	O6O3	3,2%	4,5%	1,2%	0,09	0,11	0,54	0,1 - 2,6
G	G	O3O2	O3O1	4,7%	6,5%	2,7%	0,09	0,10	0,66	0,1 - 2,5
G	G	16O2	O3O1	2,3%	3,5%	1,6%	0,37	0,36	0,60	0,1 - 3,4
G	G	11O1	O3O1	2,9%	2,5%	2,2%	0,43	0,53	0,97	0,2 - 4,4
G	G	15O3	O6O2	2,3%	3,0%	2,2%	0,83	1,00	1,60	0,3 - 7,8
G	G	O3O1	O2O1	2,0%	2,3%	2,2%	0,93	0,94	1,25	0,1 - 8,5
G	G	14O2	O3O1	2,1%	1,5%	2,2%	0,90	0,94	0,98	0,1 - 5,3
G	G	O4O7	O3O2	4,2%	2,5%	6,0%	0,10	0,11	2,14	0,5 - 8,9
G	G	O8O2	O4O2	3,9%	2,0%	6,4%	0,06	0,08	4,96	1,1 - 21,7
G	G	O4O4	O3O2	3,4%	1,5%	5,4%	<b>0,044*</b>	<b>0,039*</b>	4,33	0,9 - 20,3
<b>G</b>	<b>G</b>	<b>15O1</b>	<b>O6O2</b>	<b>5,2%</b>	<b>1,5%</b>	<b>11,0%</b>	<b>0,000*</b>	<b>0,000*</b>	<b>9,42</b>	<b>2,1 - 40,8</b>

‡: Valor de *p* empírico. §: Valor de *p* simulado. £: Valor de Referencia para el modelo de regresión logística



## 7. DISCUSIÓN

El LES es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida y mecanismos fisiopatológicos que a la fecha no están bien definidos. En esta entidad existe una carga genética y una heredabilidad, que unido a componentes multifactoriales, tales como la influencia hormonal y factores ambientales conllevan a caracterizarla como el prototipo de una enfermedad compleja multigénica. La entidad compromete múltiples órganos expresándose de diferentes formas clínicas: fenotipos y endotipos.

Existen en la literatura abundantes estudios que fundamentan y muestran la influencia de varios sistemas genéticos en la susceptibilidad al LES. Dentro los sistemas genéticos más relevantes están: el sistema MHC, el gen *VDR*, el gen *PTPN22* y el gen *TNF* (9).

Estudios previos han demostrado que tanto la vitamina D como su receptor, denominado receptor de la vitamina D3 y por ende las variantes genéticas del gen *VDR*, inmunomodulan respuestas inflamatorias y regulan diversos efectos sobre células inmunocompetentes, fenómenos descritos en el LES (95, 96, 101).

Los estudios hasta la fecha llevados a cabo en poblaciones europeas, norteamericanas y asiáticas han demostrado niveles más bajos de vitamina D en pacientes con LES cuando se comparan con sujetos controles sanos lo que sugiere que la deficiencia de vitamina D puede ser un factor de riesgo para el desarrollo del LES. La mayoría de los estudios que han documentado una asociación entre una mayor actividad de la enfermedad y niveles bajos o deficientes de vitamina D, no han incluido pacientes provenientes del cinturón del trópico, y son escasos aquellos llevados a cabo en pacientes de grupos multiétnicos. Hasta la fecha, el significado fisiopatológico y clínico de la deficiencia de vitamina D en el LES sigue siendo todavía incierto (81).

Aunque los estudios que han investigado la asociación entre los polimorfismos de los SNPs del gen *VDR* con el riesgo a desarrollar LES muestran significancia

estadística para varios de estos SNPs los resultados de varias meta-análisis llevados a cabo en los últimos 5 años son poco concluyentes.

Uno de ellos, llevado a cabo por Xiong y colaboradores, que incluyó un total de 1298 pacientes y 1563 controles sanos representados en 11 estudios de casos y controles, mostró que los polimorfismos de BsmI y FokI, se asociaron con un incremento al desarrollo de LES en contraste con ApaI y TaqI, los cuales no se asociaron. Cabe resaltar que los estudios involucrados en este meta-análisis se hicieron en grupos étnicos Asiáticos y ninguno de ellos en grupos caucásicos, americanos y afrodescendientes (147).

Otro de estos meta-análisis, publicado por Young Ho Lee y colaboradores en el 2011, validó los resultados anteriores; nuevamente en poblaciones Asiáticas Los autores en esta publicación comentan que sus resultados deben ser interpretados con limitaciones debido al escaso número de estudios que se involucraron en su meta-análisis. Sus resultados sugieren que los polimorfismos del SNP VDR-FokI no confieren susceptibilidad en grupos étnicos europeos para LES. En esta misma población estos autores encontraron asociación entre los polimorfismos de los SNPs VDR-BsmI y la susceptibilidad a LES en poblaciones asiáticas. Los autores enfatizan que, el análisis de haplotipos en estudios posteriores, pudieran proveer una mayor información y presentar un mayor poder estadísticos que los polimorfismos de los SNPs. Así mismo, resaltan que sus resultados no se pueden extrapolar a grupos étnicos diferentes de los europeos y asiáticos, estos investigadores resaltan la necesidad de explorar estas asociaciones del gen *VDR* con LES, en diferentes grupos étnicos (100).

Más recientemente, otro meta-análisis, publicado en el 2014 por Mao S, Huang S que involucro un total de 11 estudios, representando 1621 casos y 1883 controles, mostro una asociación del alelo A del BsmI con el LES en asiáticos. El genotipo homocigótico AA del SNP-VDR FokI se asoció con factor de riesgo en la misma población. Estos autores no encontraron ninguna asociación significativa para los

SNPs Apal y Taql en ninguna de las poblaciones estudiadas: asiáticos y caucásicos (148).

Estudios previos a los meta-análisis descritos anteriormente mostraron una asociación del genotipo AA del BsmI en pacientes japoneses con nefritis lúpica, en los cuales a su vez, este genotipo se asoció con la presencia de anticuerpos antinucleares y anticuerpos anti-DNA en estos pacientes (96).

En 2011, un estudio canadiense analizó 25 pacientes con LES y 25 con fibromialgia y no encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa en los niveles de 25(OH)D<sub>3</sub> entre los grupos (18,6 frente a 20,6 ng/ml,  $p>0,05$ ), incluso después del ajuste por edad (89). Pocos estudios han examinado los niveles de vitamina D en los niños y adolescentes con LES. Uno de estos estudios midió 25(OH)D<sub>3</sub> en sujetos de 5 a 21 años y 207 controles sanos, niveles muy bajos de 25 (OH) D<sub>3</sub>, (definida por los autores como menos de 10 ng/ml) se encontraron significativamente más frecuentes en los pacientes con Les que en los controles (36,8 frente a 9,2 %,  $p<0,001$ ) (90).

Con respecto a la asociación del polimorfismo de los SNPs del gen TNF y LES, los resultados descritos en la literatura no solo son contradictorios sino diferentes cuando se analizan entre diferentes grupos étnicos. Se ha encontrado una asociación en pacientes caucásicos con LES y alelos del SNP del TNF (-308), tanto en la presencia como en la actividad de la enfermedad (126). A diferencia, en otros trabajos, no se encontró asociación entre esta enfermedad y el polimorfismo -308 de TNF $\alpha$  (12).

En población hispana, el alelo A del SNP -308G/A mostró asociación con susceptibilidad a LESp; más aún, cuando se estratificó por género, este alelo mostró una fuerte asociación con susceptibilidad a LES pediátrica. Por otro lado, el

polimorfismo -238G/A del TNF- $\alpha$  también mostró asociación con LES en la población mexicana (127).

Los estudios de asociación entre variantes SNPs de sistemas genéticos con la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades complejas, en grupos poblacionales multiétnicos, con una estructura genética compleja, pueden mostrar resultados de difícil interpretación. Tal es el caso de los estudios de esta índole en poblaciones latinoamericanas. La composición genética actual de la población de América Latina esta moldeada en la historia por una mezcla entre africanos, europeos y los nativos americanos; un proceso que tiene lugar en el contexto de una amplia estratificación geográfica y social. En la actualidad existe un considerable número de estudios genéticos que han examinado esta mezcla genética. La estructura genética de la comunidad hispana y/o latinoamericana explica las diferencias de las frecuencias alélicas de los diferentes sistemas entre los diversos grupos étnicos que la representan y pueden interferir con los estudios de asociación con las enfermedades. Esta estructura incluye a la población colombiana. En los que respecta a los niveles de adipocinas y a su asociación con LES, los resultados de los estudios que evalúan la concentración de leptina en el plasma de los pacientes con LES, son generalmente consistentes e indican que los niveles de leptina sérica se encuentran elevados y pueden contribuir a la inflamación sistémica en los pacientes con LES. Un estudio llevado a cabo por Harle et al, encontró una asociación significativa con el LES mientras que Wislowska no encontró diferencias en los niveles de leptina entre pacientes con LES y sujetos sanos.

En los que respecta a los niveles de adipocinas y a su asociación con LES, los resultados de los estudios que evalúan la concentración de Leptina en el plasma de los pacientes con LES, son generalmente consistentes e indican que los niveles de Leptina sérica se encuentran elevados y pueden contribuir a la inflamación sistémica en los pacientes con LES. Un estudio llevado a cabo por Harle et al, encontró una asociación significativa con Les , mientras que

Wislowska no encontró diferencias en los niveles de leptina entre pacientes con LES y sujetos sanos (134, 135).

En lo que respecta a la adiponectina, Sada et al (136), encontraron que los niveles séricos de adiponectina estuvieron significativamente elevados en LES en comparación con los controles sanos, y observaron niveles más bajos de adiponectina en pacientes con lesión renal en comparación con los sujetos sin compromiso renal. El aumento de las concentraciones plasmáticas de adiponectina en pacientes con LES también fueron observados por Chung et al (129). Los niveles de adiponectina en orina han sido descritos como elevados. Es de destacar el hecho de que la isoforma de adiponectina HMW recientemente se ha encontrado elevada en la orina de pacientes con nefritis y lupus activo, pero no en la orina de los individuos sanos, y su contenido se correlaciona con la gravedad del lupus (136, 137).

Los resultados obtenidos en esta tesis son coherentes con los descritos en la literatura. Para el polimorfismo de alelos y genotipos del SNP VDR-Bsl en los 3 endotipos estudiados hubo significancia estadísticas mostrándose, estos marcadores genéticos como factores de riesgo para LES. Para los otros sistemas genéticos que se estudiaron, se encontró que el SNP rs2476601 del PTPN22 se asoció con la susceptibilidad a la enfermedad y a los endotipos de nefritis lúpica tanto en niños como adultos. Se encontraron otras asociaciones significativas que se presentaran en los endotipos de nefritis lúpica para los sistema MHC y TNF, sin embargo el eso número de sujetos que expresaron estos polimorfismos obliga a considerar que estos resultados, podrían cambiar al aumentar el número de sujetos de estudio.

En lo que respecta a los niveles séricos de vitamina D los resultados obtenidos son controvertidos en relación a lo descrito en la literatura. Se destaca que no se encontró deficiencia de niveles séricos de vitamina D en ninguno de los 3 endotipos estudiados.

En el estudio de los adultos con LES sin daño renal, se encontró que tanto los casos y controles mostraron niveles séricos de Vitamina D en niveles normales. En nuestro estudio, y al contrario lo observado en otros estudios los casos presentaron niveles significativamente mayores, en comparación a los controles.

El principal inconveniente de este estudio se refiere a la falta de control sobre factores que pudieron haber modulado la síntesis de vit D, tales como: la actividad física de los sujetos, la dieta, la duración de la exposición al aire libre y por lo tanto a la luz del sol, factores que regulan la homeostasis de la vitamina D. Cohortes prospectivas son necesarias para abordar con precisión las influencias de estos factores de confusión sobre los niveles de vitamina D en pacientes con LES en grupos poblacionales multiétnicos similares a nuestra población triétnica. Es también necesario resaltar que todos nuestros sujetos tuvieron características socioeconómicas, clínicas y estilos de vida similares y fueron reclutados siempre por el mismo equipo de investigadores.

En este mismo grupo, el SNP *VDR FokI* se asoció con LES a nivel de alelos. La distribución genotípica de este polimorfismo muestra al genotipo AA en un 18% (n=20) de los casos a diferencia de los controles (12%; n=12), seguido por el heterocigoto AG en el 45.9% (n=51) de los casos y 37% (n=37) de los controles; en cuanto a GG el 36% (n=40) de los casos portaron este genotipo mientras que en los controles fue del 51% (n=51) (p=0.08). En cuanto a la distribución alélica, el alelo A se portó como un factor de riesgo para LES [OR: 1.58; 95%IC: 1.05 - 2.36] (p=0.025). la distribución alélica de este SNP se encontró en equilibrio genético de Hardy Weinberg tanto en casos como en controles

El alelo A del SNP *FokI* del gen *VDR* se mostró como factor de riesgo para LES.

En cuanto a los alelos HLA clase II, se observó que los alelos HLA DRB1\*03 y \*15 se mostraron como factores de riesgo para LES.

El análisis por haplotipo demostró que en el locus *VDR*, el haplotipo A/C/C/A [*TaqI*-*ApaI*-*BsmI*-*FokI*] se comporta como un factor de riesgo para LES [OR: 2.28; 95%IC: 1.12 - 4.66] ( $p=0.0$  y  $P_s=0.00$ ).

En cuanto a los haplotipos de HLA clase II, los haplotipos HLA DRB1\*0701 /DQB1\*0201 y DRB1\*0411 / DQB1\*0302 se mostraron como factores protectores.

Con relación a la vitamina D, no se observó asociación con los loci de PTPN22 y *VDR*.

Solo HLA DRB1\*16 se mostró como factor de riesgo para la insuficiencia de vitamina D.

Es necesario destacar que a pesar de que tanto los alelos de los casos y de los controles se encontraron en equilibrio de Hardy Weinberg, que los sujetos todos pertenecen al mismo grupo multiétnico que no se encontraron relacionados genéticamente mostrando una selecta escogencia de estos controles, estos resultados deben ser analizados y tomados con cautela, en razón al número de sujetos del estudio.

Con relación a los datos obtenidos en el análisis de asociación del polimorfismo de las variantes genéticas de los sistemas estudiados y de los biomarcadores trabajados en el endotipo nefritis lúpica del adulto, se encontró que con relación a los niveles séricos de vitamina D, el 82.2% ( $n=120$ ) de los participantes presentaron suficiencia de este heterolípido (30 – 100 ng/mL), exhibiéndose concentraciones similares entre los casos y controles ( $37.2 \text{ ng/mL} \pm 12.2$  Vs  $36.5 \text{ ng/mL} \pm 11.1$ ;  $p=0.82$ ).

En relación con la asociación de los SNPs del PTPN22 con este endotipo se observó una frecuencia significativamente mayor del genotipo AG en los casos (12.2% [ $n=6$ ]) a diferencia de los controles (1% [ $n=1$ ]), con un OR de 13.4 (95% IC

= 1.56-114;  $p=0.018$ ) teniendo como referencia el genotipo GG. Este último exhibió una frecuencia superior en los individuos sanos (99% [n=96]) en comparación con los sujetos enfermos (87.8% [n=43]), mostrándose como un factor protector para la presencia de la enfermedad, con un OR de 0.8 (95% IC=0.0-0.63;  $p=0.018$ ). Por otra parte, el genotipo AA no se expresó en esta población.

También se obtuvo una frecuencia significativamente mayor del genotipo AG en los casos (12.2% [n=6]) a diferencia de los controles (1% [n=1]), con un OR de 13.4 (95% IC = 1.56-114;  $p=0.018$ ) teniendo como referencia el genotipo GG. Este último exhibió una frecuencia superior en los individuos sanos (99% [n=96]) en comparación con los sujetos enfermos (87.8% [n=43]), expresándose como un factor protector para la presencia de la enfermedad, con un OR de 0.8 (95% IC=0.0-0.63;  $p=0.018$ ). Por otra parte, el genotipo AA no se encontró reportado en esta población .

Los datos encontrados en nuestro estudio relacionado con el endotipo nefritis lúpica pediátrica muestran que entre los casos y controles, los niveles séricos de Vitamina D presentan niveles significativamente mayores, en comparación a los controles.

El SNP rs2476601 del locus *PTPN22* se encontró asociado con la susceptibilidad a Nefritis Lúpica en los niños con NLp Clase IV estudiados. El genotipo con mayor frecuencia del SNP rs2476601 de *PTPN22* fue el GG con un 90.6% en la muestra general de individuos. Al comparar las frecuencias genotípicas entre el grupo de casos y controles, se observó que el genotipo AA se encuentra presente solo entre los casos con una frecuencia del 4.35%. Mientras que el genotipo AG se comporta como un factor de protección para nefritis lúpica siendo más frecuente entre los casos (11.9% [n=11]) [OR: 5.23; 95%IC: 1.35-20.1;  $p=0.005$ ). En cuanto a la distribución alélica, el alelo A fue el alelo de menor frecuencia en la población en general con un 5.73% [2n=22]; en el grupo de casos este alelo presentó una frecuencia del 10.33% [2n=19], en comparación a los controles 1.5% [2n=3]). Este

alelo se comporta como un factor de riesgo para padecer nefritis lúpica reportando un OR de 8.29 (95% IC= 2.35 – 29.1;  $p=0.00$ ). Mientras que el alelo G exhibió un comportamiento protector de la enfermedad, cuyo OR es de 0.12 (95% IC=0.03 - 0.42;  $p=0.00$ ); la distribución alélica de este SNP se encontró en equilibrio genético de Hardy Weinberg tanto en casos como en controles (Tabla 12).

Por otra parte, de todos los polimorfismos evaluados, solo el SNP rs2476601 de *PTPN22* fue el único cuyos alelos y genotipos se asociaron con los biomarcadores séricos antes mencionados. El alelo A se asoció con concentraciones significativamente elevadas de Vitamina D [ $59.7 \pm 19.5$  ng/mL], Leptina [ $9.96 \pm 9.73$  µg/mL] y adiponectina [ $11.07 \pm 14.5$  µg/mL].

El SNP *FokI* o rs2228570, exhibió una frecuencia significativamente mayor del genotipo AA en los casos (18.4% [n=9]) a diferencia de los controles (12.4% [n=12]), con un OR de 3.47 (95% IC = 1.17-10.2;  $p=0.024$ ). Al contrario de esto, el genotipo GG demostró una frecuencia superior en los individuos sanos (52.6% [n=51]) en comparación con los sujetos enfermos (22.4% [n=11]), siendo un factor protector contra la enfermedad, con un OR de 0.28 (95% IC=0.09-0.84;  $p=0.024$ ) (Tabla 4).

En cuanto a los alelos de HLA clase II, se observó que los alelos HLA DRB1\*03 y \*15 se mostraron como factores de riesgo para LES.

Con relación a los niveles séricos de vitamina D, se observó asociación con los SNPs de los loci de *PTPN22* y *VDR*.

En la presente tesis se analizaron las concentraciones plasmáticas de los biomarcadores Leptina, adiponectina y autoanticuerpos nefrofilicos. En el endotipo NLp, el grupo de casos presentan concentraciones elevadas de leptina y adiponectina (11.9 µg/mL y 15.8 µg/mL; respectivamente) en comparación a los controles, mostrando una diferencia estadísticamente significativa. Con relación a los autoanticuerpos ,solo el 3.85% de los casos estudiados fueron negativos para anti-dsDNA y el 5.13% para anti-SM también fueron negativos. Se destaca que el

100% de los casos resulto positivos para anti-C1q. Contrario al comportamiento para aquellos , los anticuerpos anti-P ribosomal y anti-RNP fueron negativos en la mayoría de los sujetos de este estudio.

## **8. CONCLUSIONES**

**1.-** El desarrollo de los tres proyectos antes descrito, permitió analizar el comportamiento genético de tres endotipos de LES con y sin compromiso renal en un grupo multiétnico, como lo es la población Colombiana..

**2.-** La literatura describe el compromiso sexo dependiente del LES en sus distintos endotipos, estos hallazgos son similares a los descritos en el presente trabajo. Es el género femenino el que presenta mayor predisposición en desarrollar LES, NFIV o NLp. Sin embargo, al comparar entre estos tres endotipos, se pudo observar que menos del 10% de los individuos con LES son del género masculino, mientras que para aquellos casos con afección renal como NFIV y NLp el porcentaje de varones afectados es cercano al 20%. Esto demuestra que el daño renal presente entre sujetos del sexo masculino tiende a duplicarse.

**3.-**Por su parte, de los diferentes biomarcadores séricos aquí analizados, la vitamina D demostró una asociación indirecta con la enfermedad. Como se describió, la población de estudio presenta una prevalencia relativamente baja de insuficiencia de vitamina D; más del 80% de los casos estudiados presentan concentraciones séricas suficientes entre 30 y 100 ng/mL. Sin embargo, el comportamiento de este heterolípido entre los endotipos evaluados, muestra que el daño renal a temprana edad, como ocurre en niños con Nefritis lúpica, genera un incremento de la vitamina D sérica, con niveles séricos promedio de 57.2 ng/mL. Estos niveles disminuyen en los individuos adultos con Nefritis lúpica tipo IV.

4.-En cuanto a la asociación de las variantes genéticas y sus polimorfismos con relación a la predisposición al desarrollo del LES en estos tres endotipos, se encontró que el polimorfismo rs2476601 de *PTPN22* demostró una contribución al desarrollo de daño renal como ocurre en los casos con NLp y NFIV observándose el genotipo heterocigoto AG como factor de riesgo para la enfermedad a diferencia de los individuos con LES que no desarrollan daño renal, en los cuales el locus *PTPN22* no genera predisposición a la enfermedad. Con respecto al gen *VDR* solo los alelos y genotipos del BsmI se mostraron asociados a la predisposición al desarrollo del LES en los tres endotipos.



## 9. REFERENCIAS

1. Liu K, Mohan C. Altered B-cell signaling in lupus. *Autoimmunity reviews*. 2009;8(3):214-8. DOI: 10.1016/j.autrev.2008.07.048.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18722559>
2. Borchers AT, Naguwa SM, Shoenfeld Y, Gershwin ME. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews*. 2010;9(5):A277-87. DOI: 10.1016/j.autrev.2009.12.008.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036343>
3. Crow MK. Collaboration, genetic associations, and lupus erythematosus. *The New England journal of medicine*. 2008;358(9):956-61. DOI: 10.1056/NEJMe0800096.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18204099>
4. Ardoin SP, Pisetsky DS. Developments in the scientific understanding of lupus. *Arthritis research & therapy*. 2008;10(5):218. DOI: 10.1186/ar2488.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18947369>
5. Hom G, Graham RR, Modrek B, Taylor KE, Ortmann W, Garnier S, et al. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *The New England journal of medicine*. 2008;358(9):900-9. DOI: 10.1056/NEJMoa0707865.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18204098>
6. Aroca G BN, Pertuz N, Iglesias A, Laborde CAG, Beltrán N, et al. Comportamiento de la Nefropatía Lúpica durante los años 2000 a 2006. *Revista Electrónica Médica De La Costa* 2007;2(1):20 - 5.
7. Tikly M, Navarra SV. Lupus in the developing world--is it any different? Best practice & research *Clinical rheumatology*. 2008;22(4):643-55. DOI: 10.1016/j.berh.2008.05.003.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18783742>
8. 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*. 2004;83(1):1-17. DOI: 10.1097/01.md.0000104742.42401.e2.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14747764>
9. Flesher DL, Sun X, Behrens TW, Graham RR, Criswell LA. Recent advances in the genetics of systemic lupus erythematosus. *Expert review of clinical immunology*. 2010;6(3):461-79. DOI: 10.1586/eci.10.8.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20441431>
10. Pons-Estel GJ, Alarcon GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus

erythematosus. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2010;39(4):257-68. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2008.10.007.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19136143>

11. Anagnostopoulos I, Zinzaras E, Alexiou I, Papathanasiou AA, Davas E, Koutroumpas A, et al. The prevalence of rheumatic diseases in central Greece: a population survey. *BMC musculoskeletal disorders*. 2010;11:98. DOI: 10.1186/1471-2474-11-98.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20504294>

12. Lau CS, Yin G, Mok MY. Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: an overview. *Lupus*. 2006;15(11):715-9.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17153840>

13. Ramirez Gomez 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(6):596-604. DOI: 10.1177/0961203307088006.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18539716>

14. Gupta V, Sachdeva S, Khan AS, Haque SF. Diffuse proliferative crescentic lupus nephritis with normal renal function. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia*. 2012;23(2):343-5.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22382232>

15. Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, Wallace WD, Daikh DI, Fitzgerald JD, et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis care & research*. 2012;64(6):797-808. DOI: 10.1002/acr.21664.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22556106>

16. Mok CC. Understanding lupus nephritis: diagnosis, management, and treatment options. *International journal of women's health*. 2012;4:213-22. DOI: 10.2147/IJWH.S28034.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22675266>

17. Martinez-Lostao L, Ordi-Ros J, Balada E, Segarra-Medrano A, Majo-Masferrer J, Labrador-Horrillo M, et al. Activation of the signal transducer and activator of transcription-1 in diffuse proliferative lupus nephritis. *Lupus*. 2007;16(7):483-8. DOI: 10.1177/0961203307079618.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17670846>

18. Chung SA, Taylor KE, Graham RR, Nititham J, Lee AT, Ortmann WA, et al. Differential genetic associations for systemic lupus erythematosus based on anti-dsDNA autoantibody production. *PLoS genetics*. 2011;7(3):e1001323. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001323.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21408207>

19. Jenks SA, Sanz I. Altered B cell receptor signaling in human systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews*. 2009;8(3):209-13. DOI: 10.1016/j.autrev.2008.07.047.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18723129>
20. Peng SL. Altered T and B lymphocyte signaling pathways in lupus. *Autoimmunity reviews*. 2009;8(3):179-83. DOI: 10.1016/j.autrev.2008.07.040.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18721908>
21. Conti F, Alessandri C, Perricone C, Scrivo R, Rezai S, Ceccarelli F, et al. Neurocognitive dysfunction in systemic lupus erythematosus: association with antiphospholipid antibodies, disease activity and chronic damage. *PloS one*. 2012;7(3):e33824. DOI: 10.1371/journal.pone.0033824.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22461897>
22. Meffre E, Wardemann H. B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Current opinion in immunology*. 2008;20(6):632-8. DOI: 10.1016/j.coi.2008.09.001.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18848883>
23. Diveu C, McGeachy MJ, Cua DJ. Cytokines that regulate autoimmunity. *Current opinion in immunology*. 2008;20(6):663-8. DOI: 10.1016/j.coi.2008.09.003.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18834938>
24. Zhang B, Zhang X, Tang FL, Zhu LP, Liu Y, Lipsky PE. Clinical significance of increased CD4+CD25-Foxp3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008;67(7):1037-40. DOI: 10.1136/ard.2007.083543.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18199598>
25. Griffiths B, Mosca M, Gordon C. Assessment of patients with systemic lupus erythematosus and the use of lupus disease activity indices. *Best practice & research Clinical rheumatology*. 2005;19(5):685-708. DOI: 10.1016/j.berh.2005.03.010.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16150398>
26. Suzuki K, Setoyama Y, Yoshimoto K, Tsuzaka K, Abe T, Takeuchi T. Effect of interleukin-2 on synthesis of B cell activating factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF) in human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*. 2008;44(1):44-8. DOI: 10.1016/j.cyto.2008.06.005.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18707897>
27. Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P, Plenge RM, et al. Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS genetics*. 2008;4(4):e1000024. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000024.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18437207>

28. Tsao BP. The genetics of human systemic lupus erythematosus. Trends in immunology. 2003;24(11):595-602. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14596884>
29. Invernizzi P, Gershwin ME. The genetics of human autoimmune disease. Journal of autoimmunity. 2009;33(3-4):290-9. DOI: 10.1016/j.jaut.2009.07.008.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19682858>
30. Abiola O, Angel JM, Avner P, Bachmanov AA, Belknap JK, Bennett B, et al. The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. Nature reviews Genetics. 2003;4(11):911-6. DOI: 10.1038/nrg1206.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14634638>
31. Cordell HJ, Clayton DG. Genetic association studies. Lancet. 2005;366(9491):1121-31. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67424-7.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16182901>
32. Cornelis F, Faure S, Martinez M, Prud'homme JF, Fritz P, Dib C, et al. New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998;95(18):10746-50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9724775>
33. Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD. The International HapMap Project Web site. Genome research. 2005;15(11):1592-3. DOI: 10.1101/gr.4413105.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16251469>
34. Sriram K SM. Systemic Lupus Erythematosus: Recent Concepts in Genomics, Pathogenetic Mechanisms, and Therapies. Immunology. 2011;2011:1-7. DOI: 10.5402/2011/868964.  
<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2011/868964/abs/>
35. Wang J, Yang S, Chen JJ, Zhou SM, He SM, Liang YH, et al. Systemic lupus erythematosus: a genetic epidemiology study of 695 patients from China. Archives of dermatological research. 2007;298(10):485-91. DOI: 10.1007/s00403-006-0719-4.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17136562>
36. Shankarkumar U. The human leukocyte antigen (HLA) system. International Journal of Human Genetics. 2004;4(2):91.  
<http://www.nlm.it/www.nlm.it/documents/2004 - II Sistema HLA - Shankarkumar.pdf>
37. Perl A. Overview of signal processing by the immune system in systemic lupus erythematosus. Autoimmunity reviews. 2009;8(3):177-8. DOI: 10.1016/j.autrev.2008.07.039.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18722560>
38. Castro J, Balada E, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarres M. The complex immunogenetic basis of systemic lupus erythematosus. Autoimmunity reviews. 2008;7(5):345-51. DOI: 10.1016/j.autrev.2008.01.001.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18486920>

39. Rhodes B, Vyse TJ. The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies. *Rheumatology*. 2008;47(11):1603-11. DOI: 10.1093/rheumatology/ken247.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18611920>

40. Ban Y, Greenberg DA, Davies TF, Jacobson E, Concepcion E, Tomer Y. Linkage analysis of thyroid antibody production: evidence for shared susceptibility to clinical autoimmune thyroid disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(9):3589-96. DOI: 10.1210/jc.2008-0364.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18559906>

41. Molnar F. Structural considerations of vitamin D signaling. *Frontiers in physiology*. 2014;5:191. DOI: 10.3389/fphys.2014.00191.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24936188>

42. De Azevedo Silva J, Guimaraes RL, Brandao LA, Araujo J, Segat L, Crovella S, et al. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and age onset in type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity*. 2013;46(6):382-7. DOI: 10.3109/08916934.2013.795952.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23721405>

43. Maalmi H, Sassi FH, Berraies A, Ammar J, Hamzaoui K, Hamzaoui A. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with susceptibility to asthma in Tunisian children: A case control study. *Human immunology*. 2013;74(2):234-40. DOI: 10.1016/j.humimm.2012.11.005.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23200756>

44. Zuluaga N AJ, Balthazar V, Jiménez K, Campuzano G. Vitamina D: nuevos paradigmas. *Medicina & Laboratorio*. 2011;17:211-46.

<http://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2011/myl115-6b.pdf>

45. Muehleisen B, Gallo RL. Vitamin D in allergic disease: shedding light on a complex problem. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(2):324-9. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.12.1562.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23374263>

46. Fu B, Wang H, Wang J, Barouhas I, Liu W, Shuboy A, et al. Epigenetic regulation of BMP2 by 1,25-dihydroxyvitamin D3 through DNA methylation and histone modification. *PloS one*. 2013;8(4):e61423. DOI: 10.1371/journal.pone.0061423.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23620751>

47. Gibson DS, Newell K, Evans AN, Finnegan S, Manning G, Scaife C, et al. Vitamin D binding protein isoforms as candidate predictors of disease extension in childhood arthritis. *Journal of proteomics*. 2012;75(17):5479-92. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.06.024.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22771520>

48. Matheu V, Back O, Mondoc E, Issazadeh-Navikas S. Dual effects of vitamin D-induced alteration of TH1/TH2 cytokine expression: enhancing IgE production

and decreasing airway eosinophilia in murine allergic airway disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2003;112(3):585-92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13679819>

49. Gol-Ara M, Jadidi-Niaragh F, Sadria R, Azizi G, Mirshafiey A. The role of different subsets of regulatory T cells in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis*. 2012;2012:805875. DOI: 10.1155/2012/805875.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23133752>

50. Kongsbak M, Levring TB, Geisler C, von Essen MR. The vitamin d receptor and T cell function. *Frontiers in immunology*. 2013;4:148. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00148.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23785369>

51. Zhang Y, Leung DY, Richers BN, Liu Y, Remigio LK, Riches DW, et al. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *Journal of immunology*. 2012;188(5):2127-35. DOI: 10.4049/jimmunol.1102412.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22301548>

52. Kostoglou-Athanassiou I, Athanassiou P, Lyraki A, Raftakis I, Antoniadis C. Vitamin D and rheumatoid arthritis. *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism*. 2012;3(6):181-7. DOI: 10.1177/2042018812471070.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23323190>

53. Bosse Y, Lemire M, Poon AH, Daley D, He JQ, Sandford A, et al. Asthma and genes encoding components of the vitamin D pathway. *Respiratory research*. 2009;10:98. DOI: 10.1186/1465-9921-10-98.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19852851>

54. Fang WL, Gao LB, Liang WB, Xue H, Bai P, Lv ML, et al. Association analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms in chinese population with asthma. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*. 2009;8(3):141-7. DOI: 10.1007/s12202-009-1411-7.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20124605>

55. Raby BA, Lazarus R, Silverman EK, Lake S, Lange C, Wjst M, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with childhood and adult asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;170(10):1057-65. DOI: 10.1164/rccm.200404-447OC.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15282200>

56. Goleva E, Searing DA, Jackson LP, Richers BN, Leung DY. Steroid requirements and immune associations with vitamin D are stronger in children than adults with asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2012;129(5):1243-51. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.01.044.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22330698>

57. Perpiña M. Vitamina D y asma. Que nunca se ponga el sol. *Medicina respiratoria*. 2011;4(2):51-61.  
<http://www.neumologiaysalud.es/descargas/volumen4/vol4-n3-6.pdf>
58. Panierakis C, Goulielmos G, Mamoulakis D, Petraki E, Papavasiliou E, Galanakis E. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Crete, Greece. *Clinical immunology*. 2009;133(2):276-81. DOI: 10.1016/j.clim.2009.08.004.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19734102>
59. Smolders J, Peelen E, Thewissen M, Menheere P, Tervaert JW, Hupperts R, et al. The relevance of vitamin D receptor gene polymorphisms for vitamin D research in multiple sclerosis. *Autoimmunity reviews*. 2009;8(7):621-6. DOI: 10.1016/j.autrev.2009.02.009.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393206>
60. Saeki H, Asano N, Tsunemi Y, Takekoshi T, Kishimoto M, Mitsui H, et al. Polymorphisms of vitamin D receptor gene in Japanese patients with psoriasis vulgaris. *Journal of dermatological science*. 2002;30(2):167-71.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12413773>
61. Clancy N, Onwuneme C, Carroll A, McCarthy R, McKenna MJ, Murphy N, et al. Vitamin D and neonatal immune function. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet.* 2013;26(7):639-46. DOI: 10.3109/14767058.2012.746304.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23131172>
62. Froicu M, Cantorna MT. Vitamin D and the vitamin D receptor are critical for control of the innate immune response to colonic injury. *BMC immunology*. 2007;8:5. DOI: 10.1186/1471-2172-8-5.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17397543>
63. Mandal M, Tripathy R, Panda AK, Pattanaik SS, Dakua S, Pradhan AK, et al. Vitamin D levels in Indian systemic lupus erythematosus patients: association with disease activity index and interferon alpha. *Arthritis research & therapy*. 2014;16(1):R49. DOI: 10.1186/ar4479.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24507879>
64. Calle C CnJ, Maestro B, Dávila N Modulación de la expresión del gen del receptor de insulina por hormonas esteroideas: Consecuencias patológicas. *Avances en diabetología*. 1997;3(1):1-10.  
<http://www.sediabetes.org/gestor/upload/revista/00001204archivorevista.pdf>
65. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(15):6665-9.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1353882>

66. Faraco JH, Morrison NA, Baker A, Shine J, Frossard PM. Apal dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus. *Nucleic acids research*. 1989;17(5):2150. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2564666>
67. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*. 1994;367(6460):284-7. DOI: 10.1038/367284a0.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8161378>
68. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1997;12(6):915-21. DOI: 10.1359/jbmr.1997.12.6.915.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9169350>
69. Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1996;11(12):1850-5. DOI: 10.1002/jbmr.5650111204.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8970885>
70. Laczanski L, Milewicz A, Lwow F, Puzianowska-Kuznicka M, Pawlak M, Kolackov K, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and cardiovascular risk variables in elderly Polish subjects. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2013;29(3):268-72. DOI: 10.3109/09513590.2012.736562.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23173643>
71. Pena-Chilet M, Ibarrola-Villava M, Martin-Gonzalez M, Feito M, Gomez-Fernandez C, Planelles D, et al. rs12512631 on the group specific complement (vitamin D-binding protein GC) implicated in melanoma susceptibility. *PloS one*. 2013;8(3):e59607. DOI: 10.1371/journal.pone.0059607.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23544077>
72. Mohapatra S, Saxena A, Gandhi G, Koner BC, Ray PC. Vitamin D and VDR gene polymorphism (FokI) in epithelial ovarian cancer in Indian population. *Journal of ovarian research*. 2013;6(1):37. DOI: 10.1186/1757-2215-6-37.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23705897>
73. Handel AE, Sandve GK, Disanto G, Berlanga-Taylor AJ, Gallone G, Hanwell H, et al. Vitamin D receptor ChIP-seq in primary CD4+ cells: relationship to serum 25-hydroxyvitamin D levels and autoimmune disease. *BMC medicine*. 2013;11:163. DOI: 10.1186/1741-7015-11-163.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23849224>

74. Toptas B, Kafadar AM, Cacina C, Turan S, Yurdum LM, Yigitbasi N, et al. The vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms in Turkish brain cancer patients. *BioMed research international*. 2013;2013:295791. DOI: 10.1155/2013/295791.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23691496>

75. Levin GP, Robinson-Cohen C, de Boer IH, Houston DK, Lohman K, Liu Y, et al. Genetic variants and associations of 25-hydroxyvitamin D concentrations with major clinical outcomes. *Jama*. 2012;308(18):1898-905. DOI: 10.1001/jama.2012.17304.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23150009>

76. O'Neill V, Asani FF, Jeffery TJ, Saccone DS, Bornman L. Vitamin D Receptor Gene Expression and Function in a South African Population: Ethnicity, Vitamin D and I. *PLoS one*. 2013;8(6):e67663. DOI: 10.1371/journal.pone.0067663.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805323>

77. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004;338(2):143-56. DOI: 10.1016/j.gene.2004.05.014.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15315818>

78. O'Regan S, Chesney RW, Hamstra A, Eisman JA, O'Gorman AM, Deluca HF. Reduced serum 1,25-(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> levels in prednisone-treated adolescents with systemic lupus erythematosus. *Acta paediatrica Scandinavica*. 1979;68(1):109-11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/214990>

79. Muller K, Kriegbaum NJ, Baslund B, Sorensen OH, Thymann M, Bentzen K. Vitamin D<sub>3</sub> metabolism in patients with rheumatic diseases: low serum levels of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical rheumatology*. 1995;14(4):397-400. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7586974>

80. Becker A, Fischer R, Schneider M. [Bone density and 25-OH vitamin D serum level in patients with systemic lupus erythematosus]. *Zeitschrift fur Rheumatologie*. 2001;60(5):352-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11759235>

81. Kamen DL, Cooper GS, Bouali H, Shaftman SR, Hollis BW, Gilkeson GS. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews*. 2006;5(2):114-7. DOI: 10.1016/j.autrev.2005.05.009.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16431339>

82. Thudi A, Yin S, Wandstrat AE, Li QZ, Olsen NJ. Vitamin D levels and disease status in Texas patients with systemic lupus erythematosus. *The American journal of the medical sciences*. 2008;335(2):99-104. DOI: 10.1097/MAJ.0b013e318134eeb6.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18277116>

83. Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Olivares N, Martinez-Berriotxo A, Aguirre C. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences. *Rheumatology*. 2008;47(6):920-3. DOI: 10.1093/rheumatology/ken121.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18411213>

84. Wu PW, Rhew EY, Dyer AR, Dunlop DD, Langman CB, Price H, et al. 25-hydroxyvitamin D and cardiovascular risk factors in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2009;61(10):1387-95. DOI: 10.1002/art.24785.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19790113>

85. Damanhoury LH. Vitamin D deficiency in Saudi patients with systemic lupus erythematosus. *Saudi medical journal*. 2009;30(10):1291-5.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19838436>

86. Toloza SM, Cole DE, Gladman DD, Ibanez D, Urowitz MB. Vitamin D insufficiency in a large female SLE cohort. *Lupus*. 2010;19(1):13-9. DOI: 10.1177/0961203309345775.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19897520>

87. Ben-Zvi I, Aranow C, Mackay M, Stanevsky A, Kamen DL, Marinescu LM, et al. The impact of vitamin D on dendritic cell function in patients with systemic lupus erythematosus. *PloS one*. 2010;5(2):e9193. DOI: 10.1371/journal.pone.0009193.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20169063>

88. Szodoray P, Tarr T, Bazso A, Poor G, Szegedi G, Kiss E. The immunopathological role of vitamin D in patients with SLE: data from a single centre registry in Hungary. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2011;40(2):122-6. DOI: 10.3109/03009742.2010.507220.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20977384>

89. Huisman AM, White KP, Algra A, Harth M, Vieth R, Jacobs JW, et al. Vitamin D levels in women with systemic lupus erythematosus and fibromyalgia. *The Journal of rheumatology*. 2001;28(11):2535-9.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11708429>

90. Wright TB, Shults J, Leonard MB, Zemel BS, Burnham JM. Hypovitaminosis D is associated with greater body mass index and disease activity in pediatric systemic lupus erythematosus. *The Journal of pediatrics*. 2009;155(2):260-5. DOI: 10.1016/j.jpeds.2009.02.033.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19446841>

91. Borba VZ, Vieira JG, Kasamatsu T, Radominski SC, Sato EI, Lazaretti-Castro M. Vitamin D deficiency in patients with active systemic lupus erythematosus. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2009;20(3):427-33. DOI: 10.1007/s00198-008-0676-1.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18600287>

92. Lora P, Scalco R, Furlanetto T, Xavier R. Vitamin D status in patients with systemic lupus erythematosus from southern Brazil. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2008;46(Supplement: IFCC WorldLab Fortaleza 2008. ).

93. Souto M, Coelho A, Guo C, Mendonca L, Argolo S, Papi J, et al. Vitamin D insufficiency in Brazilian patients with SLE: prevalence, associated factors, and relationship with activity. *Lupus*. 2011;20(10):1019-26. DOI: 10.1177/0961203311401457.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646315>

94. Mok CC, Birmingham DJ, Leung HW, Hebert LA, Song H, Rovin BH. Vitamin D levels in Chinese patients with systemic lupus erythematosus: relationship with disease activity, vascular risk factors and atherosclerosis. *Rheumatology*. 2012;51(4):644-52. DOI: 10.1093/rheumatology/ker212.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21719424>

95. Huang CM, Wu MC, Wu JY, Tsai FJ. Association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2002;11(1):31-4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11898916>

96. Ozaki Y, Nomura S, Nagahama M, Yoshimura C, Kagawa H, Fukuhara S. Vitamin-D receptor genotype and renal disorder in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Nephron*. 2000;85(1):86-91. DOI: 45635.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10773761>

97. Sakulpipatsin W, Veraseritniyom O, Nantiruj K, Totemchokchayakarn K, Lertsrisatit P, Janwityanujit S. Vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in Thai patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(2):R48. DOI: 10.1186/ar1910.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16507161>

98. Huang CM, Wu MC, Wu JY, Tsai FJ. No association of vitamin D receptor gene start codon fok 1 polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*. 2002;29(6):1211-3.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12064837>

99. Abbasi M, Rezaieyazdi Z, Afshari JT, Hatef M, Sahebari M, Saadati N. Lack of association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology international*. 2010;30(11):1537-9. DOI: 10.1007/s00296-010-1504-4.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473502>

100. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Molecular biology reports*. 2011;38(6):3643-51. DOI: 10.1007/s11033-010-0477-4.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21110115>

101. Monticielo OA, Brenol JC, Chies JA, Longo MG, Rucatti GG, Scalco R, et al. The role of BsmI and FokI vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2012;21(1):43-52. DOI: 10.1177/0961203311421798.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21993390>

102. Guarnizo-Zuccardi P, Lopez Y, Giraldo M, Garcia N, Rodriguez L, Ramirez L, et al. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue antigens*. 2007;70(5):376-82. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2007.00917.x.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17711410>

103. McHugh NJ, Owen P, Cox B, Dunphy J, Welsh K. MHC class II, tumour necrosis factor alpha, and lymphotoxin alpha gene haplotype associations with serological subsets of systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases*. 2006;65(4):488-94. DOI: 10.1136/ard.2005.039842.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16107511>

104. 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(8):698-704. DOI: 10.1177/0961203308101955.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19502265>

105. Namjou B, Kilpatrick J, Harley JB. Genetics of clinical expression in SLE. *Autoimmunity*. 2007;40(8):602-12. DOI: 10.1080/08916930701510962.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18075794>

106. Carmona-Fernandes D, Santos MJ, Canhao H, Fonseca JE. Anti-ribosomal P protein IgG autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus: diagnostic performance and clinical profile. *BMC medicine*. 2013;11:98. DOI: 10.1186/1741-7015-11-98.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23557114>

107. Liphaut BL, Kiss MH, Goldberg AC. HLA-DRB1 alleles in juvenile-onset systemic lupus erythematosus: renal histologic class correlations. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2007;40(4):591-7.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17401504>

108. Graham RR, Ortmann W, Rodine P, Espe K, Langefeld C, Lange E, et al. Specific combinations of HLA-DR2 and DR3 class II haplotypes contribute graded risk for disease susceptibility and autoantibodies in human SLE. *European journal of human genetics : EJHG*. 2007;15(8):823-30. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201827.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406641>

109. Castano-Rodriguez N, Diaz-Gallo LM, Pineda-Tamayo R, Rojas-Villarraga A, Anaya JM. Meta-analysis of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 polymorphisms in Latin American patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews*. 2008;7(4):322-30. DOI: 10.1016/j.autrev.2007.12.002.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18295738>

110. Rezaieyazdi Z, Tavakkol-Afshari J, Esmaili E, Orouji E, Pezeshkpour F, Khodadoost M, et al. Association of HLA-DQB1 allelic sequence variation with

susceptibility to systemic lupus erythematosus. Iranian journal of allergy, asthma, and immunology. 2008;7(2):91-5. DOI: 07.02/ijaai.9195.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18552411>

111. Lee YH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG, Nath SK, et al. The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune diseases--a meta-analysis. Rheumatology. 2007;46(1):49-56. DOI: 10.1093/rheumatology/kel170.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760194>

112. Cohen S, Dadi H, Shaoul E, Sharfe N, Roifman CM. Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. Blood. 1999;93(6):2013-24.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10068674>

113. Brand O, Gough S, Heward J. HLA , CTLA-4 and PTPN22 : the shared genetic master-key to autoimmunity? Expert reviews in molecular medicine. 2005;7(23):1-15. DOI: 10.1017/S1462399405009981.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16229750>

114. Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VE, et al. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. American journal of human genetics. 2004;75(3):504-7. DOI: 10.1086/423790.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15273934>

115. Jacobson EM, Tomer Y. The CD40, CTLA-4, thyroglobulin, TSH receptor, and PTPN22 gene quintet and its contribution to thyroid autoimmunity: back to the future. Journal of autoimmunity. 2007;28(2-3):85-98. DOI: 10.1016/j.jaut.2007.02.006.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17369021>

116. Hadj-Kacem H, Rebuffat S, Mnif-Feki M, Belguith-Maalej S, Ayadi H, Peraldi-Roux S. Autoimmune thyroid diseases: genetic susceptibility of thyroid-specific genes and thyroid autoantigens contributions. International journal of immunogenetics. 2009;36(2):85-96. DOI: 10.1111/j.1744-313X.2009.00830.x.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19284442>

117. Bultink IE, Vis M, van der Horst-Bruinsma IE, Lems WF. Inflammatory rheumatic disorders and bone. Current rheumatology reports. 2012;14(3):224-30. DOI: 10.1007/s11926-012-0252-8.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22477520>

118. Jimenez-Morales S, Velazquez-Cruz R, Ramirez-Bello J, Bonilla-Gonzalez E, Romero-Hidalgo S, Escamilla-Guerrero G, et al. Tumor necrosis factor-alpha is a common genetic risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population. Human immunology. 2009;70(4):251-6. DOI: 10.1016/j.humimm.2009.01.027.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19480843>

119. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annual review of immunology*. 1989;7:625-55. DOI: 10.1146/annurev.iy.07.040189.003205.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2540776>

120. Aguilon JC, Escobar A, Ferreira V, Aguirre A, Ferreira L, Molina MC, et al. Daily production of human tumor necrosis factor in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated ex vivo blood culture assays. *European cytokine network*. 2001;12(1):105-10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11282553>

121. Velazquez-Cruz R, Jimenez-Morales S, Ramirez-Bello J, Aguilar-Delfin I, Salas-Martinez G, Baca Ruiz V, et al. [Systemic lupus erythematosus: genomics of the disease]. *Gaceta medica de Mexico*. 2012;148(4):371-80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22976755>

122. Howson JM, Walker NM, Clayton D, Todd JA, Type 1 Diabetes Genetics C. Confirmation of HLA class II independent type 1 diabetes associations in the major histocompatibility complex including HLA-B and HLA-A. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2009;11 Suppl 1:31-45. DOI: 10.1111/j.1463-1326.2008.01001.x.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19143813>

123. Ramirez-Bello J, Vargas-Alarcon G, Tovilla-Zarate C, Fragoso JM. [Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rSNP) and structural RNA (srSNPs) in complex diseases]. *Gaceta medica de Mexico*. 2013;149(2):220-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23652189>

124. Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H, et al. Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)-alpha gene in Japanese. *Tissue antigens*. 1998;51(6):605-12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9694352>

125. Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, von Blomberg BM, Kostense PJ, et al. Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of immunology*. 1996;43(4):456-63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8668926>

126. Rood MJ, van Krugten MV, Zanelli E, van der Linden MW, Keijsers V, Schreuder GM, et al. TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43(1):129-34. DOI: 10.1002/1529-0131(200001)43:1<129::AID-ANR16>3.0.CO;2-S.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10643708>

127. Zuniga J, Vargas-Alarcon G, Hernandez-Pacheco G, Portal-Celhay C, Yamamoto-Furusho JK, Granados J. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Genes and immunity*. 2001;2(7):363-6. DOI: 10.1038/sj.gene.6363793.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11704801>

128. Lopez P, Gutierrez C, Suarez A. IL-10 and TNFalpha genotypes in SLE. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010;2010:838390. DOI: 10.1155/2010/838390.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20625422>

129. Chung CP, Long AG, Solus JF, Rho YH, Oeser A, Raggi P, et al. Adipocytokines in systemic lupus erythematosus: relationship to inflammation, insulin resistance and coronary atherosclerosis. *Lupus*. 2009;18(9):799-806. DOI: 10.1177/0961203309103582.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19578104>

130. Khabour OF, Wehaibi SH, Al-Azzam SI, Alzoubi KH, El-Akawi ZJ. Association of adiponectin with hypertension in type 2 diabetic patients: the gender effect. *Clinical and experimental hypertension*. 2013;35(5):361-6. DOI: 10.3109/10641963.2012.732645.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23057719>

131. Antista M. Adiponectina. *Iaca Lab*. 2013(1-5).

132. Almanza-Pérez JC, Blancas-Flores G, García-Macedo R, Alarcón-Aguilar FJ, Cruz M. Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. *Gaceta medica de Mexico*. 2008;144(6):535-42. <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDARTICULO=21503&IDPUBLICACION=2186&IDREVISTA=16>

133. Ryan MJ, McLemore GR, Jr., Hendrix ST. Insulin resistance and obesity in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Hypertension*. 2006;48(5):988-93. DOI: 10.1161/01.HYP.0000243612.02929.df.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16982954>

134. Wislowska M, Rok M, Stepien K, Kuklo-Kowalska A. Serum leptin in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology international*. 2008;28(5):467-73. DOI: 10.1007/s00296-008-0526-7.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18196243>

135. Harle P, Pongratz G, Weidler C, Buttner R, Scholmerich J, Straub RH. Possible role of leptin in hypoandrogenicity in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2004;63(7):809-16. DOI: 10.1136/ard.2003.011619.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194576>

136. Sada KE, Yamasaki Y, Maruyama M, Sugiyama H, Yamamura M, Maeshima Y, et al. Altered levels of adipocytokines in association with insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*. 2006;33(8):1545-52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16881111>

137. Rovin BH, Song H, Hebert LA, Nadasdy T, Nadasdy G, Birmingham DJ, et al. Plasma, urine, and renal expression of adiponectin in human systemic lupus erythematosus. *Kidney international*. 2005;68(4):1825-33. DOI: 10.1111/j.1523-1755.2005.00601.x.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16164660>

138. Manson JJ, Ma A, Rogers P, Mason LJ, Berden JH, van der Vlag J, et al. Relationship between anti-dsDNA, anti-nucleosome and anti-alpha-actinin antibodies and markers of renal disease in patients with lupus nephritis: a prospective longitudinal study. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(5):R154. DOI: 10.1186/ar2831.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19828047>

139. Stinton LM, Barr SG, Tibbles LA, Yilmaz S, Sar A, Benediktsson H, et al. Autoantibodies in lupus nephritis patients requiring renal transplantation. *Lupus*. 2007;16(6):394-400. DOI: 10.1177/0961203307078391.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17664229>

140. Pradhan VD, Patwardhan MM, Ghosh K. Anti-nucleosome antibodies as a disease marker in systemic lupus erythematosus and its correlation with disease activity and other autoantibodies. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*. 2010;76(2):145-9. DOI: 10.4103/0378-6323.60558.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20228543>

141. Hanrotel-Saliou C, Segalen I, Le Meur Y, Youinou P, Renaudineau Y. Glomerular antibodies in lupus nephritis. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2011;40(3):151-8. DOI: 10.1007/s12016-010-8204-4.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20414746>

142. Agmon-Levin N, Gilburd B, Kivity S, Katz BS, Flitman-Katzevman I, Shoenfeld N, et al. Anti-ribosomal-P antibodies in lupus patients and healthy controls: evaluation of three ELISA assays. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*. 2009;11(7):403-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19911490>

143. Renaudineau Y, Deocharan B, Jousse S, Renaudineau E, Putterman C, Youinou P. Anti-alpha-actinin antibodies: a new marker of lupus nephritis. *Autoimmunity reviews*. 2007;6(7):464-8. DOI: 10.1016/j.autrev.2007.02.001.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17643934>

144. Jurencak R, Fritzler M, Tyrrell P, Hiraki L, Benseler S, Silverman E. Autoantibodies in pediatric systemic lupus erythematosus: ethnic grouping, cluster analysis, and clinical correlations. *The Journal of rheumatology*. 2009;36(2):416-21. DOI: 10.3899/jrheum.080588.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19208567>

145. Suominen P. Evaluation of an enzyme immunometric assay to measure serum adiponectin concentrations. *Clinical chemistry*. 2004;50(1):219-21. DOI: 10.1373/clinchem.2003.025833.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14709655>

146. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988;16(3):1215. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3344216>

147. Xiong J, He Z, Zeng X, Zhang Y, Hu Z. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Clinical*

and experimental rheumatology. 2014;32(2):174-81.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24321519>

148. Mao S, Huang S. Association between vitamin D receptor gene BsmI, FokI, ApaI and TaqI polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. Rheumatology international. 2014;34(3):381-8. 10.1007/s00296-013-2898-6.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24212677>