

MARCADORES POLIMORFICOS DE DOS SISTEMAS GENETICOS (MHC/HLA-DRB1- PTPN22 (C1858T) ASOCIADOS A ENFERMEDAD REUMATICA: AIJ POLIARTICULAR Y AR DE INSTALACION TEMPRANA EN UN GRUPO DE PACIENTES COLOMBIANOS.

AUTOR.

ANDERSON DÍAZ PÉREZ

Maestría En Ciencias Básicas Biomédica Con Énfasis En Inmunología.

**UNIVERSIDAD DEL NORTE.
DIVISIÓN CIENCIAS SALUD.
DEPARTAMENTO DE MEDICINA.
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BARRANQUILLA/COLOMBIA.
2011**

MARCADORES POLIMORFICOS DE DOS SISTEMAS GENETICOS (MHC/HLA-DRB1- PTPN22 (C1858T) ASOCIADOS A ENFERMEDAD REUMATICA: AIJ POLIARTICULAR Y AR DE INSTALACION TEMPRANA EN UN GRUPO DE PACIENTES COLOMBIANOS.

AUTOR.

ANDERSON DÍAZ PÉREZ

Maestría En Ciencias Básicas Biomédica Con Énfasis En Inmunología.

DIRECTOR

GLORIA GARAVITO DE EGEA. MD-PhD.

ASESOR

EDUARDO EGEA BERMEJO. MD-Esp.

**UNIVERSIDAD DEL NORTE.
DIVISIÓN CIENCIAS SALUD.
DEPARTAMENTO DE MEDICINA.
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BARRANQUILLA/COLOMBIA.**

2011

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a Dios por la fortaleza, la salud y el acompañamiento en todos los momentos de mi vida; por guiarme cada día y ayudarme a seguir adelante luchando siempre contra todos los obstáculos.

A mis padres sobre todo a mi madre Iris Yolanda Pérez Leot, y a mis hermanos y sobrinos, porque gracias a ellos y a su esfuerzo, por enseñarme que hay que luchar para alcanzar las metas y que para ser alguien hay que trabajar y esforzarse por lograr los objetivos propuestos más allá de los obstáculos.

A la Doctora Gloria Garavito y al Doctor Eduardo Egea, por su comprensión, paciencia, ejemplo y confianza para poder llevar a cabo la presente investigación, ambos fueron y serán guía en mi vida, tanto a nivel profesional como personal.

A mi novia por toda su paciencia y amistad en los momentos de angustia, alegría y tristezas.

A Sofía Moreno Wood, por su amistad incondicional, guía y paciencia en todos los procesos de técnicas de laboratorios utilizadas en la presente investigación.

Al Señor Emiliano Piedrahita, por su amistad y apoyo incondicional ya que sin él no hubiese podido terminar el proceso de estudios superiores.

A mis compañeros de laboratorio guías permanentes y de apoyo incondicional, pero sobre todo por los gratos momentos que pasamos en las largas jornadas de trabajo en el laboratorio.

Anderson Díaz Pérez

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a las siguientes personas e instituciones:

A la Doctora Gloria Garavito y Eduardo Egea por su apoyo, amistad, confianza pero sobre todo ejemplos de vida.

Al Dr. Antonio Iglesia Gamarra por toda la colaboración prestada para la realización de este estudio.

A la Universidad Del Norte, muy especialmente, a todos los docentes del Programa de la maestría, quienes tuvieron a su cargo nuestra formación profesional e investigativa en todo este proceso.

A COLCIENCIAS y la Universidad del Norte, ya que la elaboración y desarrollo de la presente investigación se financio con recursos del proyecto: ANALISIS MOLECULAR Y ESTUDIO DE LA ASOCIACION DEL POLIMORFISMO DE GENES MHC Y SNP'S DEL TNF CON LOS STR'S DEL MHC EN MESTIZOS COLOMBIANOS SUFRIENDO DE AR DE INSTALACION TEMPRANA Y AIJ POLIARTICULAR. Liderados por el Doctor Eduardo Egea y la Doctora Gloria Garavito.

Al grupo de Inmunoreumatología de la Universidad Nacional que con su apoyo en la consecución de muestras y análisis genético ayudaron a la consolidación de la presente investigación.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	15
INTRODUCCION	20
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
2. JUSTIFICACIÓN	24
3. ARTRITIS REUMATOIDE	28
3.1. GENERALIDADES	28
3.2. ARTRITIS REUMATOIDE DE INSTALACIÓN TEMPRANA	29
3.3. DIAGNOSTICO	32
3.4. PATOGÉNESIS	34
3.4.1. <i>Factores que intervienen en la patogenia de la enfermedad</i>	39
4. EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA DE ARTRITIS REUMATOIDE	41
4.1. PREVALENCIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE	41
4.2. MORTALIDAD	42
5. EPIDEMIOLOGIA ANALITICA O MOLECULAR DE ARTRITIS REUMATOIDE	43
5.1. FACTORES GENÉTICOS	43
6. FACTORES GENÉTICOS DE LA ARTRITIS REUMATOIDE ASOCIADOS AL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) CLASE II	47
6.1. ASOCIACIÓN CON HLA-DRB1*	48
6.2. GENES NO ASOCIADOS CON EL MHC	49
6.2.1. Asociación PTPN22 con la Artritis Reumatoide	49
7. ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL	51
7.1. GENERALIDADES	51
8. EPIDEMIOLOGIA GENÉTICA DE ARTRITIS IDIOPÁTICA JUVENIL	53
8.1. PREVALENCIA E INCIDENCIA	53
8.2. CLASIFICACIÓN CLÍNICA	54
9. PAPEL DEL POLIMORFISMO DE LOS ALELOS HLA CLASE II EN	56

ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL	
10. INMUNOGENETICA EN LAS ENFERMEDADES REUMATICAS	59
10.1. EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) EN EL SER HUMANO	59
10.1.1. Antecedentes, definición y localización genética del MHC	59
10.1.2. Polimorfismo, herencia y función del complejo MHC/HLA	62
11. HACIA LA IDENTIFICACION DE SISTEMAS GENETICOS COMUNES ASOCIADOS CON ARTRITIS REUMATOIDE DE INSTALACIÓN TEMPRANA Y ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	64
11.1. PTPN22 Y MHC/HLA COMO FACTORES DE RIESGO EN ARTRITIS REUMATOIDE	66
12. ASOCIACION DEL COMPLEJO HLA CON LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES.	69
12.1. ASOCIACIÓN DEL HLA CON ARTRITIS REUMATOIDEA DEL ADULTO Y ARTRITIS IDIOPÁTICA JUVENIL	69
12.1.2. Herencia	70
13. ESTRUCTURA, INHIBICIÓN Y MECANISMOS DE REGULACIÓN DE (PTPN22) LYP, UN LINFOIDE ESPECÍFICO TIROSINA FOSFATASA Y SU IMPLICACION EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES	72
13.1. LINFOIDE ESPECÍFICO TIROSINA (LYP)	73
13.2. MECANISMOS DE INTERACCIÓN DE LYP EN LA AUTOINMUNIDAD	76
14. OBJETIVOS	77
14.1. OBJETIVO GENERAL	77
14.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	77

15. HIPÓTESIS	78
15.1. HIPÓTESIS NULA	78
15.2. HIPÓTESIS ALTERNATIVA	78
16. METODOLOGÍA	79
16.1. TIPO DE ESTUDIO	79
16.2. MUESTREO POBLACIONAL	79
16.2.1. Selección de la Muestra	79
16.2.1.1. Dos Grupos de Pacientes	80
16.2.1.2. Criterios de Control	80
16.2.1.3. Criterios de Inclusión	81
16.2.1.4. Criterios de Exclusión	81
16.3. TÉCNICAS DE LA RECOLECCIÓN DE DATOS CLÍNICOS	82
16.3.1. Fuente Primaria	82
16.3.2. Fuente Secundaria	82
17. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	83
17.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS HLA CLASE II DRB1	83
17.1.1. Extracción de ADN (<i>Salting Out</i>)	83
17.1.2. Procedimiento	83
17.1.3. Cuantificación del ADN	84
17.1.4. Calidad del ADN	84
17.1.5. Equipos, materiales y reactivos utilizados	85
17.1.6. Tipificación Molecular De Los Alelos MHC/HLA Clase-II: DRB1*	85

17.1.7.	Tipificación HLA-SSP	86
17.1.8.	Electroforesis de gel al 2%	88
17.1.9.	Preparación de los reactivos	88
17.1.10.	Foto-documentación	89
17.1.11.	Interpretación de los resultados	89
17.1.12.	Interpretación del gel	89
17.2	GENOTIPIFICACIÓN MOLECULAR DEL ALELO PTPN22 POLIMORFISMO (C1858T), HOMOCIGOTO SILVESTRE (C/C), HETEROCIGOTO MUTADO (C/T), Y HOMOCIGOTO MUTADO (T/T).	90
17.2.1.	Ciclos Del PCR Light Snp´s – Programa De Tipificación Del Light Cyclcr	93
17.2.2.	Secuencias De Primers Y Sondas para PTPN22 (C1858T)	93
17.2.3.	Procedimiento	94
17.2.4.	Preparación de la Reacción Mix	95
17.2.5.	Genotipificación	95
17.2.6.	Controles	95
18.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	96
19	RESULTADOS	98
19.1	PROPUESTA DE UNA CLASIFICACIÓN DEL EPITOPE COMPARTIDO PARA (AIJ) POLIARTICULAR Y AR DE INSTALACION TEMPRANA.	112
19.2	DISEÑO DEL MODELO DE ANALISIS MULTIVARIADO PARA DETERMINAR SISTEMAS GENETICOS COMUNES Y POLIMORFISMOS MOLECULARES (c1858t) PTPN22 Y MHC/HLA:DRB1*	122

20. DISCUSION	132
21. CONCLUSIONES	137
22. BIBLIOGRAFIA	141
23. ANEXOS	158

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Revisión de alelos que expresan el epítipo en una población caucásica	43
Tabla 2. Aminoácidos de la cadena beta de las moléculas HLA DE CLASE II codificadas por los alelos HLA-DRB1* asociados con artritis reumatoide en pacientes de América Latina.	46
Tabla 3. Clasificación de AIJ según: ACR, EULAR, ILAR	55
Tabla 4. Composición de la mezcla Mastermix	87
Tabla 5. Programa del termociclador	87
Tabla 6. Polimorfismo (C1858T) PTPN22 en pacientes con (AIJ) Poliarticular	98
Tabla 7. Polimorfismo (C1858T) PTPN22 pacientes con AR Reumatoide de Instalación Temprana	100
Tabla 8. Polimorfismo (C1858T) PTPN22 en una población de Controles Sanos.	102
Tabla 9. Frecuencia alélica y génica del MHC/HLA- DRB1* en un grupo de pacientes con AIJ Poliarticular.	104
Tabla 10. Frecuencia alélica y génica del MHC/HLA- DRB1* en un grupo de Pacientes con AR de Instalación Temprana.	105
Tabla 11. Frecuencia alélica del exón HLA-DRB1* más frecuentemente expresados en pacientes con AIJ poliarticular y AR de instalación temprana y sujetos controles.	106
Tabla 12. Frecuencia alélica del exón HLA-DRB1* en un grupo de pacientes sufriendo de AIJ Poliarticular Y AR de Instalación Temprana.	108
Tabla 13. Análisis de asociación de las frecuencias alélicas del polimorfismo C1858T de PTPN22 en controles y pacientes con AIJ Poliarticular y AR Reumatoide de Instalación Temprana.	109

Tabla 14. Secuencia aminoacídica de los residuos de la posición 70-74 (epitope compartido) del MHC/HLA- DRB1* y su asociación con Artritis Reumatoide De Instalación Temprana.	110
Tabla 15. Secuencia aminoacídica de los residuos de la posición 70-74 (epitope compartido) del MHC/HLA-CLASE II: DRB1*1 y su asociación con Artritis Idiopática Juvenil Poliarticular.	111
Tabla 16. Frecuencia de aminoácidos que hacen parte del bolsillo 4 en la posición (70) del epitope compartido del MHC/HLA- DRB1* implicados en la susceptibilidad o protección en las dos entidades (AIJ) Poliarticular y AR de Instalación Temprana	117
Tabla 17. Secuencias del epitope compartido en la posición (70-74) del bolsillo 4 del MHC/HLA- DRB1* implicados en la susceptibilidad o protección en las dos entidades en una población Colombiana.	119
Tabla 18. Sumatoria de las frecuencias de epitopes compartidos del bolsillo (4) posición (70-74) del exón 4 del alelo MHC: HLA-DRB1* en los dos grupos de pacientes y controles implicados en la susceptibilidad o protección en las dos entidades en una población Colombiana.	119
Tabla 19. Análisis de regresión logística múltiple de los alelos MHC/HLA-DRB1 como alelos comunes asociados a susceptibilidad o protección para las dos entidades (AIJ) Poliarticular y (AR) de Instalación Temprana.	125
Tabla 20. Análisis de regresión logística univariado (ANOVA) del polimorfismo (C1958T) PTPN22 en (AIJ) Poli articular y AR de Instalación Temprana.	127
Tabla 21. Análisis de regresión logística entre los polimorfismos de los alelos MHC/HLA-DRB1 y (C1858T) PTPN22 asociados a susceptibilidad o protección para las dos entidades (AIJ) Poliarticular y (AR) de Instalación Temprana.	128
Tabla 22. Análisis de regresión logística múltiple de los alelos MHC/HLA-DRB1 como alelos comunes asociados a susceptibilidad o protección para las dos entidades (AIJ) Poliarticular y (AR) de Instalación Temprana.	130

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig 1. Aminoácidos que se encuentran en el bolsillo de la región hipervariable de la cadena beta 70 74 del HLA DRB1 (Immunepitope software MBP Epitopeviewer 2.0)	31
Fig 2. Cadena alfa formada por tres dominios externos denominados alfa 1, alfa 2 y alfa 3, con sus dominios transmembranal (TM) y uno Intracitoplasmatico.	44
Fig 3. Procesamiento antigenico	60
Fig 4. Mapa Cromosomal del CMH	60
Fig 5 (a) Herencia Codominante.	70
Fig 5 (b). Modelo de divergencia con respecto a haplotipos de la región DR-DQ en materia de extensión de MHC.	71
Fig 6. Cercanía de los genes HLA-DRB1 y los HLA-DQA1 y DQB1	71
Fig 7. (A) PTPN22 Nativa y (B) PTPN22 activada	72
Fig 8. Regulación en la activación de los LT por Tyrosine Kinases y Phosphatases	74
Fig 9. Dominios Ricos en Prolina de PTPN22.	74
Fig 10. Mecanismos de LYP Afectan la activación de Células T	75
Fig 11. Interpretación del gel electroforesis	90
Fig 12. Excitación y emisión de las sondas.	91
Fig 13. Mutación con las sondas de hibridación.	92
Fig 14. Controles Genotipificación sondas de hibridación PTPN22 (C1858T).	95

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Consentimiento informado	159
Formato de historia clínica	161
Base de datos: Tipificaciones HLA clase II y PTPN22 (AIJ) Poliarticular	164
Base de datos: Tipificaciones HLA clase II y PTPN22 AR de Instalación Temprana	165
Base de datos: Tipificaciones HLA clase II y PTPN22 de los controles	166
Base de datos : Excel análisis de data HLA DRB1- PTPN22	169

RESUMEN

Introducción. Del 5 al 10% de la población mundial está afectada por algún tipo de enfermedad autoinmune, una de las más comunes es Artritis Idiopática Juvenil (AIJ) y Artritis Reumatoide del adulto, cuya etiología es multifactorial. Los factores que dan lugar a alteraciones en la inmunoregulación están influenciadas por numerosos sistemas genéticos tales como: PTPN22 (C1858T) y HLA-DRB1*, posiblemente comunes para AR de instalación temprana y (AIJ) poliarticular.

Objetivo. Identificar y asociar los polimorfismos de los sistemas genéticos PTPN22 (SNP´s C1858T) y moleculares MHC/HLA-DRB1* con la susceptibilidad o protección para desarrollar Artritis Idiopática Juvenil Poli Articular y Artritis Reumatoide De Instalación Temprana en un grupo de pacientes colombianos.

Metodología. Tipo de estudio: *Analítico, Descriptivo-Transversal de Casos y Controles*. El número de pacientes escogidos fueron 30 con Artritis Idiopática Juvenil Poliarticular y 30 pacientes con Artritis Reumatoide de Instalación Temprana con 60 controles, según los criterios de inclusión de la (ACR y EULAR), para la extracción de ADN se utilizo la técnica de salting out, la tipificación molecular mediante PCR- SSP (sondas de secuencia específica) para identificar los alelos HLA-DRB1* y electroforesis gel al 2%. Para la identificación del polimorfismo (c1858t) de PTPN22 se utilizo el PCR-RT (Light Cycler) de ROCHE.

Resultados. Al realizar la tipificación de los alelos HLA-DRB1* se encontró que en el grupo de pacientes con (AIJ) poliarticular el alelo HLA-DRB1*0404, como un marcador de posible susceptibilidad para esta entidad con un OR=10.82; p<0.05. En el grupo de pacientes con AR de instalación temprana el alelo HLA-DRB1*0101 como un marcador de posible susceptibilidad con un OR=4.04; p<0.05, el cual es diferente al presentado en pacientes con (AIJ) poliarticular. Sin embargo el alelo HLA-DRB1*0701 se sugiere como un posible marcador protector para ambas patologías con un OR=0,15; p<0,05. El polimorfismo (C1858T) PTPN22 no se

encontró asociado con (AIJ) poliarticular ni como protector ni como susceptibilidad. En pacientes AR de instalación temprana el polimorfismo CC se sugiere como marcador posiblemente protector con un valor de $p < 0.05$ y el polimorfismo CT/TT como marcador de posible susceptibilidad con un valor de $p < 0.05$. En el análisis de la secuencia aminoacídica $^{70}\text{QRRAA}^{74}$ se encontró como un epítope compartido para ambas entidades como un marcador de posible susceptibilidad con un valor de $p < 0.05$ y la secuencia aminoacídica $^{70}\text{DRRGQ}^{74}$ como un epítope compartido sugiriendo estar asociado como un posible marcador de protección para ambas entidades con un valor de $p < 0.05$. Se propuso una clasificación del epítope compartido (SE) donde se evidencia que la presencia del aminoácido (Q) en la posición 70 tiene un posible papel para la susceptibilidad en ambas entidades con un valor de $p < 0.05$, en esta misma posición el aminoácido (D) como un posible marcador protector también en ambas patologías con un valor de $p < 0.05$. La clasificación arrojó que el aminoácido (R) tiene un posible papel importante en la susceptibilidad al encontrarse en cualquier posición dentro del (SE). El análisis de regresión logística fundamentado en un ANOVA evidenció que entre el grupo de pacientes de (AIJ) Poliarticular y AR de Instalación Temprana para los alelos *MHC/HLA-Clase II: DRB1*0101 y *0404* se encontró un porcentaje del 14% con un valor de $p = 0,0252$ de variabilidad con un nivel de confianza del 90% para ambas entidades como posibles alelos asociados a susceptibilidad. En el sistema PTPN22 el polimorfismo (C1858T) no se mostró para este análisis como marcador común contribuyendo a una variabilidad del 2.5% con una $p > 0.05$ dentro del modelo de regresión logística. **Discusión.** Los resultados de las asociaciones en los dos sistemas genéticos: PTPN22 (C1858T) y HLA-Clase II: DRB1* en pacientes con Artritis de Instalación Temprana y Artritis Idiopática Juvenil Poliarticular, se comportan con un patrón similar al informado en la literatura. Se destaca que en razón al número de pacientes estudiados no se evidencian una mayor fuerza de asociación estadística cuando de análisis de correlación se trata. Sin embargo los marcadores de protección en las dos entidades son los mismos. Los modelos bioestadísticos utilizados muestran que tanto los alelos asociados a protección en ambas enfermedades como los de susceptibilidad se encuentran

relacionados con los dos eventos: presencia y ausencia de una u otra de las dos enfermedades estudiadas. Se desea resaltar que el modelo estudiado para buscar asociación con la secuencia del epítopo compartido, en la región 70-74, muestra la importancia de la ubicación del tipo de aminoácido y como esta define su probable asociación como marcador molecular de susceptibilidad y protección. Es así como se determinó que el aminoácido ácido aspártico (D) confiere cierto grado de protección al encontrarse en la posición 70 del (SE) y el aminoácido glutamina (Q) confiere cierto grado de susceptibilidad al encontrarse en la posición 70 del (SE). Se notó en los análisis de asociación que el aminoácido arginina (R) en cualquier posición de la 71 a la 74 del (SE) de la molécula MHC/HLA- DRB1* tendría un papel importante a través de las fuerzas intermoleculares que interactúan, produciendo cambios en el espacio o conformación molecular del (SE) dependiendo del aminoácido que se encuentre en la posición 70 específicamente (D) o (Q). Estos últimos hallazgos son también coherentes con lo que está publicado en la literatura mundial.

Palabras claves: artritis idiopática juvenil, poliarticular, artritis reumatoide de instalación temprana, PTPN22, HLA-DRB1, polimorfismos, alelos, sistemas comunes, correlación, asociación, epítopo compartido (SE).

ABSTRACT

Introduction. From 5 to 10% of the world population is affected by some type of autoimmune disease, one of the most common is juvenile idiopathic arthritis (JIA) and rheumatoid arthritis in adults, whose etiology is multifactorial. The factors leading to alterations in immunoregulation are influenced by numerous genetic systems such as PTPN22 (C1858T) and HLA-DRB1*, possibly common to AR installation early (AIJ) polyarticular. **Objective.** Identify and associate genetic polymorphisms systems PTPN22 (C1858T SNPs) and molecular MHC/HLA-DRB1* with susceptibility and / or protection to develop Arthritis Idiopathic Juvenile polyarticular and Rheumatoid Arthritis Installation Early of a group of Colombian patients. **Methodology.** Type of study: Analytical, descriptive cross-sectional of

Case-Control. The number of patients chosen were 30 with (AIJ) polyarticular and 30 patients with Arthritis Rheumatoid Installation Early with 60 controls, according to the criteria for inclusion in the (ACR and EULAR) for DNA extraction technique was used salting out, molecular typing by PCR-SSP (sequence specific probes) to identify HLA-DRB1 and 2% gel electrophoresis. To identify the polymorphism (c1858t) of PTPN22 was used RT-PCR (Light Cycler) of ROCHE. **Results.** In making the typing of HLA-DRB1* alleles found in the patient group (JIA) polyarticular HLA-DRB1*0404, as a possible susceptibility marker for this entity with an OR=10.82, $p<0.05$. In the group of patients with early installation AR allele HLA-DRB1*0101 as a possible susceptibility marker with an OR=4.04, $p<0.05$, which is different to that presented in patients with (JIA) polyarticular. However, the allele HLA-DRB1*0701 is suggested as a possible marker for both diseases protector with an OR=0.15, $p<0.05$. The polymorphism (C1858T) PTPN22 was associated with no (JIA) polyarticular or as a protector or as susceptibility. Installation in early RA patients CC polymorphism is suggested as possibly protective marker with a value of $p<0.05$ and polymorphism CT/TT as possible susceptibility marker with a value of $p<0.05$. In the analysis of amino acid sequence found ⁷⁰QRRAA⁷⁴ a shared epitope for both entities as a possible susceptibility marker with a value of $p <0.05$, and the amino acid sequence as an epitope shared ⁷⁰DRRGQ⁷⁴ suggested to be associated as a possible marker of protection for both entities with a value of $p<0.05$. A proposed classification of shared epitope (SE) which shows that the presence of amino acid (Q) at position 70 has a potential role for susceptibility in both entities with a value of $p<0.05$, in this same position the amino acid (D) as a possible marker also protective in both conditions with a value of $p<0.05$. The courage that the amino acid classification (R) has a possible role in susceptibility to be in any position within the (SE). Logistic regression analysis based on an ANOVA showed that among the group of patients (JIA) Polyarticular and Early Installation AR alleles MHC/HLA-Class II DRB1*0101 and 0404 found a rate of 14% a value of $p=0.0252$ of variability with a confidence level of 90% for both entities as possible alleles associated with susceptibility. In the system PTPN22 polymorphism (C1858T) were not displayed

for this analysis as a common marker contributing to variability of 2.5% with a $p > 0.05$ in the logistic regression model. **Discussion.** The results of the associations in the two genetic systems: PTPN22 (C1858T) and HLA-Class II: patients with DRB1 * Installation Early Arthritis and Juvenile Idiopathic Arthritis Polyarticular, behave in a similar pattern to that reported in the literature. It is stressed that due to the number of patients studied did not show a statistical association stronger when it comes to correlation analysis. However, the markers of protection in the two entities are the same. Biostatistical models used show that both alleles associated with protection in both diseases and the susceptibility are related to the two events: the presence and absence of one or other of the two diseases studied. We wish to emphasize that the model studied to find association with shared epitope sequence in the region 70-74, shows the importance of the location of the type of amino acid and how it defines its probable association as a molecular marker of susceptibility and protection. This is how it was determined that the amino acid aspartic acid (D) provides some protection to be in the position 70 of (SE) and the amino acid glutamine (Q) gives a degree of susceptibility to be in the position 70 of (SE) . It was noted in association analysis of the amino acid arginine (R) in any position in the 71 to 74 of (SE) of the molecule MHC/HLA-DRB1 * have an important role through the intermolecular forces that interact, producing changes in the molecular conformation space or (SE) depending on the amino acid found at position 70 specifically (D) or (Q). These findings are also consistent with what is published in the literature.

Keywords: juvenile idiopathic arthritis, poliarticular, arthritis rheumatoid installation early, PTPN22, HLA-DRB1, polymorphisms, alleles, common systems, correlation, association, shared epitope.

INTRODUCCION

Las enfermedades autoinmunes están caracterizadas por pérdida de la tolerancia central o periférica. En la fisiopatogenia de ellas se produce destrucción de tejidos mediada por células inmunocompetentes. Aproximadamente del 5 al 10% de la población mundial está afectada por algún tipo de enfermedad autoinmune, una de las más comunes es Artritis Idiopática Juvenil (AIJ) y Artritis Reumatoide Del Adulto⁽¹⁾. Estas enfermedades autoinmunes son de naturaleza multifactorial.

Diferentes factores pueden dar lugar a alteraciones en la inmunoregulación que a su vez influenciadas por la interacción de numerosos sistemas genéticos como son los genes de los sistemas: PTPN22 (C1858T) y HLA-DRB1*, entre otros⁽²⁾. No se conocen muy bien los mecanismos moleculares que regulan la expresión funcional, lo que si se conoce es que estos genes son activados por mecanismos multifactoriales estocásticos. Los genes son necesarios más no suficientes para que se presente la enfermedad. Otros mecanismos moleculares que pudieran estar implicados, es el complejo trimolecular; formado por el HLA, el antígeno y el receptor del linfocito T, los cuales contribuyen al desarrollo, predisposición y progresión de enfermedades autoinmunes.

Artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune inflamatoria y sistémica, cuya causa aún no se ha precisado. Varios factores son importantes en su patogenia, entre ellos: factores ambientales, los genéticos asociados con el MHC y con los genes que codifican la síntesis de inmunoglobulinas, del receptor de célula T, citocinas y moléculas de adhesión, entre otros. Estos factores, al interactuar entre sí median el daño Articular propio de la enfermedad, con participación de los eventos de la respuesta inmune⁽³⁾.

Artritis Idiopática Juvenil (AIJ) es la enfermedad más común en la práctica reumatológica pediátrica y la menos estudiada inmunogenéticamente. A diferencia de Artritis reumatoide (AR) del adulto, (AIJ) tiene subgrupos clínicos, lo que la hace más interesante desde el punto de vista genético para estudios genéticos y moleculares. En su etiopatogenia se han identificado varios factores que en su conjunto explicarían el inicio y la perpetuación de la respuesta inflamatoria la cual afecta las articulaciones y tejidos vecinos que de no ser controlados llegan a destruirlos, tal como sucede en otras enfermedades autoinmunes. La patogénesis de la enfermedad puede determinarse por alteraciones a nivel de complejo trimolecular, constituido por un antígeno putativo, el receptor de linfocitos T y el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). La etiopatogenia de las dos enfermedades es aún desconocida ⁽⁴⁾, se han descrito factores como trauma físico, estrés psicológico e infecciones, etc. Está claro que su patogenia es autoinmune y que se presentan en un individuo genéticamente predispuesto.

El presente estudio está enfocado en la búsqueda de polimorfismos comunes polimorfismos presentes en tres sistemas genéticos asociados con Artritis Reumatoide del Adulto De Instalación Temprana y Artritis Juvenil Idiopática Poli Articular; para contribuir a la comprensión de los posibles mecanismos patogénicos comunes de ambas enfermedades, al determinar la importancia del porqué de estos genes HLA-DRB1* y PTPN22 (C1858T)⁽⁵⁾ como marcadores genéticos de susceptibilidad o protección y sus posibles papeles como marcadores de riesgo, diagnóstico, pronóstico e inclusive como posibles blancos terapéuticos. Además a nivel de la Costa Caribe Colombiana es el segundo estudio realizado por el grupo de investigación en el cual se relacionen las dos enfermedades en cuanto a los epitopes compartidos (70-74) en el cual se busquen bases genéticas comunes.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los estudios postulan el posible papel que pueden estar cumpliendo los polimorfismo de los genes HLA-DRB1* y PTPN22 (C1858T) en la etiopatogenia de las dos patologías. La mayoría de estos estudios han evaluado de manera separada la asociación de un determinado gen con estas enfermedades autoinmunes ^(5,95).

Son pocos los estudios en los cuales se toma de manera conjunta los genes HLA-DRB1* y PTPN22 (C1858T). La mayoría de las investigaciones de asociación toman dos genes como el HLA DRB1 y el PTPN22 ⁽⁶⁾. En la actualidad hacen falta estudios experimentales que sean más concluyentes y que determinen de manera específica la relación de estos genes con el desarrollo de (AIJ) Poliarticular y Artritis Reumatoide de Instalación Temprana.

Las investigaciones hasta ahora planteadas son controversiales ya que la mayoría de los investigadores no han podido correlacionar de manera concluyente, la participación de dichos genes en determinada patología o población y en otros estudios su correlación no ha sido posible por la escogencia de una buena selección de la muestra o población muy baja o por que los trabajos no pueden ser replicados metodológicamente.

Se conoce de manera parcial los mecanismos moleculares y celulares que pueden contribuir de manera sinérgica o complementaria en la activación de Linfocitos T Reguladores, para que estos tengan una expansión y proliferación clonal a linfocito T auto reactivos, así mismo como pueden interactuar los polimorfismos

moleculares de los PTPN22 (C1858T) y la presentación del HLA DRB1*^(5,95) pero no como un gen puede potencializar la función del otro, produciendo una mayor agresividad de la enfermedad o por el contrario disminuyéndola, actuando como protector en determinada circunstancia de acuerdo al sitio celular o estado conformacional de las moléculas codificadas por estos genes (activos o inactivos) en el cual se encuentren, predisponiendo a una mayor morbimortalidad en las dos patologías.

Varios sistemas genéticos parecen estar implicados en la susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes. Algunos de estos sistemas son específicos y otros comunes para varias enfermedades autoinmunes como en Artritis Reumatoide del Adulto, Diabetes Mellitus tipo 1, Esclerosis Múltiple, Enfermedad De Addison, Lupus Eritematoso Sistémico, Artritis Idiopática Juvenil, entre otros⁽⁷⁾. Las asociaciones de los polimorfismos genéticos y moleculares con desordenes autoinmunes múltiples son fundamentalmente sistemas genéticos como: el gen del alelo especialmente HLA-Clase II-DRB1 ubicado en el cromosoma 6p21, y el gen PTPN22 que codifica para la fosfatasa linfoide de la tirosina (LYP) ubicado en el cromosoma 1p13, cuya principal función radica en la capacidad de Csk y Lyp para inhibir la señalización de receptor de células T lo cual requiere de una asociación física⁽⁶³⁾. Estas moléculas actúan conjuntamente para inactivar Lck; una kinasa de la familia Src que está involucrada en eventos de señalización de las células T. 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 a una configuración inactiva, causando una regulación negativa de la vía de señalización de células T. HLA-DRB1* y PTPN22 codifican para moléculas que juegan un papel funcional en la respuesta inmune los cuales están implicados activamente en la activación de linfocitos T autoreactivos en Artritis Reumatoide de Instalación Temprana y para Artritis reumatoide Juvenil Poliarticular. Por otra parte, los polimorfismos de los genes que afectan su función pueden contribuir en el accionar de la enfermedad autoinmune por mecanismos todavía desconocidos. Falta mucho por comprender sobre la manera como las moléculas anteriormente

mencionadas codificadas por estos genes, predisponen o no a la activación de los linfocitos T auto reactivos y del cómo la función aberrante de estas células pueden accionar la autoinmunidad.

2. JUSTIFICACION

Las enfermedades autoinmunes ocurren como resultado de defectos en uno o más componentes de la respuesta inmune, dando como resultado la proliferación de Linfocitos T auto reactivos. Los mecanismos por los cuales se regulan tales componentes a un se desconocen en su gran mayoría, principalmente en el cómo los Linfocitos T los cuales reconocen antígenos propios causan daños a uno o más órganos del sistema inmune. Las enfermedades autoinmunes afectan alrededor del 5 al 10% de la población mundial. La etiología de estos desordenes es desconocida pero se piensa que puede resultar de una interacción compleja entre los factores genéticos y ambientales ⁽²⁾.

Artritis Reumatoide presenta una distribución universal, estimándose una prevalencia mundial en torno al 1% y una incidencia aproximada de 0.5 casos anuales por 1000 habitantes. Esta enfermedad conlleva además un importante costo económico, estimándose que supera los 1.2 millones de euros anuales, de los cuales 400 millones corresponden a gastos sanitarios. Las tasas más elevadas de prevalencia están entre los 40 a 60 años y es más frecuente en mujeres con una relación de 3:1 ⁽⁸⁾.

Desde hace varios años, diferentes estudios en diversos países han asociado lugares genéticos que parecen estar implicados en la susceptibilidad de diferentes enfermedades con un fondo genético común con la predisposición a la enfermedad que pudiera ser debido a una combinación de genes que actúan de manera general y otros de manera muy específica.

Algunos de estos genes como los del Complejo Mayor de Histocompatibilidad son específicos para una determinada enfermedad como el HLA B7 en la Espondilosis

Anquilosante, mientras que otros parecen ejercer un efecto complementario sobre el proceso o desarrollo de la fisiopatología de la enfermedad en este caso autoinmune como lo es para la Artritis Reumatoide.

Artritis Reumatoide se caracteriza por inflamación crónica de las articulaciones y destrucción sinovial, es considerada clínicamente altamente heterogénea con un aumento progresivo de la severidad y progresión de la enfermedad aumentando la morbilidad con un diagnóstico tardío de la enfermedad, cuya frecuencia estimada en la población latinoamericana es aproximadamente del 0,4% ^(9, 10). Basándose en un predominio de los linfocitos Th2 (LT) en la sinovia de los pacientes con AR, estas células han sido señaladas como claves en el estudio de la AR y otras enfermedades autoinmunes (EAI), hasta tal punto que se ha propuesto que estas enfermedades son secundarias a la presencia de LT defectuosos ⁽¹¹⁾.

La prevalencia de Artritis Reumatoide en la población caucásica es del 1% y de 0.4% en la población Latinoamérica. Un estudio comunitario realizado en 1986 en Bogotá, encontró en la población femenina una prevalencia de 0.13%, Donde la incidencia de la AR ha sido reportada entre el 0.12 y 0.7 por 1000 personas año ^(1, 4, 12).

Artritis Reumatoide Juvenil (AIJ) es la enfermedad más común en la práctica reumatológica pediátrica y la menos estudiada Inmunogenéticamente. A diferencia de la Artritis reumatoide (AR) del adulto, la (AIJ) poliarticular tiene subgrupos clínicos bien definidos, lo que la hace más interesante desde el punto de vista genético (fenotipos). AR del Adulto se asocia a marcadores de autoinmunidad que implican subgrupos clínicos con una mayor morbilidad.

La mayoría de los estudios se han restringido a la región HLA Clase-II, constituyéndose como la región génica más importante, cuyo papel se ha demostrado en diferentes estudios concluyendo de manera consistente que este sitio cromosómico, contribuye con aproximadamente el 30% de susceptibilidad genética de la enfermedad ^(10, 95).

Para la mayoría de los trastornos autoinmunes, el patrón de herencia es muy complejo. El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) gen complejo que ha sido implicado como el componente genético importante en la predisposición a estas enfermedades, pero otros genes podrían estar involucrados.

En los últimos años diferentes investigaciones han avanzado en estudios de análisis de asociación y de ligamiento se han enfocado a tres o más regiones génicas: entre ellas la región del Antígeno Leucocitario Humano de la Clase II (HLA Clase II), ubicado en el cromosoma 6p21 ⁽⁴⁾, aunque es poco probable que los mismos genes sean los responsables de la predisposición a todas las enfermedades autoinmunes, un complejo de genes del Complejo Principal De Histocompatibilidad (MHC), en el hombre ha estado siempre implicado como un importante factor de riesgo genético sobre para la AR y AIJ. Sin embargo, para ninguna de las enfermedades autoinmunes la predisposición genética que confiere HLA no es ni suficiente pero si necesaria para el desarrollo de la enfermedad. Otro gen implicado es el gen de la Proteína Tirosina Fosfatasa, Non-Receptor Tipo 22 (PTPN22), en el cromosoma 1p13 ^(14, 15, 16). Un polimorfismo funcional de nucleótido único (SNP) C1858T en Proteína Tirosina Fosfatasa, Non-Receptor Tipo 22 (PTPN22) es un gen que codifica para una fosfatasa intracelular que pudiese tener efectos negativos sobre la regulación y activación de linfocitos T asociado con algunas enfermedades autoinmunes en caucásicos. Teniendo en cuenta en primer lugar, que las frecuencias de SNP pueden variar entre las poblaciones y en segundo lugar, que los estudios de replicación son importantes para confirmar las asociaciones anteriores, estudios previos han examinado la influencia del polimorfismo PTPN22 en enfermedades autoinmunes.

Cada uno de estos lugares cromosómicos (6p21, 2p33 y 1p13) con sus respectivos genes y Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNP'S) codifican para moléculas que son altamente cruciales en la cascada y activación de los linfocitos T en la autoinmunidad.

Es preciso entender como los mecanismos y polimorfismos de estos genes funcionan, activando mecanismos que en su gran mayoría son aun desconocidos y como algunos estudios de índole molecular y genéticos han contribuido a una mejor comprensión de los fenómenos moleculares que pueden estar sucediendo y pueden contribuir a la susceptibilidad o protección de Artritis Reumatoide Juvenil Poli Articular y Artritis Reumatoide del Adulto.

La importancia de encontrar genes asociados o de etiología común en Artritis reumatoide de Instalación Temprana y Artritis Idiopática Juvenil Poliarticular, contribuirá en la comprensión de los mecanismos patogénicos comunes de las dos enfermedades, su posible aplicación clínica como marcadores de riesgo, diagnóstico, pronóstico incluso como ya otros estudios lo han propuesto con el desarrollo de nuevos medicamentos como unos excelentes blancos terapéuticos.

La presente investigación se justifica en los recientes hallazgos y desarrollos sobre la comprensión de la manera como las moléculas codificadas por estos genes predisponen a la susceptibilidad, contribuyendo o no a la activación de los linfocitos T auto reactivos y cómo la función aberrante de estos genes accionan la autoinmunidad posiblemente en las dos patologías con un posible origen genético común, por lo tanto se requieren esfuerzos para comprender a nivel celular y molecular la etiología de estas enfermedades autoinmunes (AIJ) Poliarticular y AR de Inicio Temprano. Este es el segundo estudio realizado en la Región Caribe Colombiana desarrollado por investigadores del grupo de investigación en el cual tratan de encontrar marcadores genéticos comunes en el sistema MHC en (AIJ) Poliarticular y AR del adulto, sin embargo es el primer estudio realizado en el cual se analizan otros sistemas como el PTPN22, en la búsqueda de marcadores genéticos comunes y polimorfismos moleculares en ambas patologías. Actualmente no existe una prevalencia ni siquiera un estimado de la frecuencia de la enfermedad en la región Caribe colombiana.

3. ARTRITIS REUMATOIDE.

3.1. GENERALIDADES

El término Artritis Reumatoide (AR) fue acuñado por primera vez por Garrod en 1859; sin embargo la descripción inicial de la enfermedad en la literatura médica se le debe a Landré-Beau- Vais en 1800.

En la literatura no médica, el análisis de la correspondencia de madame de Sévigné (parís, 1626 - Grignan, 1696), permitió diagnosticarle retrospectivamente una AR, cuyo inicio se remontó a enero de 1679. Sin embargo si la Artritis se originó en el antiguo continente o provino del nuevo mundo es materia de constante discusión.

Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica, caracterizada por inflamación crónica, respuestas inmune humoral y células anormales e hiperplasia sinovial.

AR es una enfermedad inflamatoria crónica de las articulaciones diartrodiales, caracterizada por la hipertrofia de la membrana sinovial, la destrucción osteocartilaginosa y la deformación articular, cuya etiología es desconocida. Además de las articulaciones, la enfermedad puede comprometer cualquier otro órgano, siendo una enfermedad extra-articular en cerca del 30% de los pacientes. No obstante, AR no tiene características específicas y por lo tanto su diagnóstico se apoya en la cronicidad de la poliartritis, el carácter simétrico, la destrucción osteocartilaginosa y la exclusión de otro tipo de artropatías inflamatorias (enfermedades metabólicas, infecciosas, espíndilo artropatías).

AR se asocia a diversos factores de riesgo, entre los que cabe destacar: la edad avanzada (>65 años), la obesidad y los traumatismos continuados de las articulaciones ya sea por ejercicios físicos intenso o por determinados trabajos, etc. Se manifiesta principalmente por la presencia de un dolor “sordo” en las articulaciones afectadas, que inicialmente puede ser leve e intermitente pero que puede llegar a ser muy intenso y persistente; el dolor se puede asociar a otros síntomas como inflamación, rigidez y reducción de la movilidad y la funcionabilidad de los pacientes ^(8, 17).

Los mediadores de la inflamación pueden trasladar el trastorno a diferentes estructuras orgánicas. Algunos pacientes pueden solamente presentar un proceso inflamatorio en las articulaciones pequeñas, de breve duración y con lesiones articulares mínima, mientras que otros presentan una poliartritis progresiva e imparable que evoluciona hacia la aparición de deformidades articulares importantes. Ninguno de los síntomas y signos presentados en la AR son privativos de esta patología; dado que ningún hallazgo es específico, su diagnóstico no se efectúa solo por la presencia de datos positivos de la AR, sino por la caracterización y suma de diferentes datos. Los criterios actuales del ACR (escala desarrollada por la American Collage of Rheumatology para la clasificación de la AR) reducidos a siete en la forma clásica, aportan una sensibilidad del 91% y una especificidad del 89%.

Actualmente, los únicos criterios de diagnóstico de AR aceptados y utilizados universalmente son los propuestos por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) en 1987 para la clasificación de la enfermedad ⁽¹⁹⁾.

3.2. ARTRITIS REUMATOIDE DE INSTALACIÓN TEMPRANA.

La artritis reumatoide del adulto (AR) es una enfermedad heterogénea, que involucra pequeñas articulaciones, de causa desconocida, que da por resultado inflamación y daño poli articular intensos. Desde 1978 se mostró que la AR se

asocia con la HLA-DR4. Varios estudios que han confirmado la participación del DR4 en los factores etiológicos, en poblaciones muy diversas; en familias, está demostrada la segregación de los haplotipos que contienen al DR4 tienen un riesgo relativo de 4.6 de desarrollar AR. En algunos grupos étnicos, como en indios, paquistanís e israelitas, la asociación no es con el DR4, sino con el DR1, DR6 o DR10, lo mismo que en los caucásicos, negros u orientales DR4 negativo. ^(32, 41). El mecanismo de asociación permaneció desconocido, hasta que no se empezó a identificar, primero por cultivo mixto de linfocitos, que el DR4 tiene subtipos, y con técnicas moleculares se confirmó que existen 12 variantes alélicas, denominadas DRB1*0401-DRB1*0410. Así, el antígeno definido serológicamente como DR4, cuyas variantes no es posible identificar por medio de estas técnicas, es el producto de los 12 diferentes alelos en el locus DRB1. Estos alelos difieren entre sí por uno a cinco aminoácidos localizados entre los residuos 67 a 74 del dominio externo beta 1 de la cadena hipervariable del DR. Estos alelos DR4 están ligados a otros genes DQA1 y DQB1, lo cual genera una diversidad aun mayor dentro de la familia de los haplotipos DR4. Es evidente que ciertos subtipos condicionan la susceptibilidad a la AR (DRB1*0401, *0404, *0405, *0408) en caucásicos y que los alelos *0402, *0403 y *0407 parecen conferir resistencia al padecimiento. ^(32, 41, 45, 71). Estos datos indican que la variación estructural en ciertos sitios de la cadena DRB1 y sus efectos en el reconocimiento de los linfocitos T, están muy relacionados con la inmunopatogenia en AR. En la tercera región hipervariable del primer dominio DRB1, donde se hallan los residuos 67 a 74 en alfa hélice del sitio de unión al antígeno, se predice que ciertos aminoácidos interactúan con el péptido que se une al nicho del de clase II y con el TCR. El alelo *0401 asociado con AR se caracteriza por tener aminoácidos neutros o básicos en las posiciones 70 (Gln), 71 (Lis) y 74 (Ala), mientras que *0402, *0403 y *0407, que posiblemente protegen de la AR, tienen residuos ácidos en 70, 71 o 74. En los alelos de susceptibilidad *0404 y *0408 hay una sustitución de Arg por Lis en la posición 71 que no involucra cambios de carga. En la posición 86 el *0404 difiere del *0401 en una sustitución de Val por Gli, mientras que el *0408 expresa Gli al igual que el *0401 ^(32, 41, 45, 71). Ver figura 1

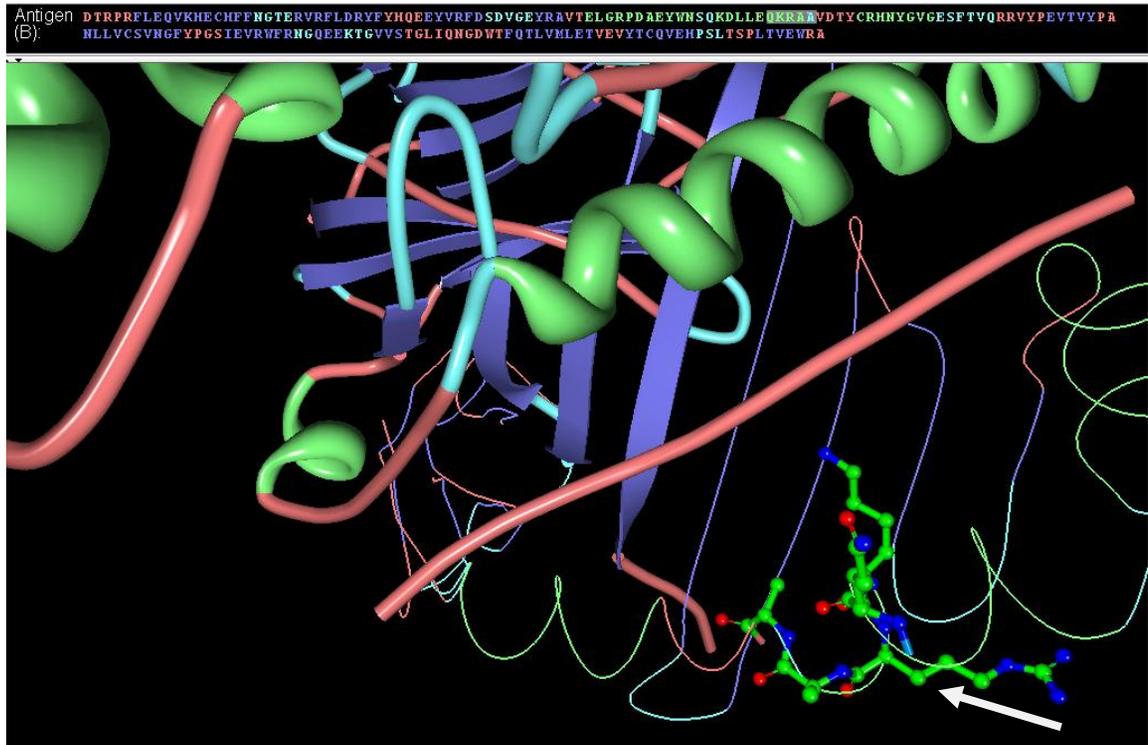


Fig.1. Aminoácidos que se encuentran en el bolsillo de la región hipervariable de la cadena beta 70 74 del HLA DRB1 (Immunepitope software MBP Epitopeviewer 2.0)

En algunos grupos, *0404 no se asocia para alterar las características de unión de los clase II o la forma en que el péptido propio es presentado e interactúa con el TCR para desencadenar la respuesta auto inmunitaria.

La hipótesis del epitope compartido o común se ha refinado y consiste en lo siguiente:

Desde el informe de Stastny, se han reportado una gran cantidad de alelos **MHC: HLA/DRB1** en diversas poblaciones étnicas; tales hallazgos fueron unificados en 1987 por Peter Gregersen bajo la hipótesis de “epitope Compartido” (40). Para la Artritis Reumatoide se han reportado la hipótesis de “epitopes compartidos”

asociados tales como (⁷⁰QRRAA⁷⁴, ⁷⁰RRRAA⁷⁴, ⁷⁰QKRAA⁷⁴), los cuales comprenden la tercera región hipervariable comprendida en la posición 70-74 de la cadena B de la molécula HLA-DR (Ver Tabla 1). La localización del epítopo compartido el cual se encuentra dentro de la fosa de anclaje al péptido, lo cual involucrado directamente en la presentación antigénica, lo cual sugiere varios mecanismo funcionales para explicar la susceptibilidad a la enfermedad. Los aminoácidos de carga negativa (ácido aspártico, ácido glutámico) encajan perfectamente cuando esta secuencia de aminoácidos forma parte del bolsillo 4. Los alelos HLA-DR, comparten ciertas características comunes, cada alelo posee una especificidad particular determinada por los aminoácidos que conforman las regiones que interactúan con los péptidos antigénicos y los que forman las moléculas HLA-Clase II, pueden describirse y predecirse mediante simulaciones teóricas computacionales basadas en los tres principales momentos multipolares (monopolar, bipolar, cuadrupolar) de la distribución continua de cargas electrostáticas. Es de esclarecer que la hipótesis del epítopo compartido no explica toda la susceptibilidad genética conferida por el HLA, pues a pesar de su robustez de las asociaciones con el locus DRB1, el riesgo absoluto de desarrollar artritis reumatoide en individuos portadores de alelos codificantes para el epítopo compartido es relativamente baja. Un estudio realizado en población caucásica normal mostro ser positiva para el alelo HLA-DRB1*04, lo que indica que la presencia del epítopo compartido no es necesaria ni suficiente para desarrollar la enfermedad ⁽¹¹⁸⁾.

3.3. Diagnóstico

Según estos criterios, el diagnóstico de AR requiere de la constatación de al menos cuatro de las siete manifestaciones clínicas ⁽²⁰⁾:

- Rigidez matutina de más de una hora de duración, antes de la mejoría máxima, durante al menos 6 semanas consecutivas.

- Tumefacción articular o derrame articular durante al menos 6 semanas consecutivas, comprobado por un médico, de tres o más de las siguientes áreas articulares del lado derecho o izquierdo: interfalángicas proximales (IFP), metacarpofalángicas (MCF). Por ejemplo, la afectación de ambos tobillos se contabiliza como la afectación de dos áreas articulares.
- Tumefacción articular o derrame articular en muñeca, MCF o IFP durante al menos 6 semanas consecutivas, comprobado por un médico simétricos ⁽²¹⁾. (Lado derecho e izquierdo) de las articulaciones referidas en el punto 2, durante al menos 6 semanas consecutivas, comprobado por el médico.
- Nódulos subcutáneos en zonas de prominencia ósea, superficies extensoras o regiones yuxta articulares, comprobado por un médico.
- Presencia de factor reumatoide (FR) en suero, detectado por un método que sea positivos en menos del 5% de la población control.
- Evidencia radiográfica en las manos o en las muñecas de erosiones articulares u osteopenia en, o alrededor de, las articulaciones afectadas.

Los criterios de clasificación (y no de diagnóstico) de AR fueron definidos con fines epidemiológicos. Estos criterios han mostrado tener una sensibilidad del 89%, una especificidad del 74%, un valor predictivo positivo del 57% y un valor predictivo negativo del 94% ⁽²²⁾. En estos criterios, por definición, las características clínicas deben estar presentes por lo menos durante 6 semanas antes de clasificar un paciente con AR.

En la práctica clínica, la cronicidad es importante para definir el carácter "reumatoide" de una poliartritis. Muchos pacientes con AR señalan haber presentado dolores pasajeros varios años antes de haber presentado un episodio constante (>6 semanas) ⁽²⁰⁾.

El inicio de la AR es considerado a partir del comienzo del episodio constante y no pasajero, aún aplicando esta norma, el carácter "reumatoide" puede ser reconsiderado a medida que la enfermedad evoluciona. En efecto, en el 59% de los pacientes con poliartritis no diferenciada pueden cesar los síntomas, y el 16% de pacientes con AR pueden estar en remisión 2 años después de la presentación de la enfermedad.

La remisión en AR es definida por la ausencia de fatiga, dolor e hinchazón articular y una rigidez matinal inferior a 15 minutos, así como una velocidad de sedimentación <20mm/h en hombres y < 30 mm/h en mujeres. De otra parte, muchos pacientes que no cumplen criterios para ser clasificados como AR, independientemente de la seropositividad para el Factor Reumatoide, (FR) pueden presentar oligoartritis o poli artritis crónicas y persistentes, no asociadas a ninguna otra entidad (espondiloartropatía, enfermedades metabólicas, infecciones virales). Estos pacientes son reumatoides en la clínica, pero no pueden ser considerados como tales en los estudios epidemiológicos.

3.4. Patogénesis

Las manifestaciones clínicas de la AR se inician con la localización de los leucocitos en el líquido sinovial, que cuando es son activados producen dolor e inflamación. Estos leucocitos producen mediadores proteicos (citoquinas) que inician la inflamación, atraen otras células inmunológicas al sitio, activan células residentes, y causan un exceso en la producción del líquido sinovial.

Las células T llegan a la articulación por un proceso complejo que media el paso de las células a través del endotelio vascular hasta el tejido sinovial. En este proceso, las células T se adhieren al lumen del vaso capilar por medio de moléculas de adhesión expresadas en las células endoteliales como las ICAM y las VCAM. Esto resulta en el transporte de las células T hacia el líquido sinovial.

Después que estas células han llegado al sinovio, pueden interactuar con los macrófagos tipo A de los sinoviocitos; como consecuencias de esta interacción, se activan otras células T y se producen varias citoquinas.

Estas alteraciones inmunológicas pueden llevar a la producción del Factor Reumatoide (FR). Este factor es una inmunoglobulina M (IgM) que funciona como un anticuerpo contra la IgG, formando complejos inmunitarios. Estos complejos aparecen en el suero de los pacientes generalmente al inicio de la enfermedad ⁽²³⁾. Altos niveles del Factor Reumatoide se correlacionan con una mayor severidad de la enfermedad, lo que puede resultar en un aumento de la inflamación, al depositarse estos complejos en la articulación y activarse el complemento, conllevando a producir una respuesta autoinmune más acentuada ⁽²⁴⁾.

El recubrimiento sinovial es un tejido bien vascularizado que sella la articulación manteniendo una presión negativa y asegurando la presencia de fluidos lubricantes en el espacio articular. Las capas externas de la capsula articular, se ven algunas células grasas, y finalmente recubriendo el espacio articular, existe una membrana sinovial.

Esta membrana consiste en sinoviocitos de tipo A y B. Estas células tienen funciones fagocíticas y pueden interactuar con las células presentadoras de antígenos. Estos sinoviocitos pueden sintetizar ácido hialurónico, el componente mayoritario del líquido sinovial. Esta fisiología única, y la falta de una membrana basal real alrededor de los capilares sinoviales, permiten que se acumule líquido y contribuye con la localización de las células inflamatorias en el sinovio reumático ^(11, 25).

Los leucocitos entran a los tejidos a través de varios procesos ⁽²⁵⁾:

- Adhesión a las paredes de las células endoteliales
- Migración a través de la pared.
- Extravación hacia los tejidos.

En los procesos normales la migración leucocitaria inicia con la expresión de moléculas de adhesión (L-selectina, CAM-1) en la superficie de los linfocitos. Esta adhesión es débil y permite que las células migren por la superficie interna de los capilares. Este movimiento hace que los leucocitos se adhieran cada vez más firmemente. Una vez que esto sucede, los leucocitos se adelgazan y migran hacia las uniones entre las células endoteliales, donde otros ligandos median la diapédesis hacia los tejidos. Los macrófagos también utilizan un sistema similar al de los linfocitos para llegar hasta la membrana sinovial. Las citoquinas también contribuyen a la extravación de los linfocitos, al alterar la expresión de las moléculas de adhesión; numerosas citoquinas regulan la adhesión celular; incluyendo la interleucina-1B, y el Factor De Necrosis Tumoral (TNF), dos citoquinas abundantes en los pacientes con AR ⁽¹¹⁾.

La membrana sinovial en pacientes con AR está caracterizada por una hiperplasia, aumento de la vascularidad y un infiltrado de células inflamatorias, principalmente células T CD4⁺, las cuales son las principales responsables de la respuesta inmune mediada por células. La principal función del Complejo Mayor De Histocompatibilidad Clase II (HLA-II) es la presentación de péptidos antigénicos a las células CD4⁺, con lo cual se propone fuertemente que la AR es causada por un antígeno artrítico no identificado. El antígeno puede ser exógeno (como proteína viral) o una proteína endógena ^(26, 27).

Los marcadores de superficie (CD) identifican subtipos de linfocitos. Los linfocitos B se definen por la presencia de CD19⁺ y CD20⁺. Los linfocitos T por la presencia de CD3⁺ y CD4⁺. Los linfocitos T colaboradores CD25⁺ y los linfocitos T citotóxicos por CD8⁺. Las células que pertenecen a los CD8⁺ han sido asociadas con funciones supresoras, mientras que los del tipo CD4⁺ median las reacciones de hipersensibilidad retardada ⁽¹¹⁾.

Las células T que se acumulan en el tejido sinovial son predominantemente CD4+, que se expresan un fenotipo de células de memoria. Estas células de memoria se acumulan en el tejido sinovial ya que existe sobre expresión de moléculas de adhesión, permitiendo su unión al endotelio vascular y su movimiento hacia el sinovio. Estas células podrían estar involucradas en la patogénesis de la AR, al mediar reacciones de hipersensibilidad retardada, o ayudando a la producción de anticuerpos (incluyendo el factor reumatoide) y la diferenciación de células B, o ambas ⁽²⁸⁾.

Los CD4⁺ se categorizan en dos tipos de funciones de acuerdo a las citoquinas que producen. Los T colaboradores tipo 1 (TH1) se caracterizan por producir una serie de citoquinas pro inflamatoria, tales como IL-2, interferon gama, TNF alfa, que median las reacciones de hipersensibilidad retardada. Los TH2 producen citoquinas (IL-4, IL-6, IL-10) que se encargan de la diferenciación y activación de los linfocitos B.

La inmunopatología del sinovio al comienzo de la enfermedad, representa una respuesta clásica de hipersensibilidad retardada. Se cree que en el transcurso de la enfermedad, los sinoviocitos A producen IL-1B, TNF-alfa, e IL-8, los cuales median la destrucción del cartílago y otros tejidos relacionados con las articulaciones. La IL-8 podría ser la responsables de atraer neutrofilos, el tipo de células principalmente encontradas en las articulaciones de los pacientes con AR. La producción de IL-6 también contribuye a la patología de la enfermedad, ya que se relacionan los niveles de esta citoquina con los niveles elevados del Factor Reumatoide, inclusive, la IL-6 aumenta la resorción ósea y puede jugar un papel importante en la osteoporosis periarticular característica de la AR Temprana. Los niveles de IL-6 se correlacionan con los niveles de proteína C reactiva, un indicador de la actividad de la enfermedad ⁽²⁹⁾.

La IL-1B, induce la producción de metaloproteinasas que se relacionan con la destrucción del cartílago. El TNF-alfa y la IL-1 son potentes estimuladores de las

células mesenquimales, así como fibroblastos sinoviales, osteoclastos y condrocitos; estas liberan metaloproteinasas de la matriz las cuales son destructoras tisulares.

Además, la IL-1 y TNF-alfa inhiben la producción de inhibidores de metaloproteinasas por los fibroblastos sinoviales. Esta acción dual es la que genera el daño en la articulación. Además de inducir la producción de IL-11, el TNF-alfa estimula el desarrollo de osteoclastos, los cuales son responsables de la generación del hueso.

Esta activación de macrófagos, linfocitos y fibroblastos, así como sus productos pueden estimular la angiogenesis, lo cual podría explicar el aumento de la vascularidad encontrado en la sinovia de pacientes con AR ⁽²³⁾.

Los mecanismos que protegen al organismo de infecciones o malignidades son los mismos que causan la destrucción del cartílago en la AR, en estos pacientes los mecanismos de destrucción tisular atacan tejidos normales en lugar de microorganismos invasores o células malignas ⁽²³⁾.

Estos procesos de destrucción están mediados por las células T citotóxicas, macrófagos, y otras células capaces de producir metaloproteinasas que digieren el cartílago. Los neutrófilos son las células predominantes en el fluido sinovial de los pacientes con AR, que destruyen patógenos que causan la liberación de radicales libres del oxígeno. En el líquido sinovial de estos pacientes, los niveles de especies reactivas de oxígeno se encuentran elevados, sin embargo, no se conoce su papel en el daño tisular.

El óxido nítrico es un neurotransmisor que mantiene el tono vascular. Este transmisor liberado por la actividad de las enzimas inducibles media la destrucción de algunos patógenos extracelulares y células tumorales. El óxido nítrico causa la apoptosis de los condrocitos, afecta la proporción Th1/Th2, y juega un papel

importante en otros procesos inflamatorios y destructivos. Este neurotransmisor se encuentra aumentado en el plasma y en los macrófagos sinoviales de los pacientes con AR ⁽²⁴⁾.

Las células T y los macrófagos en el sinovio de los pacientes con AR también producen varias citoquinas que dañan el tejido directamente o por medio de una cascada de reacciones, tales como la inducción enzimática. Las citoquinas asociadas con Th1 y Th2 median la inflamación en el sinovio y el daño a los tejidos articulares ⁽²⁴⁾.

El TNF-alfa y la IL-1B están directamente relacionadas con la destrucción de los tejidos: la interleucina lo hace directamente por medio de metaloproteinasas, particularmente colagenasas; y el TNF por medio de sus efectos citotóxicos. Los niveles de IL-1 y TNF-alfa están elevados en casi la mitad de los pacientes AR ⁽³⁰⁾.

La apoptosis aumenta en el tejido sinovial de los pacientes con AR. Durante la respuesta inmune, en donde la apoptosis elimina predominantemente a las células activadas, es decir aquellas células programadas para llevar a cabo una función específica, tales como una enzima o síntesis de citoquinas.

3.4.1. Factores que intervienen en la patogenia de la enfermedad ^(3, 96)

Dentro de estos factores se encuentran:

- Genéticos: HLA y no HLA.
- Inmunológicos.
- Deficiencias humorales.
- Defectos primarios.
- Defectos congénitos en proteínas del complemento (deficiencias de C1q, C4 o C2).
- Deficiencias de Proteína Amiloide Sérica.
- Deficiencias de DNAasa.
- Deficiencias de la inmunoglobulina A IgA.
- Defectos secundarios.

- Defectos adquiridos del complemento Angio Edema Hereditario
- Defectos celulares.
- Defectos primarios.
- Deficiencias de Fas/Fas ligando
- Polimorfismo del receptor fcy RIII
- Defectos secundarios.
- Infección por VIH
- Hormonales.
- Efectos del género

Embarazo

- Lactancia
- Prolactina
- Dehidroepiandrosterona

Ambientales

- Agentes infecciosos
- Medicamentos y vacunación
- Toxinas
- Luz ultravioleta

4. EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA DE ARTRITIS REUMATOIDE.

Los datos epidemiológicos suministrados por diferentes estudios a nivel mundial, muestran una notable contribución de factores genéticos que intervienen de manera directa o indirecta para el desarrollo o susceptibilidad a la (AR).

La descripción epidemiológica de la AR sugiere que los efectos genéticos tiene una alta contribución sobre la susceptibilidad y presentación de la enfermedad. La prevalencia de la AR se encuentre entre 0.5 y el 10% en Europa y en la población Norte Americana ^(2, 10).

La prevalencia de la Artritis Reumatoide en la población caucásica es de más o menos del 1% y de 0.4% en la población Latinoamérica (Linos et al. 1980; Lawrence et al. 1989; Hochberg 1990; G. Orozco et al. 2006), sin embargo existen excepciones muy interesantes ⁽¹⁰⁾.

4.1. PREVALENCIA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE.

Existen múltiples estudios que demuestran como en ciertas poblaciones: Caribeña, africana, europea y UK, existen alelos que siguen protección a la enfermedad. Estos datos también se dan en población China y Japonesa, donde epitopes muestran una consistencia baja de la AR y (AIJ) Poli articular con el alelo HLA-DR*04 ^(9, 22, 31, 32, 33, 34, 40).

Otros estudios de casos y controles sobre prevalencia de AR en grupos familias conducen a pensar y demostrar que existe susceptibilidad a desarrollar la enfermedad en familias en estudios de casos control de asociación, comprobándose el papel genético que tiene la presentación de la misma ya sea por segregación o agregación familiar ^(10, 36, 37).

En población caucásica de los estados unidos la prevalencia de la AR ha sido calculada en 1%. En tres diferentes poblaciones caucásicas de Europa continental la prevalencia de la AR fue inferior al 0.5%. Estudios comparativos y metodológicamente similares podrían confirmar si estas diferencias entre norte América y Europa no corresponden a datos subestimados y por lo tanto examinar las posibles condiciones ambientales asociadas ⁽¹⁰⁾.

La más alta prevalencia de AR ha sido observada en tribus de estados unidos tales como los Yakima - 6%, Chippewa - 5.3% y Pima - 5.3%. Las más bajas prevalencias han sido observadas en poblaciones de raza negra, tanto de África como de otras regiones, con un rango entre el 0 y el 0.1% ^(12, 38).

Un estudio comunitario realizado en 1986 en Bogotá, encontró en la población femenina una prevalencia de 0.13%. La incidencia de la AR ha sido reportada entre el 0.12 y 0.7 por 1000 personas año ⁽¹⁰⁾.

4.2. MORTALIDAD.

Habitualmente se calcula y expresa por la tasa de mortalidad estandarizada (TME), que corresponde a la relación entre muertes observadas y muertes esperadas. La revisión de los estudios de mortalidad en AR hecha por Rueda et al, mostró un aumento de ésta. En Colombia, un estudio retrospectivo llevado a cabo en el hospital San Juan De Dios (Bogotá) mostró que el 15% de las muertes de pacientes con AR se debió a la enfermedad ⁽¹⁰⁾.

5. EPIDEMIOLOGIA ANALITICA O MOLECULAR DE ARTRITIS REUMATOIDE.

5.1. FACTORES GENÉTICOS

En poblaciones caucásicas, la susceptibilidad a la enfermedad está asociada a genes HLA-DRB1* que codifican residuos de aminoácidos similares de la tercera región hipervariable de la cadena beta, en las posiciones 70-74, los cuales son denominados "Epítotope Reumatoide" (ER) ⁽¹⁰⁾.

El ER está conformado por las secuencias QRRAA, QKRAA o RRRAA (Q: GLUTAMINA, R: ARGININA, A: ALANINA, K: LISINA) (39) Ver tabla 1.

Tabla 1. Revisión de alelos que expresan el epítotope en una población caucásica

ALELO HLA-DRB1*	SECUENCIA DEL EPITOPE
*0101	QRRAA
*01021	QRRAA
*01022	QRRAA
*0104	QRRAA
*0105	QRRAA
*04011	QKRAA
*04012	QKRAA
*0404	QRRAA
*04051	QRRAA
*04052	QRRAA
*0408	QRRAA
*0409	QKRAA
*0410	QRRAA
*0413	QKRAA
*0416	QKRAA
*0419	QRRAA
*0421	QKRAA
*0423	QRRAA
*0424	QRRAA
*0426	QKRAA
*0428	QRRAA
*0429	QRRAA
*0430	QRRAA
*1402	QRRAA
*1406	QRRAA
*1429	QRRAA
*1430	QRRAA
*1001	RRRAA

Abreviaciones: Q: Glutamina, R: Arginina, A: Alanina, K: Lisina

http://www.Antibodyonline.com/fig/Data_Hlaa

Las moléculas HLA clase II, a las que pertenece el HLA-DRB1*, están conformadas por un heterodímero de dos cadenas, la cadena A o cadena pesada,

y la cadena B o cadena liviana; cada una de las cuales tienen dos dominios: $\alpha 1$ y $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$. Ver figura 2.

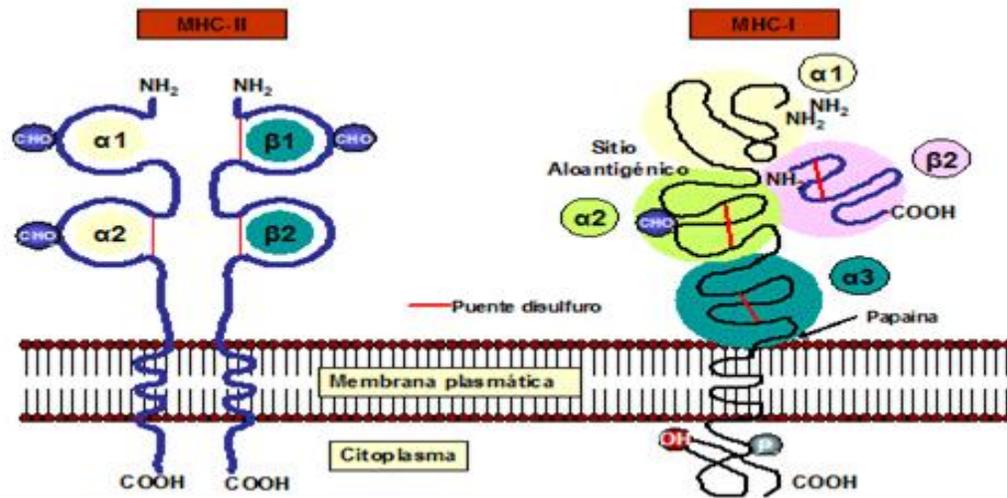


Fig. 2. Cadena Alfa Formada Por Tres Dominios Externos Denominados Alfa 1, Alfa 2 Y Alfa 3, Con Sus Dominios Transmembranal (TM) Y Uno Intracitoplasmático. (<http://epidemiologiamolecular.com/wp-content/uploads/2009/02/clip-image00219.gif>)

Se ha postulado que la presencia del ER en poblaciones caucásicas influencia no sólo la susceptibilidad a la AR, sino también la producción de factor Reumatoide y la severidad de la enfermedad, manifestada por un mayor grado de destrucción articular evaluado radiológicamente y por la presencia de manifestaciones extra-articulares tales como nodulosis y vasculitis. La asociación de la AR con antígenos del sistema HLA puede variar con la raza. Pacientes afro colombianos de Quibdó, hispanos de nueva york, como en la mayoría de pacientes afro-americanos de la ciudad de Birmingham (E.U), la asociación con genes DRB1* no fue demostrada¹. De la misma manera, en pacientes chilenos de Santiago se reportó una leve asociación con DR4; a pesar de que los subtipos más frecuentes fueron DRB1*0404 y *0408, en el 46% de los casos la susceptibilidad a la

¹ Juan Manuel Anaya. Genes y Artritis Reumatoidea. Revista de Reumatología. Online: <http://www.encolombia.com/reumatologia6399genes.htm> consultado: [02/02/2009]

enfermedad y la severidad de la misma fueron independientes del ER ⁽¹⁰⁾. Ver Tabla 2.

En Colombia algunos estudios han examinado la relación entre HLA y AR. Clavijo y cols., mostró que la frecuencia tanto del HLA-DR4 como del DR1 fue de 23% en 69 pacientes; este estudio no incluyó población control. Ávila y cols, en un análisis de 60 pacientes y 60 controles apareados por sexo, reportó un aumento de la frecuencia del HLA-DR4 en los pacientes (42% vs. 7%, riesgo relativo: 7.7, $p < 0.001$). Yunis y cols. Estudiaron 8 pacientes de la tribu guambiana y 24 controles apareados por raza. La presencia del HLA-DR4 se observó en 7 pacientes (87.5%) y en 15 controles (62.5%). Seis pacientes (75%) fueron HLA-DRB1*0404 mientras que este alelo fue observado en 8 de 15 controles (53.3%). Aunque la diferencia entre pacientes y controles no fue significativa, el hallazgo de genes caucásicos, tales como el HLA-DRB1*0404, en la población Guambiana sugirió un efecto de fusión, que apoya la hipótesis que considera el origen de la AR en el antiguo continente, dada la asociación entre éstos genes y la enfermedad ⁽²⁰⁾.

Tabla 2. Aminoácidos de la cadena Beta de las moléculas HLA de clase II codificadas por los alelos HLA-DRB1 asociados con artritis reumatoide.

		Residuos más afectados con el cambio del aminoácido ocupante																				
Alelo	9	11	12	13	14	26	28	29	30	37	38	47	61	70	71	72	73	74	78	80	81	83
DRB1	*			†			*		*					†	†			†	†			
DRB1*0103	W	L	K	F	E	L	E	R	C	S	V	Y	W	D	E	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*0402	E	V	K	H	E	F	D	R	Y	Y	V	Y	W	D	E	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*1301	E	S	T	S	E	F	D	R	Y	N	V	F	W	D	E	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*0415	E	V	K	H	E	F	D	R	Y	Y	V	Y	W	D	R	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*0701	W	G	K	Y	K	F	E	R	L	F	V	Y	W	D	R	R	G	Q	V	R	H	Y
DRB1*0801	E	S	T	G	E	F	D	R	Y	Y	V	Y	W	D	R	R	A	L	Y	R	H	Y
DRB1*1201	E	S	T	G	E	L	E	R	H	L	L	F	W	D	R	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*1403	E	S	T	S	E	F	E	R	Y	N	V	Y	W	D	R	R	A	L	Y	R	H	Y
DRB1*1412	E	S	T	S	E	F	E	R	Y	N	V	Y	W	D	R	R	A	L	Y	R	H	Y
DRB1*1425	E	S	T	S	E	F	D	R	Y	Y	V	Y	W	D	R	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*1601	W	P	K	R	E	F	D	R	Y	S	V	Y	W	D	R	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*1602	W	P	K	R	E	F	D	R	Y	S	V	Y	W	D	R	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*0401	E	V	K	H	E	F	D	R	Y	Y	V	Y	W	Q	K	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*0409	E	V	K	H	E	F	D	R	Y	Y	V	Y	W	Q	K	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*0413	*	*	*	H	E	F	D	R	Y	Y	V	Y	W	Q	K	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*0416	E	V	K	H	E	F	D	R	Y	Y	V	Y	W	Q	K	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*0421	E	V	K	H	E	F	D	R	Y	S	V	Y	W	Q	K	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*0101	W	L	K	F	E	L	E	R	C	S	V	Y	W	Q	R	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*0102	W	L	K	F	E	L	E	R	C	S	V	Y	W	Q	R	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*0104	W	L	K	F	E	L	E	R	C	S	V	Y	W	Q	R	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*0404	E	V	K	H	E	F	D	R	Y	Y	V	Y	W	Q	R	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*0405	E	V	K	H	E	F	D	R	Y	Y	V	Y	W	Q	R	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*0408	E	V	K	H	E	F	D	R	Y	Y	V	Y	W	Q	R	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*0410	E	V	K	H	E	F	D	R	Y	Y	V	Y	W	Q	R	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*0419	E	V	K	H	E	F	D	R	Y	S	V	Y	W	Q	R	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*1402	E	S	T	S	E	F	E	R	Y	N	V	Y	W	Q	R	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*1406	E	S	T	S	E	F	E	R	Y	N	V	Y	W	Q	R	R	A	A	Y	R	H	Y
DRB1*1001	E	V	K	F	E	L	E	R	R	Y	A	Y	W	R	R	R	A	A	Y	R	H	Y

*Aminoácidos que presentan la mayor perturbación del potencial electrostático del bolsillo producida por el efecto del aminoácido ocupante sobre los residuos con los que interactúa.

†Aminoácidos que conforman el cuarto bolsillo de unión (*Pocket 4*).

El recuadro de línea discontinua resalta la secuencia ⁷⁰DERAA⁷⁴.

El recuadro de línea gruesa resalta la ubicación del epítopo compartido ⁷⁰(Q/R)(R/K)RA⁷⁴.

Secuencias de aminoácidos obtenidas de *IMGT/HLA Database* (102).

G: glicina; P: prolina; A: alanina; V: valina; L: leucina; I: isoleucina; M: metionina; C: cisteína; F: fenilalanina; Y: tirosina; W: triptófano; H: histidina; K: lisina; R: arginina; Q: glutamina; N: asparagina; E: ácido glutámico; D: ácido aspártico; S: serina; T: treonina.

6. FACTORES GENÉTICOS DE LA ARTRITIS REUMATOIDE ASOCIADOS AL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) CLASE II.

Resulta bien conocida la asociación existente entre la presencia del alelo HLA-DRB1*, con el dominio conocido como "epítoto compartido" (en los aminoácidos del 69 al 74 de la tercera región hipervariable del receptor de célula T (RCT) y AR. Se ha demostrado que la presencia de este epítoto es crucial, no sólo en el surgimiento de la enfermedad sino en la severidad y progresión de ésta; demostrándose cómo existe un denominado efecto dosis-genético, en el que la severidad de los síntomas depende de la presencia de este alelo y es así como individuos homocigóticos para éste, tendrán una enfermedad más agresiva, con erosión articular y participación sistémica.

Aunque se ha comprobado que en poblaciones no caucásicas, son otras las especificidades del HLA-DR (B1-0101, B1-0114), las que se asocian con la AR, el patrón de agresividad en presencia de estos alelos, se comporta de la misma forma que en el caso del epítoto crítico mencionado ⁽³⁾.

Retomando los estudios más numerosos, donde se demuestra la asociación HLA-DRB1*, se ha comprobado, que en la posición 71 del epítoto crítico, si el aminoácido presente es lisina, cuando se produzca la cooperación celular entre estas células T auxiliaoras, portadoras del DRB1*, las células DB segregarán factores reumatoides (FR) y la enfermedad será más agresiva; mientras que si el aminoácido presente en posición 71 es una arginina, el paciente no segregará FR y su enfermedad tendrá un mejor pronóstico.

La asociación del HLA con la AR, no está sólo restringida a los genes DR, sino que se propone un denominado haplotipo extendido, que involucra también a algunos genes DQ y a los genes TAP (que están codificados en la región III del MHC) y que son importantes en el procesamiento y transporte del antígeno, para su presentación adecuada; así se ha comprobado en la AR, una frecuencia mayor

de los genes TAP2 0101-1693, asociada con DRB1* y que participa en la instrucción postmítica del RCT.

6.1. ASOCIACIÓN CON HLA-DRB1.

Weyand y otros (1992) encontró que la severidad del RA, según lo reflejado en la ocurrencia de manifestaciones extra articular, está asociada un alelo en particular HLA-DRB1* 0401 en calidad de homocigoto ⁽⁴⁰⁾. Aunque genéticamente sean comunes los genes para ciertas enfermedades autoinmunes, las manifestaciones clínicas son heterogéneas; además de la formación de nódulos reumatoides, éstos incluyeron enfermedad pulmonar reumatoide, vasculitis reumatoide, el síndrome de Felty y el mononeuritis vasculítica reumatoide. Alelos HLA-DRB1* que codifican el “epitope compartido”; se asocian a susceptibilidad AR ⁽⁴¹⁾.

Kallberg y cols investigaron sobre las interacciones del gene-gene y del gene-ambiente en artritis reumatoide, específicamente, la interacción entre 2 factores de riesgo genéticos importantes de AR, el HLA-DRB1* compartió los alelos y el alelo de PTPN22 R620W del epitope compartido (SE), realizado en 3 grandes estudios de caso-control (un sueco, norteamericano y ultimo holandés). La interacción constante, definida como salida de la aditividad, entre los alelos del SE HLA-DRB1* y el alelo de PTPN22 R620W fue considerada en los 3 estudios positivo de susceptibilidad para artritis reumatoide para los anticuerpos a las proteínas citrulina (anti-CCP) ⁽⁴⁷⁻¹⁰²⁾. Los nuevos trabajos propusieron una hipótesis etiológica que pueden explicar la fuerte interacción entre fumadores y los alelos del SE HLA-DRB1, que puede contribuir a la citrulinación de proteínas en el pulmón y que pueda ocurrir la activación inmune contra tales proteínas por modificación postransduccional preferencial en los individuos que llevan los alelos del HLA-DRB1*, puesto que el citrulinación puede aumentar específicamente la afinidad entre una proteína y una cadena HLA-DR-beta que contiene el epitope compartido (SE).

6.2. GENES NO ASOCIADOS CON EL MHC.

6.2.1. Asociación PTPN22 con la Artritis Reumatoide.

La asociación de la AR con PTPN22 asociado a susceptibilidad con el alelo, C1858T de pacientes con AR, produciendo un cambio aminoacídico en la proteína en R620W SNP's PTPN22. Es posiblemente un alelo de riesgo que está presente en el aproximadamente 17% de los individuos blancos de la población en general y en el aproximadamente 28% de los pacientes con AR, posee una región rica en prolina P1 que es importante para la interacción con Proteína Kinasas CSK, alterando potencialmente la función normal de estas proteínas como reguladores negativos de la activación de la célula de T ^(2, 42).

Para determinar si otras variantes genéticas en PTPN22 contribuyen al desarrollo de la artritis reumatoide, Carlton y cols (2005) investigaron la región de la codificación de este gen en 48 pacientes norteamericanos blancos con AR e identificó 15 SNP's no anunciados en ningún estudio, incluyendo 2 SNP's de codificación en el dominio catalítico SH1. Entonces genotipificaron 37 SNP's en PTPN22 cercano en 475 pacientes con RA y 475 controles individualmente emparejados, y seleccionaron un subconjunto de marcadores para la réplica en los 661 pacientes adicionales con RA y 1.322 controles individualmente emparejados.

Los análisis de estos resultados predijeron una frecuencia del 1% en haplotipos comunes en norteamericanos blancos. El único haplotipo encontrado para determinar el alelo de riesgo fue R620W asociado fuertemente a la enfermedad, mientras que el otro haplotipo fue el SNP's R620, no demostró ninguna asociación. R620W, sin embargo, el estudio no explicó completamente la asociación entre PTPN22 y el AR, puesto que las diferencias significativas entre los casos y los controles persistieron en la muestra después de que los datos del haplotipo fueran estratificados por R620W.

Los análisis adicionales identificaron 2 SNP's en un solo haplotipo común que se asociaron independiente a AR de R620W en el gen PTPN22, sugiriendo por lo menos necesita una variante adicional para conferir susceptibilidad a AR ⁽⁴³⁾.

7. ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL

7.1. GENERALIDADES

Artritis Idiopática Juvenil (AIJ) es la enfermedad más común de las inmunodeficiencias en los jóvenes y en la práctica reumatológica pediátrica pero la menos estudiada inmunogenéticamente. A diferencia de la artritis reumatoide del adulto, la (AIJ) tiene ciertas variantes clínicas, lo que la hace más interesante desde el punto de vista genético (fenotipos). En su etiopatogenia se han identificado varios factores que en su conjunto explicarían el inicio y la perpetuación de la respuesta inflamatoria que afecta las articulaciones y tejidos vecinos, y que de no ser controlados llegan a destruirlos, tal como sucede en otras enfermedades autoinmunes ⁽⁴⁵⁾. La patogénesis de la enfermedad puede determinarse por alteraciones a nivel de complejo trimolecular, constituido por un antígeno putativo, el receptor de linfocitos T y el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH).

Artritis Reumatoide Idiopática Juvenil (AIJ) es una enfermedad difusa del tejido conectivo y la más frecuente en niños, cuya presentación clínica es proteiforme, cuya característica principal es la presencia de sinovitis crónica y destructiva.

El curso y la severidad son variables que ocasionan incapacidad física en diversos grados como también problemas psicológicos y sociales tanto en el paciente como en su familia.

La primera publicación sobre (AIJ) apareció en 1864, Cornil describió el caso de un paciente cuya enfermedad se inició a los 12 años y provocó deformaciones en varias articulaciones. En 1870 Moncalvo publicó en Portugal y en Brasil una monografía sobre un caso de artritis en la niñez.

Diamantberger en 1891 en su tesis doctoral dio a conocer la información colectada de 37 pacientes con la enfermedad de Still; caracterizó la forma sistémica de la

enfermedad en 1897, remarcando que se trataba de una enfermedad distinta a la artritis reumática del adulto ⁽⁴⁷⁾.

Los criterios diagnósticos establecidos para la (AIJ) son aparentemente simples: (AIJ) debe empezar antes de los 16 años, y ha de persistir al menos seis semanas, es necesario excluir otros diagnósticos identificables ⁽³⁴⁾. No hay pruebas de laboratorio diagnósticas precisas, por esto no extraña que la (AIJ) abarque diversos síndromes clínicos muy distintos, por el momento, los autores prefieren llamarla a (AIJ) o Artritis Crónica Juvenil (ACJ)

La etiopatogenia aún es desconocida, se han descrito factores como trauma físico, estrés psicológico, infecciones: pero hay seguridad en que su patogenia es inmune y se presenta en un individuo genéticamente predispuesto. La forma sistémica se asocia al antígeno de histocompatibilidad HLA DR5, la forma poliarticular al HLA DR4 y la forma oligoarticular a los antígenos HLA B27, DR5, DR8 ^(35, 10).

Se han informado múltiples anormalidades inmunológicas en (AIJ), las células B circulantes están aumentadas en pacientes con (AIJ) sistémica y poliarticular y es posible que la subpoblación positiva para CD5 esté aumentada de modo preferencial.

8. EPIDEMIOLOGIA GENETICA DE ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL

8.1. PREVALENCIA E INCIDENCIA

En la práctica reumatológica pediátrica es la menos estudiada inmunogenéticamente. A diferencia de AR del adulto, la (AIJ) tiene ciertas variantes clínicas, lo que la hace más interesante desde el punto de vista genético (fenotipos).

En Colombia (Suramérica) son escasos, sino ausentes, los trabajos realizados en el análisis de esta entidad. Sólo existen dos resúmenes: uno presentado en un Congreso de la Sociedad Colombiana de Reumatología y el otro en 1999 en el Congreso de la American Collage of Rheumatology. La enfermedad de por sí es poco conocida en el país. De ella no se conoce su prevalencia ni su frecuencia, como tampoco su morbilidad. Actualmente no existe un registro médico nacional que articule los esfuerzos encaminados a un mayor conocimiento de este padecimiento.

En su etiopatogenia se han identificado varios factores que en su conjunto explicarían el inicio y la perpetuación de la respuesta inflamatoria que afecta las articulaciones y tejidos vecinos, y que de no ser controlados llegan a destruirlos. En la mayoría de trabajos publicados la proporción de mujeres es mayor que la de varones, usualmente el porcentaje de pacientes de sexo femenino se halla entre el 57 y 73% y la distribución según forma de inicio muestra grandes variaciones ⁽³⁴⁾.

En los diferentes estudios no se muestran una diferencia significativa entre la frecuencia de sexos, 49.5 % fueron varones y 50.5% mujeres, pero en el grupo etéreo de mayor frecuencia de presentación de 10 y 14 años predominaron los varones ^(18, 34).

La forma de inicio más frecuente fue la Poliarticular seguida de la oligoarticular y la sistémica, en el estudio de Llerena, donde la Poliarticular es la más frecuente seguida de la sistémica y la oligoarticular.

El 1% de los pacientes tuvo antecedentes de enfermedades reumáticas en la familia, lo que está de acuerdo a lo señalado por la literatura. Los reportes sobre la incidencia de enfermedades reumáticas de pacientes con artritis reumatoide varían entre 2,3 y 16% debido a la existencia de agregación familiar tanto en (AIJ) como en las enfermedades reumáticas en general. El compromiso ocular más frecuente en (AIJ) es la iridociditis (uveítis anterior) su incidencia varía entre 8 y 24%, de ella derivan todas las complicaciones descritas a excepción de la queratoconjuntivitis sicca (QCS) que se manifiesta en una minoría de estos niños. La leucocitosis marcada, es un hallazgo común en esta entidad, se encuentra sobre todo en la variedad sistémica ⁽⁴⁷⁾.

8.2. CLASIFICACIÓN CLÍNICA

La (AIJ) corresponde a un grupo heterogéneo de cuadros clínicos con manifestaciones crónicas que varían en morbilidad. Es una artropatía inflamatoria crónica que afecta diferentes articulaciones en número y lugar diferente. Puede producir manifestaciones extra articulares, predominando estas últimas en el cuadro clínico de (AIJ) sistémica.

Por definición, el inicio de la enfermedad ocurre antes de los 16 años de edad y está clasificada en tres grupos clínicos: (AIJ) oligoarticular, (AIJ) Poliarticular y (AIJ) sistémica ⁽³⁷⁾. El diagnóstico es básicamente clínico, no hay exámenes para clínicos que permitan el diagnóstico definitivo de la misma. El Colegio Americano de Reumatología estableció en 1977 criterios diagnósticos. Véase Tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de AIJ según: ACR, EULAR, ILAR ⁽⁴⁸⁾

<i>La artritis reumatoide juvenil (ACR)</i>	<i>Artritis crónica juvenil (EULAR)</i>	<i>Artritis idiopática juvenil (ILAR)</i>
Sistémico	Sistémico	Sistémico
Poliarticular	Poliarticular	Poliarticular RF-negativos
Oligoarticular (pauciarticular)	La artritis reumatoide juvenil	Poliarticular RF-positivos
	Pauciarticular	Oligoarticular
	Menores artritis psoriásica	Persistentes
	Menores espondilitis anquilosante	Extendida
		Artritis psoriásica
		Enthesitis relacionados con la artritis
		Otras artritis

9. PAPEL DEL POLIMORFISMO DE LOS ALELOS HLA CLASE II EN ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL

En las enfermedades autoinmunes en el humano se ha podido documentar una asociación entre el polimorfismo de los alelos HLA clase I y clase II con susceptibilidad a desarrollar dichas enfermedades. Se ha postulado que en las enfermedades son hereditarias, complejas y poligénicas. La respuesta inmune dirigida contra el antígeno propio es crucial en la etiopatogenia de la enfermedad, y que esta respuesta estaría condicionada por una particular expresión o rearrreglo de los genes en un individuo. De esta forma, un alelo HLA específico podría favorecer la presentación antigénica de un péptido artritogénico a un repertorio de TCR predeterminado genéticamente para la auto reactividad ⁽⁴⁹⁾.

La (AIJ) es una enfermedad compleja, poligénica, en la cual se han podido documentar asociaciones no sólo con los genes asociados al CMH sino también con otros marcadores, tales como: genes promotores de IL-1, IL-6 e IL-10, TNF alfa/beta y el polimorfismo de la región variable de TCR, PTPN22, CTLA-4 entre otros ^(18, 34, 37, 43, 44). Aunque las asociaciones más consistentes y reproducibles han sido las descritas con el polimorfismo de los genes CMH, los otros marcadores genéticos complican el análisis de las bases genéticas de esta enfermedad, además es evidente que no existen razones para suponer que la (AIJ) sea diferente de las otras enfermedades autoinmunes en las cuales se ha podido documentar varios sistemas genéticos esparcidos por diferentes cromosomas asociados a la susceptibilidad y expresión de la enfermedad ^(5, 13, 50).

A pesar de muchos estudios encaminados a asociar antígenos de leucocitos humanos y artritis reumatoide juvenil, no está claro aún cuáles de los genes del CMH están directamente involucrados en la patogénesis de esta enfermedad, esto por ser una enfermedad heterogénea, hace más compleja su asociación con los alelos HLA.

Todos los estudios publicados han sido desarrollados en pacientes caucásicos y

anglosajones, muy pocos en grupos étnicos mestizos en la población del Caribe Colombiano uno desarrollado en la ciudad de Bogotá por el grupo de Reumatología de la Universidad Nacional y el grupo de Inmunología de la universidad del Norte ^(45, 88, 95).

La respuesta inmunitaria parece estar determinada en parte por el polimorfismo de las moléculas clase II del CMH, por el reconocimiento y la interacción entre péptidos artritogénico con las moléculas de HLA clase II y el Receptor de Células T CD4⁺ (TCR). El proceso biológico iniciaría una cascada de eventos que resultan en una respuesta inflamatoria, en una alteración de la inmunoregulación y, en su defecto, en una respuesta autoinmune.

Mucho se ha investigado e informado respecto a la asociación entre antígenos HLA y las diferentes formas de la enfermedad. También se han documentado asociación entre determinadas complicaciones de la enfermedad y la presencia o ausencia (factor de riesgo o factor protector) de ciertos antígenos HLA, sin embargo, existen significativas variaciones entre este tipo de asociación en los diferentes grupos étnicos o incluso dentro de la misma población caucásica. El informe de varios familiares con artritis reumatoide juvenil y de artritis reumatoide juvenil de gemelos idénticos apoya también la existencia de predisposición genética como un factor importante en la patogenicidad de la enfermedad ^(45, 51).

El haplotipo HLA-DR5 y DR8 en heterocigotos dobles pueden representar una forma de herencia pseudorecesiva de (AIJ) oligoarticular, especialmente cuando se detecta en hermanos de los pacientes. Este epítopo compartido podría tener un papel importante en la patogenia de la enfermedad. El subgrupo (AIJ) poliarticular RF⁺ clínicamente recuerda el cuadro clínico de AR en el adulto.

Un análisis de secuenciación de estos alelos ha revelado un incremento en las frecuencias de DRβ1*0401 y *0404 en población caucasoide y del alelo DRβ1*0405 en pacientes japonés. Todo lo anterior refuerza el concepto de que (AIJ)

poliarticular RF+ está estrechamente asociado desde el punto de vista fisiopatológico y genético en el adulto. De hecho, hoy está plenamente demostrado que la predisposición genética de la AR está asociada a los genes CMH clase II de algunos loci HLA DR β 1. Lo anterior ha dado origen a la teoría del «Epítoto Compartido». En resumen, un grupo de aminoácidos en la posición del motivo ubicado en la región alfa hélice del sitio unión con el péptido artritogénico, define un grupo de alelos HLA DR β 1*04 estrechamente asociado con susceptibilidad al desarrollo de AR del adulto ^(45, 51).

10. INMUNOGENETICA EN LAS ENFERMEDADES REUMATICAS.

10.1. EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) EN EL SER HUMANO

10.1.1. Antecedentes, definición y localización genética del MHC.

La inmunogenética utiliza herramientas de la inmunología y de la biología molecular para definir a los productos de los genes y a los genes mismos. Dentro de esta rama, el MHC es un complejo genético central para el reconocimiento inmunológico y es la barrera más importante en la aceptación de un trasplante alogénico. A partir del descubrimiento del primer antígeno HLA en 1958 y gracias al esfuerzo monumental de la colaboración internacional, mediante la realización de los talleres, desde 1964 (publicados en los Histocompatibility Testing 1964, 65, 67, 70, 72, 75, 77, 80, 84, 91), pero sobre todo el desarrollo del conocimiento ha sido explosivo en los últimos años ^(1, 52, 52, 54). Llegando a conocer de manera muy detallada el procesamiento y presentación del antígeno tanto por moléculas HLA clase I como HLA clase II. Ver Fig. 3 ⁽⁵⁴⁾.

Procesamiento y presentación del antígeno. (A) Moléculas HLA clase I: Las proteínas intracelulares degradadas a péptidos en los proteosomas entran al retículo endoplásmico a través de TAP 1 y 2. Los péptidos ensamblados a las moléculas de clase I son transportados a la superficie celular. (B) Moléculas HLA Clase II: Estas moléculas se asocian con la cadena invariante (Ii) pasando por la red Golgi y MCIi donde interactúan con péptidos exógenos derivados del endosoma. Finalmente el complejo MHC-péptido es transportado a la superficie celular.

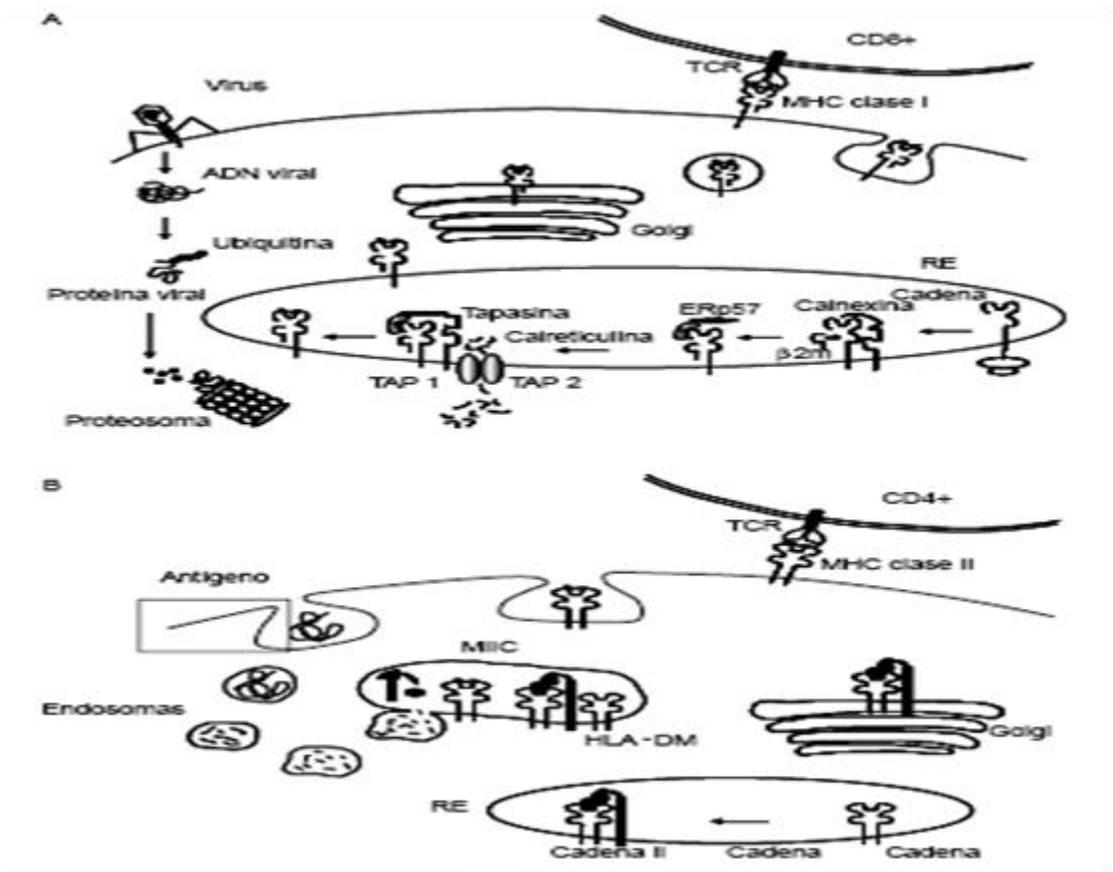


Fig.3. Procesamiento Antigénico ⁽⁴⁹⁾

Los genes estructurales del complejo mayor HLA (antígenos de leucocitos humanos) se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 y ocupan una región de alrededor de 4000kb ⁽⁵⁶⁾. Ver fig. 4.

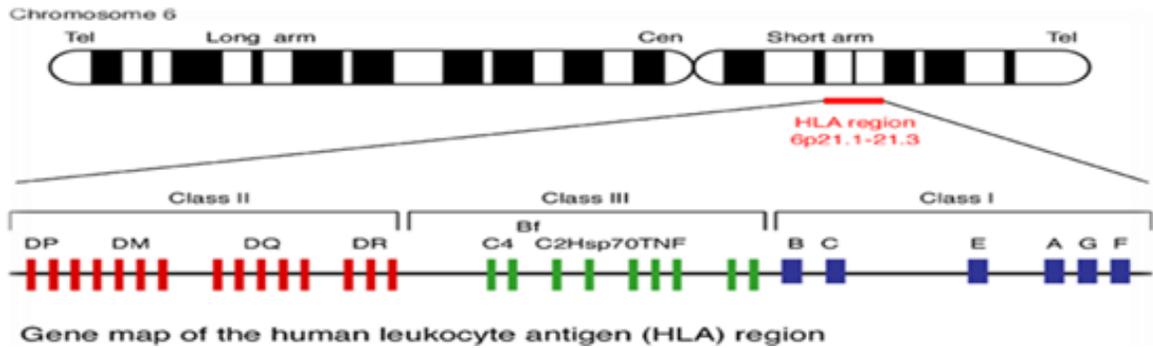


Fig.4. Mapa Cromosomal Del CMH ⁽⁵⁶⁾

Las regiones MHC se dividen en clase I, clase II y clase III. Los loci clase I codifican para unos genes llamados (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H), los cuales expresan una serie de glucoproteína (cadena pesada de 44kd, llamada alfa) que al acoplarse de modo no covalente con una β_2 microglobulina (12kd) forman una molécula clase I intacta. Los antígenos HLA-A B y C se expresan sobre todas las células nucleadas de los organismos mientras que los E, F, G y H son antígenos de diferenciación muy importantes en el desarrollo y la maduración fetales. Estos últimos se localizan en la interfase materna fetal en etapas distintas de la maduración. Las moléculas clase I funcionan como elementos de restricción, esenciales para el reconocimiento de los antígenos (tumoraes o vitales) por los linfocitos T citotóxicos que expresan el marcador CD8⁺.

Intercalados entre loci clases I y II, se encuentran ubicados otros genes; los que codifican para la expresión del TNF (factor de necrosis tumoral alfa) que tiene una diversidad de funciones entre las que están las siguientes: necrotiza células tumorales, estimula la biosíntesis de proteínas implicadas en la respuesta inmunitaria (clase I, GM-CSF, IL-1, INF- γ), induce fenómenos de trombosis local y de coagulación intravascular diseminada y estimula la producción de prostaglandina E2, así como de colagenasa por las células sinoviales. La proteína de choque térmico HSP-70 parece intervenir en forma muy importante en rescatar los péptidos procesados por la célula presentadora de antígeno (CPA); los transporta a los compartimientos intracelulares adecuados y facilita su interacción con las moléculas clase II, para que estas efectúen su función de presentar al antígeno.

Algunos complotipos están asociados con ciertos haplotipos HLA, por lo que pueden resultar de interés en genética de poblaciones, en trasplantes o en asociaciones de HLA con diversos padecimientos. La región de clase II, antes denominada HLA-D es la más compleja. Existen 22 loci clase II agrupados en regiones denominadas HLA-DR, DQ, DO, DNA, DP, TAP1, TAP2, LMP2 y LMP7.

Los loci DR, DQ y DP contienen genes A y B, y uno de cada uno codifica para la síntesis de una cadena alfa (33Kd) y una beta (28 Kd) que dan lugar a la expresión de una glucoproteína dimérica llamada antígeno clase II. Las cadenas alfa y beta tienen dominios externos, cada uno denominado alfa 1 y alfa 2 y beta 1 y beta 2. La cadena beta es la más polimórfica, especialmente beta 1, aunque en los DQ y los DP, alfa tiene cierta variabilidad.

Ambas se hallan insertadas en la membrana celular mediante un dominio transmembranal y tienen una región intracitoplasmática. Ver figura 1. Estas moléculas se expresan sobre la superficie de células presentadoras de antígeno (CPAs), macrófagos, linfocitos T activados, T cooperadores, linfocitos B, células epiteliales y endoteliales.

Los antígenos DR son el producto del gen invariable DRA y de cualquiera de los polimórficos DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5 los heterodímeros DQ resultan de DQA1 y DQB1, y DPB1. Los genes TAP1 y TAP2 están involucrados en el transporte de péptidos procesados en la rotura y procesamiento del antígeno dentro de la célula en péptidos de diferentes tamaños. Las moléculas clase II son sumamente polimórficas y la variabilidad tanto de clase II determina las diferentes alélicas individuales, la alorreactividad y la capacidad de unirse a péptidos diversos. La función de aquellos de clase II es la de presentar los péptidos procesados sobre la superficie de la CPA a los linfocitos T que expresan el cofactor CD4 y que cooperan o suprimen la respuesta inmunitaria.

10.1.2. Polimorfismo, herencia y función del complejo MHC/HLA

Mediante el empleo de los métodos serológicos y celulares de tipificación, se han identificado oficialmente 158 antígenos HLA: (27) HLA-A; (10) HLA-C; (59) HLA-B; (26) HLA-D; (21) HLA-DR; (9) HLA-DQ, y (6) HLA-DP. Sin embargo, con el análisis molecular usando el Southern-blot, RFLPs (Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción), el PCR (reacción en cadena de la polimerasa) o la

secuenciación directa de genes HLA, se ha demostrado que existe un “micropolimorfismo”, es decir, variaciones hasta un par de bases entre un alelo y otro que no se pueden distinguir por los métodos convencionales.²

² Base de Datos: IMGT/HLA Data Base

11. HACIA LA IDENTIFICACION DE SISTEMAS GENETICOS COMUNES ASOCIADOS CON ARTRITIS REUMATOIDE DE INSTALACIÓN TEMPRANA Y ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR.

En los últimos años se ha visto como muchos genes se han asociado a las enfermedades autoinmunes, sin embargo también es conocido como muchas enfermedades comparten genes comunes como tal vez es el caso de la (AR Instalación Temprana y (AIJ) poliarticular. Las cuales pueden estar asociadas con genes comunes tales como: El Snp's Funcional PTPN22 (C1858T) además de HLA clase II DRB1-DQB1, además de otros genes o loci como: (PDCD1, FCRL3, SUMO4, CD25, PADI4 and SLC22A4) ^(2, 5, 6, 49, 50, 57).

La aberración funcional de estos genes puede causar la activación o inhibición del receptor del linfocito T de manera anormal pudiendo actuar como etiología molecular para que se presente la autoinmunidad. Estos genes podrían estar actuando de manera de cascada o uno de ellos potencializando la función del otro o activación de una vía diferente de señalización intracelular produciendo por ejemplo la expresión de genes pro inflamatorios ⁽⁵⁸⁾, muchos de los mecanismos por los cuales esos genes actúan todavía son desconocidos, donde los pocos conocimientos que se han obtenido a repercutido en un mejor pronóstico y tratamiento de las enfermedades autoinmunes ^(49, 50). La principal

La existencia de regiones cromosómicas asociadas a numerosas enfermedades autoinmunitarias con expresión genética similares entre ellas, deja entrever la existencia de factores genéticos comunes con la autoinmunidad. En los últimos años se ha producido grandes avances en el conocimiento de estos posibles marcadores genéticos como el gen PTPN22, el cual es un importante regulador de la respuesta de los linfocitos T, el cual lo perfila como un importante marcador genético en (AIJ) Poliarticular y AR de Inicio Temprano, el cual después del MHC

es el gen más repetido y solido con las EAI. Estos genes han sido implicados en las EAI en primer lugar por resultados procedentes de estudios familiares en los que se ha observado un alto grado de agregación familiar, además muestran patrones de expresión génica alterados de manera similar mas no idénticos en ambas enfermedades (AIJ) y (AR), lo cual nos hace sostener la hipótesis de una base etiopatogenia común y compartida. La identificación de genes comunes implicados en la predisposición en la (AIJ) y (AR) sería de gran relevancia, puesto que contribuiría al mejor conocimiento de las vías fisiopatológicas de estas enfermedades, al desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico a escala molecular que podrían ser utilizadas como herramientas de prevención y pronóstico así como la identificación de nuevas dianas terapéuticas ⁽⁹⁰⁾.

Para hallar los genes candidatos posiblemente comunes son escogidos dependiendo de la estrategia posicional en la que los genes se seleccionan por su localización en regiones cromosómicas que previamente se han asociado con la (AIJ) y (AR) en rastreos sistemáticos del genoma. También se puede utilizar la estrategia funcional, en la que el gen candidato es seleccionado por su implicación en los mecanismos patogénicos de las dos enfermedades. En cuyo caso serían buenos candidatos los genes implicados en los mecanismos moleculares y celulares alterados que dan lugar a autoinmunidad como es el caso de la activación de los linfocitos T y la presentación antigénica o con los relacionados con el desequilibrio entre mediadores pro y antiinflamatorios ^(90, 91).

El gen PTPN22 se ha señalado como que podría ser un factor de riesgo implicado en la producción de auto anticuerpos, ya que las enfermedades autoinmunes en las que se muestra asociación más significativa los anticuerpos son sumamente importantes en la fisiopatogenia lo cual quiere decir que posiblemente este gen podría estar definiendo ciertos grupos de enfermedades auto inmunitarias ⁽⁹⁰⁾.

11.1. PTPN22 Y MHC/HLA COMO FACTORES DE RIESGO EN ARTRITIS REUMATOIDE

El concepto de interacción fue discutido por Rothman en la conexión a la introducción de un componente de modelo causal, el cual refiere que está previsto para explicar causalidad entre dos factores de riesgo los cuales pueden ser independientes sin ningún camino a la enfermedad pero que para que esta se de se requiere la implicación de ambos factores de riesgo. Alternativamente, una interacción biológica se considera estar presente si hay por lo menos uno que comparte un camino hacia enfermedad que requiere la implicación de ambos factores de riesgo. La interacción en este sentido es detectada comparando el efecto entre los expuestos a ambos factores con la suma de los efectos atribuidos a cada uno de los dos factores por sí mismo. Así, la “interacción,” según lo definido por una desviación de la aditividad, tiene una interpretación biológica. Cuando dos causas contributivas están obrando recíprocamente, existe un camino a la enfermedad que requiere ambos factores. Así, tales interacciones son relevantes desde una perspectiva mecánica. Uso del previamente concepto descrito de interacción aditiva a los resultados del actual estudio implicaría que teniendo células presentadoras de antígenos las cuales contienen moléculas del sistema MHC/HLA clase II con alelos del SE (primer componente “causa”) y los T-cells con la regulación disfuncional se asocian al PTPN22 específicamente su alelo de R620W (segundo componente causal) estos aumentan el riesgo de manifestación de la enfermedad más que la suma prevista de cada uno de estos por separado ^(101, 102)

De manera independiente el PTPN22 está asociado con la presencia de ACCP positivo mientras que el HLA-DRB1 con el FR seropositivo ⁽¹⁰³⁾. Los factores genéticos contribuyen con fuertemente con la heredabilidad aproximadamente entre un 50-60% en estudios de gemelos y de ligamiento, y una contribución

adicional del 50% relacionado con factores de riesgo ambientales o fisiológicos (104).

Los estudios que mencionan una posible interacción del Gen PTPN22 (C1858T) con el MHC/HLA-DRB1* y de estos con el medio ambiente como características dominantes comunes en el desarrollo de la artritis reumatoide y Artritis Idiopática Juvenil Poliarticular (103-104). Aproximadamente un 40% de la susceptibilidad para la presencia de AR corresponde aun componente genético con un mayor porcentaje del Sistema MHC/HLA-DRB1 donde el PTPN22 se ha encontrado mayormente asociado con susceptibilidad en población ancestrales del norte de Europa con un riesgo atribuible de aproximadamente del 8% (104, 105).

Recientes Estudios más recientes han demostrado que la susceptibilidad del RA depende entre los muchos factores existente de HLA-DRB1 (SE), PTPN22, con un efecto muy fuerte en algunos subgrupos de pacientes del RA que sean positivos para los autoanticuerpos del CCP (106-110). Las proteínas codificadas por los alelos HLA-DRB1 SE han demostrado atar los péptidos citrulinados con una afinidad más alta, dando por resultado una respuesta realizada de la célula de T helper. El gen PTPN22 codifica la fosfatasa linfoide de la tirosina es una proteína con una función potencial en regulación umbrales de la activación de los linfocitos B y T de ahí la hipótesis de una posible interacción o epítasis entre ellas (108-113).

Se ha propuesto que el polimorfismo PTPN22 (C1858T) está asociado con susceptibilidad por una falta de supresión de las células de T autoreactivas, predisponiendo a la autoinmunidad. La variación en cualquier gen podría por lo tanto predisponer a RA, creando un ambiente permisivo para una inmunorespuesta a las propias proteínas y órganos (106-114).

Un estudio realizado en por Henrik Kallberg (2007) con 1977 casos y 2405 controles mostro asociaciones entre los dos genes específicamente es decir como conclusión existía una semejanza en la distribución del alelo para HLA-DRB1 y PTPN22 en los pacientes con AR, y en los controles se diferenciaron en la

distribución del alelo para HLA-DRB1 y PTPN22, con un predominio más alto con respecto a ambos HLA-DRB1 Alelos con el Epitope Compartido (SE) y el alelo de PTPN22 (C1858T)-(R620W). Los autores mencionan en el artículo que la asociación puede variar de una población a otra al igual los alelos de PTPN22 R620W y Los alelos del HLA-DRB1 (SE) fueron asociados con un mayor riesgo de desarrollar anti-CCP-positivo en AR. Estos genes tomados juntos, los datos proporcionan una prueba evidente de la existencia de una interacción del gen-gen entre los alelos del HLA-DRB1* SE y el alelo de PTPN22 R620W en el aumento del riesgo para el desarrollo del RA con anticuerpo-positivo del anticitrulina ⁽¹⁰²⁾.

Otro estudio confirmo asociaciones de las combinaciones específicas entre el gen PTPN22 (C1858T) y MHC/HLA-DRB1 con OR: 5.6 (4.5, 7.1) ⁽¹⁰²⁾.

12. ASOCIACION DEL COMPLEJO HLA CON LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES.

12.1. ASOCIACIÓN DEL HLA CON ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO Y ARTRITIS IDIOPÁTICA JUVENIL

Hace más de 20 años que se descubrió la participación de los antígenos HLA en la susceptibilidad a diferentes enfermedades, y a partir de 1972, el desarrollo fue espectacular. Hoy se han descrito más de 500 entidades clínicas de las cuales la asociación a HLA está confirmada en más de 50. En 1985, Tiwari y Terasaki publicaron un compendio en el que se detallan 76 enfermedades con sus respectivas asociaciones en diferentes grupos étnicos. El proceso es extraordinario y abarca tres aspectos fundamentales:

Descripción de asociaciones nuevas y casi absolutas como la de la narcolepsia y el DR2 o la presencia de genes de supresión contra antígenos microbianos o parasitarios. El análisis de nuevos loci (DQ, DP, TAP, LMP) que permiten una exploración más profunda de los mecanismos moleculares de la asociación. Tal es el caso de la diabetes dependiente de insulina, en la que ahora se sabe que la ausencia de un ácido aspártico en la posición 57 de la cadena DQB confiere susceptibilidad junto con la presencia de una arginina en DQA-52. Estos datos apoyan la hipótesis de que las secuencias contenidas en el sitio de unión dependerá que un péptido propio se una e induzca autoinmunidad.

Una estrategia genética de enfoque más preciso para estudios en familias, permitirá confirmar la asociación con HLA, dependiendo de cómo compartan haplotipos los afectados; la diferencia entre el 100% de concordancia teórica en hermanos gemelos y la observada, señala el grado de participación de los factores ambientales.

Los hallazgos en animales transgénicos empiezan a demostrar la importancia de estos modelos y el papel que juegan los patógenos o las secuencias alélicas en la protección o susceptibilidad.

Las principales enfermedades con participación de HLA caen en las categorías siguientes: hemato-oncológicas, nefrológicas, oftalmológicas, endocrinológicas y autoinmunitarias, digestivas, neurológicas, dermatológicas, infecciosas y las reumatológicas que se describen a continuación.

12.1.2. Herencia.

Los genes HLA se heredan siguiendo la primera ley de Mendel, en forma codominante, de modo que en cada haplotipo (mitad de la información genética que se porta en cada cromosoma) se manifiesta un antígeno de cada locus y se expresan los dos. Así, el genotipo consiste de dos antígenos de cada locus y cada individuo es portador de 12 antígenos HLA; seis de uno paterno ⁽⁵⁹⁾. Ver fig. 5 (a).

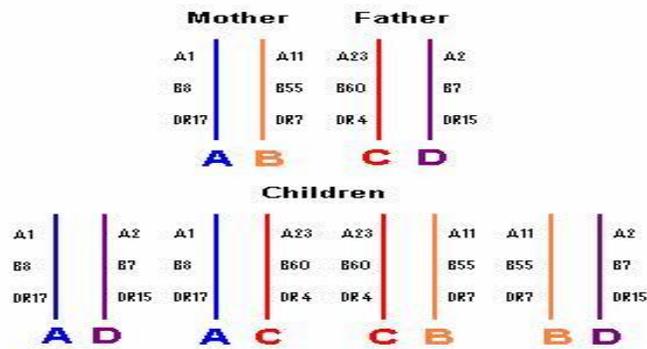


Fig.5 (a) Herencia Codominante ⁽⁵⁹⁾.

El desequilibrio de enlace es una característica particular del MHC y consiste en la combinación preferencial de antígenos de los diferentes loci en un mismo individuo más de lo esperado por el azar, por lo que son marcadores “exquisitos” de las poblaciones humanas. Muchos estudios han evaluado el fenómeno de

haplotificidad determinando que se debe a la cercanía que existe entre genes y al modo cross-sectional en que estos son transcritos ⁽⁵⁹⁾. Ver fig. 5 (b) y 6

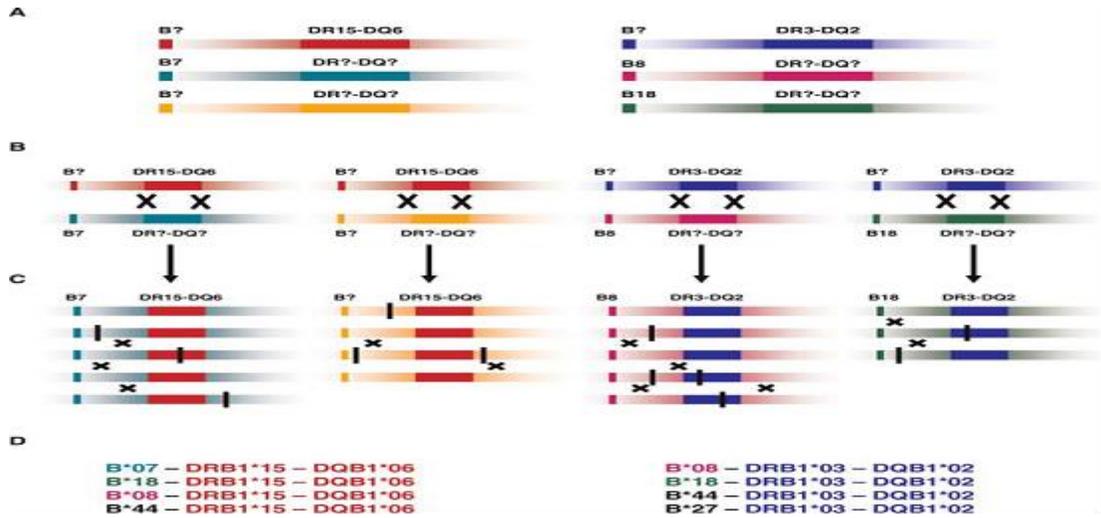


Figura 5(b). Modelo de divergencia con respecto a haplotipos de la región DR-DQ en materia de extensión de MHC ⁽⁵⁹⁾.

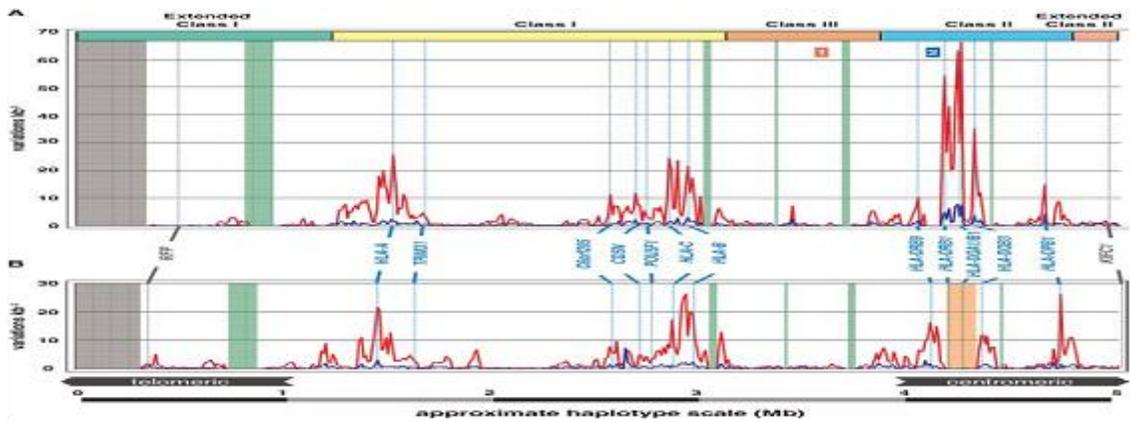


Figura 6. Cercanía de los genes HLA-DRB1 y los HLA-DQA1 y DQB1 ⁽⁵⁹⁾.

13. ESTRUCTURA, INHIBICIÓN Y MECANISMOS DE REGULACIÓN DE (PTPN22) LYP, UN LINFOIDE ESPECÍFICO TIROSINA FOSFATASA Y SU IMPLICACION EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES.

El linfoide-especifico tirosina fosfatasa (LYP) ha generado un enorme interés por que sea descubierto un SNP en el gen PTPN22 que codifica para LYP la cual es una fosfatasa mutante que está asociada con la severidad de las enfermedades autoinmunes ⁽¹⁴⁾. Ver fig. 7.

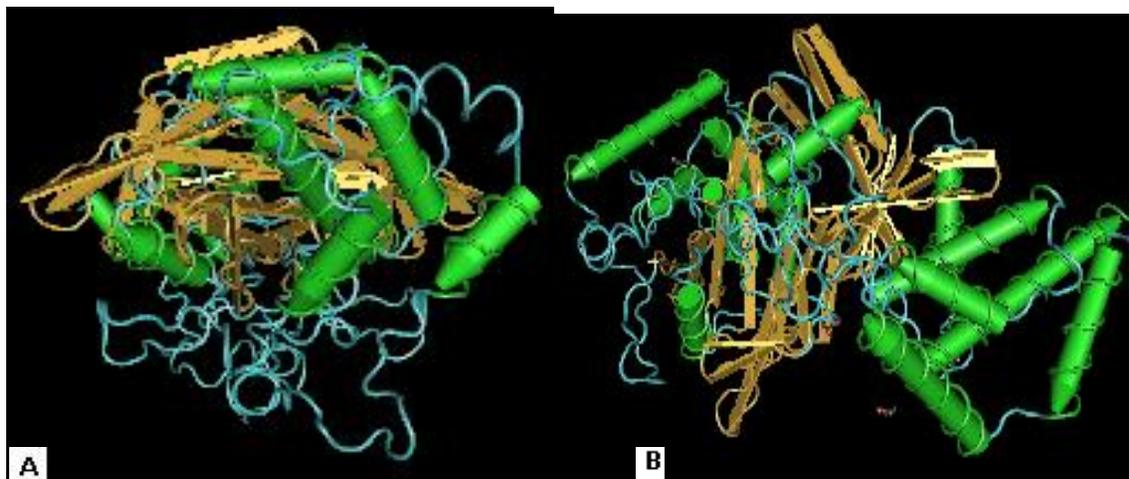


Fig. 7. (A) PTPN22 Nativa Y (B) PTPN22 Activada ⁽¹⁴⁾.

El gen PTPN22 codifica para una fosfatasa especifica de linfocitos que cataliza la desfosforilación intracelular en residuos de tirosina y de esta manera contribuye a la inhibición de la activación de las células T ⁽⁹¹⁾. En el gen PTPN22 se describió una variante genética consistente con el cambio de una sola base [SNP] en la posición 1858 (C1858T), que da lugar a un cambio de aminoácido de arginina por triptófano (R620W) y se asocia con susceptibilidad con autoinmunidad. Recientemente se ha demostrado que el alelo T del polimorfismo 1858 causa una ganancia de función enzimática de PTPN22 que daría lugar a un aumento en el umbral para la activación de los linfocitos T. Esto podría causar el escape timico de linfocitos T autoreactivos (Selección Negativa) o una menor cantidad de linfocitos T reguladores, procesos que activarían la autoinmunidad ^(91, 92).

13.1. LINFOIDE ESPECÍFICO TIROSINA FOSFATASA (LYP)

Es una proteína de 110 Kda que consiste de un amino terminal y un segmento no catalítico C-terminal.

Superfamilia de PTPs:

PTP-PEST(PTPN12)

PTP-HSCF/BDP1(PTPN18).

LYP/PEP(PTPN22).

Los estudios bioquímicos sugieren que LYP es un inhibidor de la activación de las células T, ligada a través de la desfosforilación de Lck y Zap70 ⁽⁵⁹⁾. Ver fig 8.

La PTPN22 (proteína tirosina fosfatasa non receptor 22) es un gen que se encuentra en el cromosoma 1p13.3–p13.1, esta región está altamente ligada con RA, este gen codifica para linfocito específico fosfatasa (LYP). Lyp es una molécula intracelular PTP que contiene un dominio catalítico N-terminal y uno no catalítico C-terminal con cuatro 4 dominios ricos en prolina.

Lyp es desfosforilado por las kinases Lck, Fyn, and Zap-70, con una gran importancia en la señalización de los LT ^(5, 60). Ver fig 9.

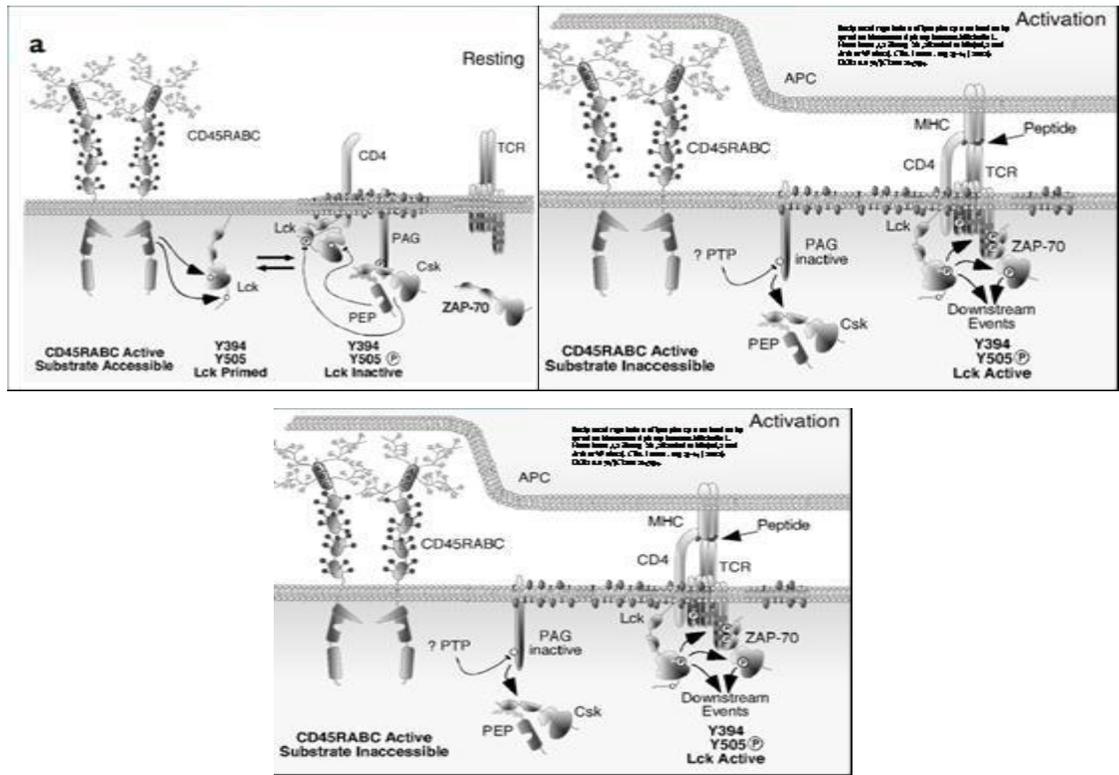


Fig. 8. Regulación en la activación de los LT por tyrosine kinases y fosfatases (59).



Fig. 9. Dominios Ricos En Prolina De PTPN22 (59).

Una función adicional de LYP es la baja regulación en la activación de los Linfocitos T, ligados a su dominio C-terminal Src tyrosine kinase (Csk).

Csk es un supresor esencial de las kinasas que interactúan en la medición de la activación de las células T ⁽⁵⁾. Ver fig. 10

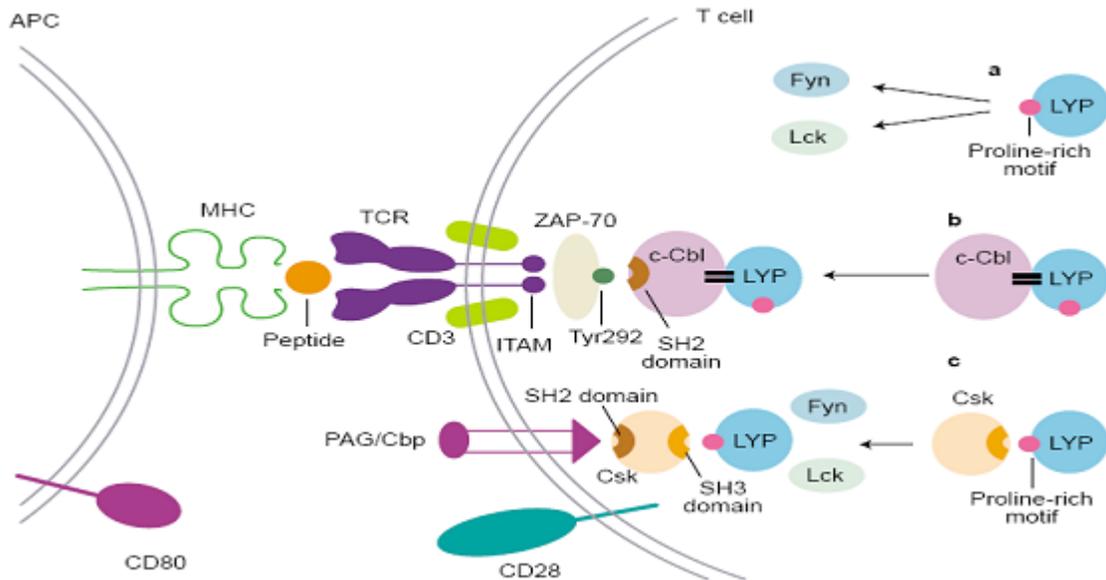


Fig 10. Mecanismos De Lyp Afectan La Activación De Células T ⁽⁵⁾.

Lyp liga un adaptador de la molécula Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) en esta interacción juega un rol en la regulación negativa en la función de los linfocitos T ⁽⁶⁰⁾.

Recientes estudios han demostrado que el single nucleótido polymorphism (SNP) of PTPN22 (C1858T, R620W), en el motivo P1 es la región donde interactúan las moléculas y en donde puede haber una interrupción entre Lyp y Csk, es en este sitio donde pueden formar un complejo para la supresión y activación de los linfocitos T. En una población caucásica se ha encontrado el alelo, PTPN22 como factor de riesgo para el desarrollo de múltiples enfermedades autoinmunes ⁽⁶⁰⁾.

13.2. MECANISMOS DE INTERACCIÓN DE LYP EN LA AUTOINMUNIDAD

Lyp físicamente se enlaza por un motivo rico en prolina (P1) al dominio SH3 del Csk Kinase ⁽¹⁰⁰⁾. La capacidad de Csk y Lyp para inhibir la señalización de receptor de células T requiere de una asociación física ⁽⁶³⁾. Estas moléculas actúan conjuntamente para inactivar Lck; una kinasa de la familia Src que está involucrada en eventos de señalización de las células T. 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 a una configuración inactiva, causando una regulación negativa de la vía de señalización de células T. Recientes estudios han demostrado que un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) de PTPN22 (C1858T) (R620W) dbSNP No. Rs2476601, localizado en el motivo P1 interrumpe la interacción entre Lyp y Csk, evitando la unión del complejo, por lo tanto la no inactivación de Lck.⁽¹⁰¹⁾ Así, la asociación del alelo R629W con la enfermedad puede ser el cambio en la regulación de Lck causando la pérdida de 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.

14.OBJETIVOS

14.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer los polimorfismos de los sistemas genéticos PTPN22 (SNP's C1858T) y moleculares MHC/HLA-DRB1* con la susceptibilidad para desarrollar Artritis Idiopática Juvenil Poli Articular y Artritis Reumatoide De Instalación Temprana en un grupo de pacientes colombianos.

14.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Genotipificar los alelos de genes MHC/HLA-Clase II: DRB1* en pacientes con AIJ Poliarticular, Artritis Reumatoide de Instalación Temprana y controles sanos.
2. Genotipificar los genes (SNP's) del sistema genético PTPN22 (C1858T) en pacientes con AIJ Poliarticular, Artritis Reumatoide de instalación Temprana y controles sanos.
3. Asociar los polimorfismos del sistemas genético MHC/HLA-Clase II: DRB1* y PTPN22 (C1858T) con la susceptibilidad o protección de Artritis Idiopática Juvenil Poli Articular y Artritis Reumatoide de Instalación Temprana.
4. Determinar la posible interacción de los alelos MHC/HLA-Clase II: DRB1* y el Snp's PTPN22 (C1858T) como marcadores moleculares en la susceptibilidad de desarrollar Artritis Idiopática Juvenil Poli Articular y Artritis Reumatoide de Instalación Temprana.

15. HIPÓTESIS

15.1. HIPÓTESIS NULA

Los polimorfismos genéticos y moleculares de los sistemas MHC/HLA-Clase II: DRB1* y PTPN22 (C1858T) no son marcadores comunes para susceptibilidad en las dos entidades: Artritis Idiopática Juvenil Poliarticular y Artritis Reumatoide de Instalación Temprana.

15.2. HIPÓTESIS ALTERNA

Los polimorfismos genéticos y moleculares de los sistemas MHC/HLA-Clase II: DRB1* y PTPN22 (C1858T) son marcadores comunes para susceptibilidad en las dos entidades: Artritis Idiopática Juvenil Poliarticular y Artritis Reumatoide de Instalación Temprana.

16. METODOLOGIA

16.1. TIPO DE ESTUDIO

Analítico de Casos y Controles.

Descriptivo: Se identificaron y describieron los polimorfismos presentes en los sistemas genéticos MHC/HLA-Clase II: DRB1* y PTPN22 (C1858T).

De Corte Transversal De Casos y Controles: ya que las muestras se recolectaron y procesaron en un periodo de 2 años.

De casos y controles por que se obtuvo que por cada caso dos controles es decir una relación de 1:1:2.

Analítico: ya que se planteó un análisis de asociación y correlación bivariado y multivariado con los polimorfismos de los dos sistemas genéticos con el desarrollo o no de la enfermedad.

16.2. MUESTREO POBLACIONAL

16.2.1. Selección de la muestra

El tamaño de la muestra se estimo tomando en consideración la población estimada del macro proyecto apoyado por Colciencias, por lo tanto en realidad es una submuestra que ayuda a determinar y conocer el comportamiento de las variables. El número de pacientes escogidos fueron 30 con Artritis Idiopática Juvenil Poliarticular y 30 pacientes con Artritis Reumatoide de Instalación Temprana, las muestras biológicas, ADN de estos pacientes provinieron de una corte de pacientes y controles establecida en el marco y desarrollo de un proyecto titulado **“ANALISIS MOLECULAR Y ESTUDIO DE LA ASOCIACION DEL POLIMORFISMO DE GENES MHC Y SNP’S DEL TNF CON LOS STR’S DEL**

MHC EN MESTIZOS COLOMBIANOS SUFRIENDO DE (AIJ) POLIARTICULAR Y AR DE INSTALACION TEMPRANA, del grupo de investigación de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad del Norte en el marco del convenio suscrito con Colciencias. 60 controles con iguales característica poblacionales sin ningún tipo de antecedente de enfermedad autoinmune no relacionados familiarmente se escogieron al azar en esta corte.

El consentimiento informado fue obtenido por todos los controles y pacientes con artritis reumatoide de instalación temprana y pacientes con Artritis Idiopática Juvenil Poliarticular cuyo formato fue aprobado por el Comité de Bioética de la Fundación Universitaria del Norte (Uninorte).

16.2.1.1. Dos Grupos de pacientes.

Se involucraron dos grupos de estudio 30 pacientes con Artritis Idiopática Juvenil (AIJ) Poli articular y 30 pacientes con Artritis reumatoide de Instalación Temprana. Estos pacientes fueron recolectados en la ciudad de Barranquilla provenientes de varias poblaciones del país, previo diagnóstico del especialista bajo los criterios de ACR y EULAR para el respectivo diagnóstico de AIJ Poliarticular y AR de Instalación Temprana previa firma del consentimiento informado de los pacientes, para un total de muestras analizadas de 60 muestras de pacientes. Los datos clínicos de los pacientes fueron recolectados directamente de las historias clínicas y descritos en el formato de recolección de datos (ver anexo #1).

16.2.1.2. Grupo Control:

El grupo control estuvo representado en 60 sujetos, sanos para ambas entidades y sin ningún tipo de enfermedad autoinmune es decir sujetos no relacionados familiarmente sin antecedentes clínicos para las entidades.

16.2.1.3. Criterios de Inclusión.

- Pacientes colombianos no relacionados familiarmente con diagnóstico clínico de AR de instalación temprana que reunieran los criterios del Colegio Norteamericano de Reumatología (ACR).
- Pacientes colombianos no relacionados familiarmente con diagnóstico de Artritis Idiopática Juvenil Poliarticular que reúnan los criterios diagnósticos según la Liga Internacional de Asociaciones de Reumatología (ILAR)
- Los dos grupos de pacientes al igual que los controles fueron colombianos pertenecientes a diferentes regiones del país.
- Pacientes y acudientes que hayan firmado el consentimiento informado aprobado por el comité de ética de la Universidad del Norte.

16.2.1.4. Criterios de Exclusión

- No se incluyeron pacientes cuya información clínica no fue completa o que presentaron cierto grado de incapacidad física o mental para la toma de decisión y firma del consentimiento informado.
- Pacientes sufriendo de otras enfermedades autoinmunes, enfermedades reumáticas degenerativas
- Individuos con antecedentes familiares de tres generaciones que hayan padecido de Enfermedades Autoinmunes.
- Pacientes que no cumplieran con los criterios de ILAR y la ACR.
- Pacientes que se hayan negado a firmar el consentimiento informado.

16. 2. 1.4. Criterios de Inclusión de Controles.

- Sujetos no relacionados familiarmente con los pacientes
- Sujetos sin ningún tipo de enfermedad autoinmune.
- Pacientes sin antecedentes clínicos para ningún tipo de enfermedad autoinmune.

16.3. TÉCNICAS DE LA RECOLECCIÓN DE DATOS CLÍNICOS

16.3.1. Fuente Primaria

Los datos fueron recolectados directamente de los pacientes por medio de entrevistas, historia clínica y exploración médica con respectivo diagnóstico clínico por parte del reumatólogo, para luego consignar las variables de interés en un formato de recolección con la información de importancia para el estudio.

16.3.2. Fuente Secundaria

Los datos recolectados directamente de las historias clínicas, como resultados de análisis de laboratorio y que son de interés para el estudio como: los ANAS, ANCA, Proteína C reactiva, entre otros, que aunque no se tuvieron en cuenta para el análisis estadístico del presente estudio si para determinar el diagnóstico de los pacientes.

- ✓ Para el análisis molecular de las secuencias aminoacídicas del epítipo compartido en tres de las posiciones 70-74 de los alelos asociados a dicho epítipo se analizaron los genes en las bases de datos: EBI y NCBI Inmunoepítipo, IMGT (HLA DATA BASE).

17. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

17.1. IDENTIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS HLA CLASE II DRB1*

17.1.1. Extracción de ADN (Salting Out).

El ADN de los pacientes y los controles se aisló a partir de sangre periférica por el método de Salting Out cuando se obtuvo muestra total de 10ml con un sistema al vacío (venoject-terumo) que contiene EDTA como anticoagulante.

17.1.2. Procedimiento

Centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos a -4 grados centígrados.

Separación de las capas de células blancas o Buffy-Coatt, para ser transferidas a un tubo falcón de 15ml.

Se adiciona solución de lisis de glóbulos rojos 7 ul hasta completar 15 ml se homogeniza la solución y se centrifuga nuevamente a 3000rpm durante 15 minutos a menos 4 grados centígrados.

Se descarta el sobrenadante y se re suspende el botón en 5ml de solución de lisis de glóbulos rojos la cual contiene: 1M Tris HCL (Ph 7.6) 10 ml, 0.5 M EDTA (Ph 8.0) 20 ml, 5 mM NaCl: 10ml y se centrifuga nuevamente a 3000rpm durante 15 minutos a menos 4 grados centígrados. El sobrenadante se descarta y se resuspende el botón en 3ml de reactivo de lisis de glóbulos blancos, se le adiciona 50ul de SDS al 10% y 50ul de proteínasa K [mg/ul].

Se somete a agitación constante a una temperatura de 37 grados centígrados durante toda la noche. Se adiciona 3ml de NaCl 5M, se agita fuertemente durante 15 segundos. Se centrifuga durante 25 minutos para obtener el sobrenadante el

cual se transfiere a otro tubo falcón. Se realiza la precipitación agregando igual volumen de etanol frío al 100% mezclando suavemente la solución hasta obtener las tiras de ADN el cual se transfiere a un tubo eppendorf para secar el ADN mediante la bomba de vacío.

Se le agrega 500ul de TE 1X. se somete a agitación de 50rpm durante toda la noche a una temperatura de 37 grados centígrados. Posteriormente se realiza la lectura en el espectrofotómetro a una dilución de 980/20, la absorbencia se obtiene 260 para ADN y 280 para proteínas. Obteniendo purzas finales de 1.7 a 2.0.

17.1.3. Cuantificación del ADN.

Para conocer la concentración de ADN, así como la pureza de las proteínas se realizaran pruebas de cuantificación por medio del espectrofotómetro y las pruebas cualitativas por medio de electroforesis.

17.1.4. Calidad del ADN

La determinación de la concentración del ADN se efectúa por medición de la densidad óptica (DO) en 260 nm (A_{260}). Un valor A_{260} de 1 (= 1 DO) corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de doble cadena. Para determinar la contaminación del ADN con proteína se mide además la absorción en 280 nm y se calcula el cociente A_{260}/A_{280} . Un ADN puro presenta una relación A_{260}/A_{280} de 1,8 o superior. Los valores A_{260}/A_{280} inferiores a 1,8 indican la presencia de impurezas por proteína. En un valor $A_{260}/A_{280} = 1,5$ la proporción de proteína asciende aprox. al 50% en la preparación de ADN. Para obtener unos resultados de ensayo óptimos de PCR-SSP se precisa un ADN con un cociente A_{260}/A_{280} de $\geq 1,6$.

17.1.5. Equipos, materiales y reactivos utilizados:

- Espectrofotómetro UV
- Taq ADN polimerasa (5 U/μl, PE Applied Biosystems)
- Termorregulador con tapa térmica (PE 9600, PE 9700 PE Applied Biosystems)
- Pipetas regulables
- Multipipeta Eppendorf con combitips (10 μl)
- Puntas de pipeta con filtro
- Agua destilada (dH₂O)
- Electroforesis de gel al 2%
- Agarosa (de uso en biología molecular)
- Cámara de gel (adecuada para gel con un mínimo de 25 pozos por peine)
- Buffer 5 x TBE
- Tris(hidroximetil)-aminometano (base)
- Ácido bórico (H₃BO₃)
- Na₂EDTA
- Solución de bromuro de etidio (10 mg/ml)
- ADN de longitud estándar (marcadores de 50 a 1000 bp) (no es imprescindible)
- Agitador magnético con placa térmica o un microondas
- Transiluminador de UV (~ 200 - 300 nm)

17.1.6. Tipificación Molecular De Los Alelos MHC/HLA Clase-II: (DRB1*).

Las muestras de pacientes y controles son tipificadas para poder identificar los alelos HLA-DRB1*, usando la técnica de (PCR-SSP) primer de secuencia específica.

Se tipificó el exón 2 de la cadena β1 del HLA- DR.

La tipificación molecular se efectuó mediante la técnica de PCR- SSP (sondas de secuencia específica). Esta técnica se basa en la utilización de iniciadores específicos para la identificación de uno o más alelos y de un par de alelos adicionales como control de la amplificación. La presencia o ausencia del amplificado del (los) alelo o alelo(s) específicos define la asignación de los alelos particulares. Los fragmentos amplificados se observaron en gel de agarosa al 2%.

La (PCR) reacción de cadena de polimerasa, permite obtener un gran número de copias a partir de un segmento de ADN de interés, con esta técnica es posible generar millones de copias de un gen específico, el cual se obtiene por medio de una repetición cíclica de tres etapas:

- Desnaturalización: se obtiene separando las cadenas de ADN con temperaturas elevadas, generando un molde de hebra simple.
- Anillamiento: ocurre una hibridación o unión con los iniciadores a sus secuencias homologas al ADN sustrato, se unirán solamente a secuencias complementarias bajo condiciones específicas de temperatura.
- Polimerización o elongación: es la extensión en sentido 5'- 3' del complemento iniciador-sustrato, se obtiene con la utilización de la Taq-polimerasa el cual va incorporando los desoxinucleótidos.

17.1.7. Tipificación HLA-SSP

En una tipificación del antígeno HLA de un ensayo de ADN se efectúan reacciones PCR con un volumen de reacción de 10 µl. Por cada tipificación en un vaso Eppendorf aplicar una mezcla maestra (mastermix). Ver tabla 4.

Tabla 4. Composición de la mezcla Mastermix

Número de las reacciones de PCR	Composición de la mezcla maestra a:				
	8	18	24	48	96
Cocktail PCR CK	44 µl	100 µl	120 µl	228 µl	440 µl
Taq ADN polimerasa	0,7 µl	1,5 µl	1,8 µl	3,5 µl	7 µl
dH ₂ O	55 µl	125 µl	150 µl	288 µl	550 µl
ADN (aprox. 100 ± 50 ng/µl)	11 µl	25 µl	30 µl	57 µl	110 µl

HLA SSP Kits

La amplificación genómica de ADN se realizó por PCR, (Polymerase Chain Reaction) Utilizando kit comerciales de Biotest DRB SSP: con pares de cebadores específicos (SSP, Sequence Specific Primers) identificando un gran número de los alelos HLA que se conocen hasta ahora, utilizando el programa adecuado del termociclador. Ver tabla 5.

El análisis del ADN amplificado se realiza con ayuda de la electroforesis de gel de agarosa. Una amplificación llevada a cabo con éxito genera un fragmento de ADN de longitud definida que se puede reconocer en el gel como una banda. Si no se produce la amplificación, falta esta banda. La composición de las mezclas de cebadores permite la asignación clara de las características del antígeno HLA.

Tabla 5. Programa del termociclador

Programa Biotest SSP:					
Desnaturalización inicial:	94°C	2 minutos			
Desnaturalización:	94°C	10 segundos	}		10 ciclos
Annealing y Extensión:	65°C	60 segundos			
Desnaturalización:	94°C	10 segundos	}		20 ciclos
Annealing:	61°C	50 segundos			
Extensión:	72°C	30 segundos			

17.1.8. Electroforesis de gel al 2%

El análisis de los productos PCR se realiza mediante la electroforesis de gel de agarosa y la subsiguiente detección de las bandas de ADN en luz ultravioleta.

17.1.9. Preparación de los reactivos

- Buffer 5 x TBE: (0,445 M Tris-Borato, 0,0125 M EDTA):

54 g Tris (hidroximetil-) aminometano (base)

27,5 g Ácido bórico (H₃BO₃)

4,65 g Na₂EDTA

Añada 1000 ml con agua destilada y almacénelo a temperatura ambiente

- Solución de bromuro de etidio (10 mg/ml)

Disolver 100 mg de bromuro de etidio en 10 ml de agua destilada dH₂O y almacene la solución a una temperatura comprendida entre los 2...8°C, evitando la luz.

- Gel de agarosa al 2 %.
- Disolver 5 g de agarosa en 250 ml TBE.
- Añadir 4 µl de solución de bromuro de etidio.
- Tras la gelificación de la agarosa
- Quitar los peines y cubrir el gel con TBE 1x. Los pocillos del gel deben estar cubiertos totalmente con tampón. A continuación pipetear la totalidad del preparado de PCR(10 µl) en los pocillos del gel.
- La electroforesis se realiza en 15 a 25 minutos a 8 V/cm (distancia entre electrodos). La distancia de migración del rojo cresol debe ser de 1-1,5 cm.

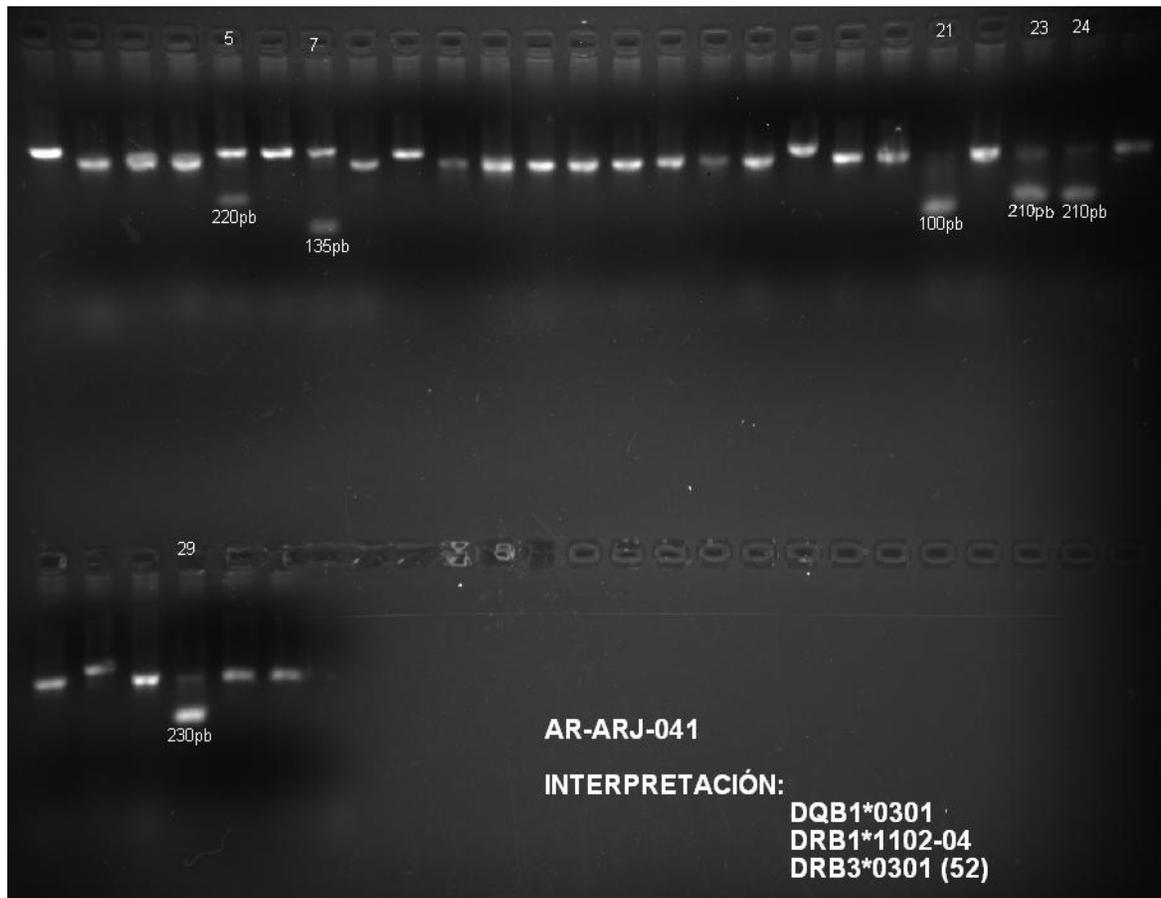
17.1.10. Foto-Documentación

Una vez finalizada la electroforesis, colocar el gel sobre un transiluminador ultravioleta y fotografiarlo para que los resultados puedan ser documentados e interpretados.

17.1.11. Interpretación de los resultados

Las mezclas de cebadores HLA contienen cebadores de control que amplifican un fragmento de 1.069 bp de longitud de la hormona de crecimiento humano (human growth hormone, HGH). Estos cebadores no presentan una concentración tan alta como los pares de cebadores alelo- específicos y sirven para controlar que el proceso de PCR se desarrolle con éxito. Por lo general, la banda de control se puede observar, por lo tanto, en todos los precipitados de PCR. En presencia de un producto de PCR específico de HLA, la banda de control puede aparecer débilmente o incluso desaparecer por completo. Este fenómeno no supone ninguna limitación, ya que en estos casos el control del desarrollo de PCR viene reflejado por bandas específicas. Para interpretar el ensayo se parte de la presencia o ausencia de una banda de ADN específica en el gel. El tamaño del fragmento de ADN amplificado no constituye un factor determinante pero se puede tener en cuenta como ayuda en la valoración del ensayo. El patrón de bandas específicas se interpreta identificando los posos en la figura 11 se identificaron los posos numero 5 y 7 los cuales están relacionados con los alelos DQB1*0301, los posos 21, 23 y 24 identifican los alelos DRB1*1102-04 y el poso 29 el alelo DRB1*0301. Ver fig 11.

Figura 11. Interpretación del gel electroforesis



17.2 GENOTIPIFICACIÓN MOLECULAR DEL ALELO PTPN22 POLIMORFISMO (C1858T), HOMOCIGOTO SILVESTRE (C/C), HETEROCIGOTO MUTADO (C/T), Y HOMOCIGOTO MUTADO (T/T).

La caracterización de los genotipos de cada grupo de pacientes al igual que en los controles se realizó por análisis molecular con sondas de hibridación-PCR en Tiempo Real.

En la Universidad Nacional y en los Laboratorios ROCHE de la ciudad de Bogotá/Colombia, se llevó a cabo la genotipificación del polimorfismo C1858T de PTPN22 para (30 muestras de pacientes con AIJ Poliarticular) y (30 muestras de pacientes con AR Reumatoide de Instalación Temprana) para un total de: (60 muestras), y 60 muestras de controles sanos para un total de muestras

procesadas (120). Se identificaron las formas homocigoto silvestre para (**CC**), heterocigoto mutado (**CT**), y homocigoto mutado (**TT**), utilizando PCR en tiempo real con sondas de hibridación en el equipo Light Cycler de Roche. Técnica ideal para detectar SNP's, (laboratorio Roche división Roche Molecular Biochemicals). La técnica se basa en sondas de hibridación, usan dos sondas de oligonucleótidos marcados con dos colorantes diferentes (fluoresceína y light Cycler- Red 640) que hibridan sobre la secuencia interna de ADN blanco. Los colorantes solo interactúan cuando se han unido a la secuencia de ADN objeto de estudio PTPN22 (C1858T). En la fase de anillamiento en el ciclo de PCR los oligonucleótidos (sonda) hibridizan en la región adyacente del ADN blanco. Los fluoróforos que están perfectamente acoplados a los oligonucleótidos hibridan muy cercanos uno del otro. La sonda donadora F1 (**VIC**) marcada con un fluoróforo en su extremo 3' es excitada por una luz externa, a su vez la sonda F1 pasa esa excitación como energía a la sonda F2 o aceptora (**FAM**) marcada en el extremo 5'. Finalmente, se produce una emisión de luz que se mide a 640nm y 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 las temperaturas melting permiten evaluar los picos de los genotipos homocigoto silvestre, heterocigoto y homocigoto mutado. Ver fig 11 y 12 y 13)

Figura. 12. Excitación Y Emisión De Las Sondas.

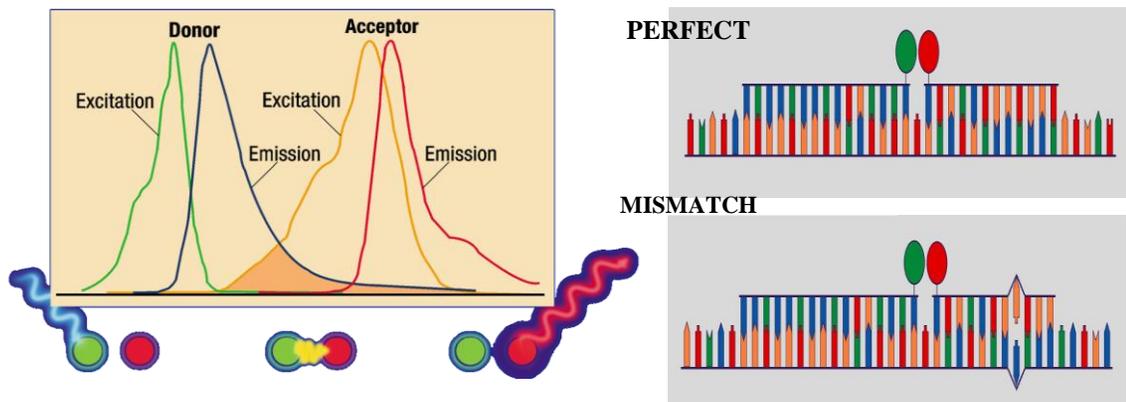
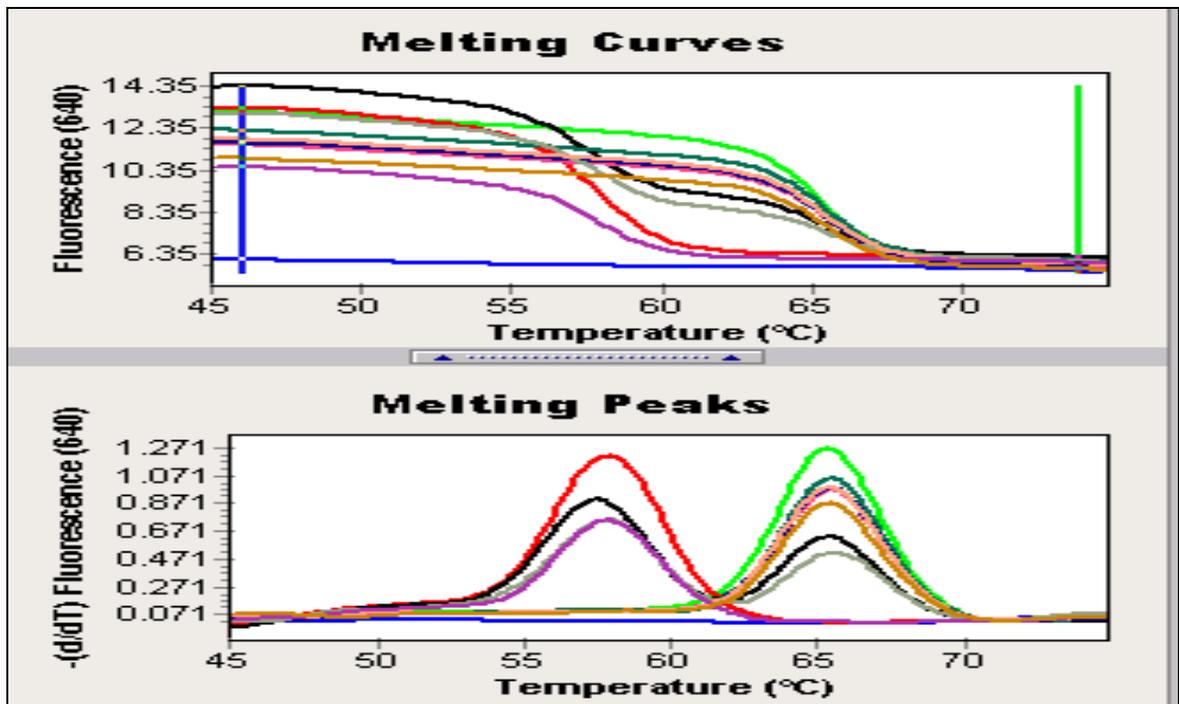


Figura 12. Anchor Probe Mutation Tm de la Mutation Probe es aprox. 5 °C inferior a la Tm de la Anchor Probe

Figura 13. Mutación Con Las Sondas De Hibridación.



PCR.

Protocolo	volume n	final 20 µl
Agua HPLC	12.8 µl	
MgCl ₂	0.8 µl	
Primer Mix	1.2 µl	Conc. final 2 µl
Sonda Mix	1.2 µl	Conc. final 2 µl
Máster Mix	2.0 µl	
ADN	2.0 µl	

Condiciones		PCR
	Temperatura	Tiempo
Denaturación	95°	10'
Cuantificación	95°	10''
	60°	15''
	72°	15''
		40 ciclos
Curva melting	95°	0
	40°	30''
	80°	0
Enfriamiento	4°	~

17.2.1. Ciclos Del PCR Light Snp's – Programa De Tipificación Del Light Cycler.

Program Name		fast Star					
CYCLES	1	ANALYSIS MODE	NONE				
	TARGET (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Spet Delay (cycles)	Acquisition Mode
	95	00:10:00	20	0	0	0	None
Program Name		Amplificación					
CYCLES	45	ANALYSIS MODE	Quantificación				
	TARGET (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Spet Delay (cycles)	Acquisition Mode
	95	00:00:10	20	0	0	0	None
	60	00:00:10	20	0	0	0	Single
	72	00:00:15	20	0	0	0	None
Program Name		Melting					
CYCLES	1	ANALYSIS MODE	Melting Curves				
	TARGET (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Spet Delay (cycles)	Acquisition Mode
	95	00:00:30	20	0	0	0	None
	40	00:02:00	20	0	0	0	None
	75	00:00:00	0.2	0	0	0	Continuous
Program Name		Enfriamiento					
CYCLES	1	ANALYSIS MODE	None				
	TARGET (°C)	Hold (hh:mm:ss)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Spet Delay (cycles)	Acquisition Mode
	40	00:00:30	20	0	0	0	None

Chanel 530, Color Compensation: Off, Show Shoulders: Off, High Sensitivity: Off. Max Peaks: 2

17.2.2. Secuencias De Primers Y Sondas para PTPN22 (C1858T)

Primer F 5' ACTATgTTgCgCAggCTAgTC 3'

Primer R 5' TgCTCCAaggATAgATgAAATCC 3'

Sonda A 5' CTgTACTCACCAgCTTCCTCAACCAC—FL

Sonda S 5' LC640-AAATgATTCaggTgTCCATACAgg—PH

17.2.3. Procedimiento

Las dos formas de mezcla se realizaron de la siguiente manera: Para preparar los componentes de la reacción de una sola reacción de 5µl (384 y placa) o de una sola 25µl de reacción (placa de 96 pocillos) se refieren a las tablas a continuación. (Ver tabla 1a y 1b):

Tabla 1a. Allelic discrimination PCR Reaction 40X mix (part number 4331349, 4332072, 4332077 and 4332075).

Reaction Component	Volume/well (5µl volume reaction) ¹	Volume/well (2µl volume reaction) ¹	Final Concentration
Taqman ^R Universal PCR Master Mix, No AmpErase ^R UNG (2X)	2.5	12.5	1X
40X Assay Mix	0.1	0.625	1X
Genomic DNA diluted in dH ₂ O ⁽²⁾	2.375	11.875	
Total	5	25	

Tabla 1b. Allelic discrimination PCR Reaction 80X mix (part number 4332073, and 4332076)

Reaction Component	Volume/well (5µl volume reaction) ³	Volume/well (2µl volume reaction) ³	Final Concentration
Taqman ^R Universal PCR Master Mix, No AmpErase ^R UNG (2X)	2.5	12.5	1X
80X Assay Mix	0.0625	0.3125	1X
Genomic DNA diluted in dH ₂ O ⁽⁴⁾	2.4275	12.1875	
Total	5	25	

17.2.4. Preparación De La Reacción Mix

Para 20ul de reacción se utilizan los siguientes reactivos y cantidades (ul)

H ₂ O	14.4ul
Reagent Mix (sonda más primer)	1.0ul
fastStart DNA Master	2.0ul
MgCl ₂ (25mM)	1.6ul
DNA	1.0-5.0ul (-50ng)
Final MgCl ₂ concentración	3.0mM

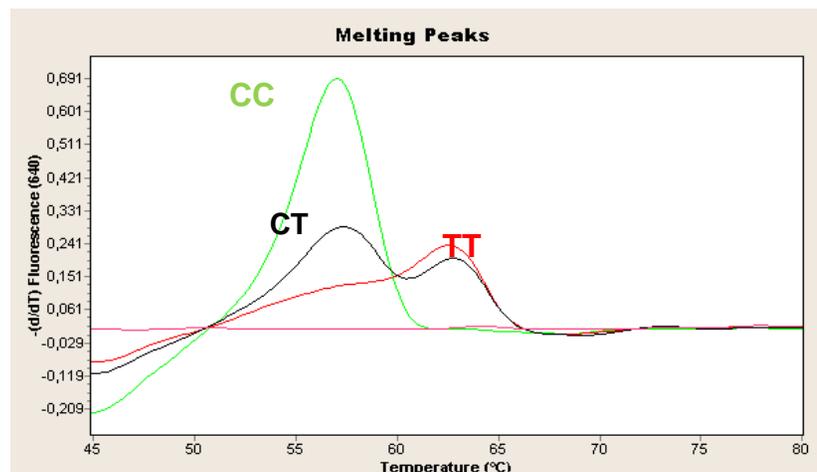
17.2.5. Genotipificación

A las muestras de ADN se les midió la concentración a 260 nm y se ajustó a 25 ng. Se evaluó el coeficiente de pureza para cada una de las muestras. La mayoría de las muestras tenían un coeficiente entre 1.7-1.9, muestras menores de 1.5 y mayores de 2.0 se purificaron.

17.2.6. Controles

Se identificaron los tres genotipos en los controles para sondas de hibridación realizadas en el Ligthcycler. (Ver fig 14).

Figura 14. Controles Genotipificación Sondas De Hibridación *PTPN22* (C1858T).



18. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

La recolección de los datos se sentó en registros individuales que incluían las variables consideradas en el estudio de los dos sistemas genéticos considerados en el presente estudio. Se calculó la fracción etiológica y preventiva para así determinar los marcadores moleculares de susceptibilidad y protección, como también las frecuencias alélicas y génicas para poder determinar los polimorfismos que mostraron un mayor fuerza de asociación estadística.

Para la asociación de los polimorfismos con AR Reumatoide de Instalación Temprana y AIJ Poliarticular, se construyeron tablas de contingencia (2x2) para calcular el OR con un IC del 95% y un valor de $p < 0.05$ de cada polimorfismo y alelos MHC/HLA-DRB1* en los dos grupos de pacientes vs controles para cuantificar la magnitud de la asociación ya sea en protección o severidad para la (AIJ) Poliarticular y AR de Instalación Temprana.

Se contrastó la hipótesis de asociación mediante un test de χ^2 con su respectivo valor de $p < 0,05$ con un IC del 95%, se tuvo en cuenta el test exacto de Fisher y la p corregida de Yates en aquellos casos donde la frecuencia esperada eran menor de 5 (Test de Yates) y menor de 3 con el Test Exacto de Fisher. Se utilizó el cálculo de Bonferroni como un método usado para contrarrestar el problema de las comparaciones múltiples como es el caso de dos grupos de casos versus un grupo control es decir una relación 1:1:2

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa estadístico SPSS 11.5 para el análisis descriptivo y de correlación univariado y multivariado, así mismo para el procesamiento de las tablas y gráficas.

El programa EpiInfo versión 6.0 para el análisis de asociación en cuanto al OR, intervalo de confianza y valor de p (χ^2 , corrección de Yates y Fisher).

Para buscar la correlación de los alelos MHC/HLA: DRB1* se considero realizar un análisis multivariado de regresión logística. Para el modelo multivariado se escogieron solamente aquellos polimorfismos que al momento de la asociación arrojaron valores de $p < 0.05$ en el análisis de *Casos y Controles* y cuyo nivel de confianza estuvieron en un rango del 90 y 95% con el fin de dar respuesta a la hipótesis de la investigación.

Para determinar el equilibrio de Hardy Weinberg se utilizo la calculadora virtual para pruebas de comprobación biológica de Estudios de aleatorización mendeliana de la American Journal of Epidemiology. (Hardy-Weinberg calculadora incluyendo el análisis de sesgo de evaluación.

<http://translate.google.com.co/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>)

19. RESULTADOS

Tabla 6. Polimorfismo (C1858T) PTPN22 en pacientes con (AIJ) Poliarticular

Polimorfismo (C1858T) PTPN22	N	Porcentaje
CC	27	90,0
CT	2	6,7
TT	1	3,3
Total	30	100,0

La tabla muestra como el alelo en los pacientes con Artritis Idiopática Juvenil Poliarticular el (C/C) con un 90%, seguido del (C/T) con un 6,7% y (T/T) con un 3,3% para un total del 100%, en esta población de pacientes Colombianos.

Calculo del equilibrio de Hardy-Weinberg:

Homocigotos común	<input type="text" value="27"/>	Heterocigotos	<input type="text" value="2"/>	Los homocigotos raros	<input type="text" value="1"/>
<input type="button" value="Calculate"/> <input type="button" value="Reajustar"/>					

Result

$\chi^2 = 6.47$
(30 samples counted)
for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	26.13	27
Heterozygotes	3.73	2
Rare homozygotes	0.13	1

p allele freq = 0.93; q allele freq = 0.07

Solutions for perfect HWE, under a model of ascertainment (+/-) of one group

Group affected	Common Hz	Heterozygotes	Rare Hz	p allele freq	q allele freq
Common Hz	1	2	1	0.5	0.5
Heterozygotes	27	10.39	1	0.84	0.16
Rare Hz	27	2	0.04	0.96	0.04

χ^2 : se refiere al chi-cuadrado cuyo valor indica la diferencia entre los valores esperados y observados para el recuento de genotipo. El grado de libertad para χ^2 (1 grado de libertad) ayuda ajustar la probabilidad de no observar las diferencias de los valores esperados y observados por casualidad. [Santiago Rodriguez, Tom R. Gaunt. Hardy-Weinberg pruebas de comprobación biológica de Estudios de aleatorización mendeliana. Hardy-Weinberg calculadora incluyendo el análisis de sesgo de evaluación.](http://translate.google.com.co/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml)

Interpretación: Chi-cuadrado de distribución (1 grado de libertad):

Nivel De Significancia Estadística	COMPROBACION DE HIPOTESIS				
	P valor	0.05	0.01	0.005	0.001
1 Grados de Libertad	Chi-cuadrado	3.84	6.63	7.88	10.83

Si el estadístico χ^2 es menor que 3,841 se acepta la hipótesis nula de que las dos poblaciones son las mismas que se verifica y la población se dice que está en Equilibrio de Hardy Weinberg. Pero si el valor está por encima de 3.841 las dos poblaciones son diferentes y la población no está en Equilibrio Hardy Weinberg.

Los números en rojo de la primera fila representan el número de homocigotos comunes previsto en el equilibrio **Hardy-Weinberg**, si los grupos se supone que son correctos, el número en rojo se ha ajustado a la cantidad *esperada* en equilibrio Hardy-Weinberg, teniendo en cuenta las cifras *observadas*. El número total de genotipos no es necesariamente igual al número observado. Por lo tanto este grupo de pacientes no se encuentra en HW: $\chi^2=6.47$ con un valor de $p=0.01$.

Tabla 7. Polimorfismo (C1858T) PTPN22 pacientes con AR Reumatoide de Instalación Temprana.

Polimorfismo (C1858T) PTPN22	N	Porcentaje
CC	22	73,3
CT	6	20,0
IND	2	6,7
Total	30	100,0

IND: Indeterminado.

La presente tabla muestra como el alelo en los pacientes con Artritis Reumatoide de Instalación Temprana el (C/C) con un 73,3%, seguido del (C/T) con un 20% y (indeterminado) con un 6,7%, es decir a este grupo de paciente no se le pudo tipificar la muestra para un total del 100%.

Calculo del equilibrio de Hardy-Weinberg:

Homocigotos común Heterocigotos Los homocigotos raros

Result

$\chi^2 = 0.4$
(28 samples counted)
for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	22.32	22
Heterozygotes	5.36	6
Rare homozygotes	0.32	0

p allele freq = 0.89; q allele freq = 0.11

Solutions for perfect HWE, under a model of ascertainment (+/-) of one group

Group affected	Common Hz	Heterozygotes	Rare Hz	p allele freq	q allele freq
Common Hz	Infinity	6	0	NaN	NaN
Heterozygotes	22	0	0	1	0
Rare Hz	22	6	0.41	0.88	0.12

χ^2 : se refiere al chi-cuadrado cuyo valor indica la diferencia entre los valores esperados y observados para el recuento de genotipo. El grado de libertad para χ^2 (1 grado de libertad) ayuda ajustar la probabilidad de no observar las diferencias de los valores esperados y observados por casualidad. [Santiago Rodriguez, Tom R. Gaunt. Hardy-Weinberg pruebas de comprobación biológica de Estudios de aleatorización mendeliana. Hardy-Weinberg calculadora incluyendo el análisis de sesgo de evaluación.](http://translate.google.com.co/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.oegq.org/software/hwe-mr-calc.shtm)

Interpretación: Chi-cuadrado de distribución (1 grado de libertad):

Nivel De Significancia Estadística	COMPROBACION DE HIPOTESIS				
	P valor	0.05	0.01	0.005	0.001
1 Grados de Libertad	Chi-cuadrado	3.84	6.63	7.88	10.83

Si el estadístico χ^2 es menor que 3,841 se acepta la hipótesis nula de que las dos poblaciones son las mismas que se verifica y la población se dice que está en Equilibrio de Hardy Weinberg. Pero si el valor está por encima de 3.841 las dos poblaciones son diferentes y la población no está en Equilibrio Hardy Weinberg.

Los números en rojo de la primera fila representan el número de homocigotos comunes previsto en el equilibrio **Hardy-Weinberg**, si los grupos se supone que son correctos, el número en rojo se ha ajustado a la cantidad esperada en equilibrio Hardy-Weinberg, teniendo en cuenta las cifras observadas. El número total de genotipos no es necesariamente igual al número observado. Por lo tanto en este grupo de pacientes se encuentra en equilibrio de HW ya que estuvo por debajo de 3,84 con un valor de $p > 0.05$ el cual no es significativo.

Tabla 8. Polimorfismo (C1858T) PTPN22 en una población de Controles Sanos.

Polimorfismo (C1858T) PTPN22	N	Porcentaje
CC	59	98,3
CT	1	1,7
Total	60	100,0

La presente grafica muestra como el alelo en los Controles-Sanos es el (C/C) con un 98,3%, seguido del (C/T) con un 1,7% para un total del 100%, estos alelos se encuentran en HWE en esta población de Colombianos.

Calculo del equilibrio de Hardy-Weinberg:

Homocigotos común Heterocigotos Los homocigotos raros

Result

$\chi^2 = 0$
(60 samples counted)
for likelihoods of calculated χ^2 value see below.

Genotype	Expected	Observed
Common homozygotes	59	59
Heterozygotes	0.99	1
Rare homozygotes	0	0

p allele freq = 0.99; q allele freq = 0.01

Solutions for perfect HWE, under a model of ascertainment (+/-) of one group

Group affected	Common Hz	Heterozygotes	Rare Hz	p allele freq	q allele freq
Common Hz	Infinity	1	0	NaN	NaN
Heterozygotes	59	0	0	1	0
Rare Hz	59	1	0	0.99	0.01

χ^2 : se refiere al chi-cuadrado cuyo valor indica la diferencia entre los valores esperados y observados para el recuento de genotipo. El grado de libertad para χ^2 (1 grado de libertad) ayuda ajustar la probabilidad de no observar las diferencias de los valores esperados y observados por casualidad. [Santiago Rodriguez, Tom R. Gaunt. Hardy-Weinberg pruebas de comprobación biológica de Estudios de aleatorización mendeliana. Hardy-Weinberg calculadora incluyendo el análisis de sesgo de evaluación. http://translate.google.com.co/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml](http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml)

Interpretación: Chi-cuadrado de distribución (1 grado de libertad):

Nivel De Significancia Estadística	COMPROBACION DE HIPOTESIS				
	P valor	0.05	0.01	0.005	0.001
1 Grados de Libertad	Chi-cuadrado	3.84	6.63	7.88	10.83

Si el estadístico χ^2 es menor que 3,841 se acepta la hipótesis nula de que las dos poblaciones son las mismas que se verifica y la población se dice que está en Equilibrio de Hardy Weinberg. Pero si el valor está por encima de 3.841 las dos poblaciones son diferentes y la población no está en Equilibrio Hardy Weinberg.

Los números en rojo de la primera fila representan el número de homocigotos comunes previsto en el equilibrio **Hardy-Weinberg**, si los grupos se supone que

son correctos, el número en rojo se ha ajustado a la cantidad esperada en equilibrio Hardy-Weinberg, teniendo en cuenta las cifras observadas. El número total de genotipos no es necesariamente igual al número observado. Por lo tanto en este grupo de pacientes se encuentra en equilibrio de HW ya que estuvo por debajo de 3,84 con un valor de $p > 0.05$ el cual no es significativo.

Tabla 9. Frecuencia alelica y génica del MHC/HLA- DRB1* en un grupo de pacientes con AIJ Poliarticular.

Alelos HLA-DRB1*	Numero De Alelos	Frecuencia Alelica	1 -Frecuencia Alelica	Raiz Cuadrada	Frecuencia Génica	Porcentaje
DRB1*0101	3	0,05	0,95	0,974679434	0,025320566	5
DRB1*0301	6	0,1	0,9	0,948683298	0,051316702	10
DRB1*0401	1	0,016666667	0,983333333	0,991631652	0,008368348	1,6666667
DRB1*0402	3	0,05	0,95	0,974679434	0,025320566	5
DRB1*0403	1	0,016666667	0,983333333	0,991631652	0,008368348	1,6666667
DRB1*0404	5	0,083333333	0,916666667	0,957427108	0,042572892	8,3333333
DRB1*0405	2	0,033333333	0,966666667	0,98319208	0,01680792	3,3333333
DRB1*0407	2	0,033333333	0,966666667	0,98319208	0,01680792	3,3333333
DRB1*0408	1	0,016666667	0,983333333	0,991631652	0,008368348	1,6666667
DRB1*0411	2	0,033333333	0,966666667	0,98319208	0,01680792	3,3333333
DRB1*0701	2	0,033333333	0,966666667	0,98319208	0,01680792	3,3333333
DRB1*0802	2	0,033333333	0,966666667	0,98319208	0,01680792	3,3333333
DRB1*0901	6	0,1	0,9	0,948683298	0,051316702	10
DRB1*1001	1	0,016666667	0,983333333	0,991631652	0,008368348	1,6666667
DRB1*1101	4	0,066666667	0,933333333	0,966091783	0,033908217	6,6666667
DRB1*1104	1	0,016666667	0,983333333	0,991631652	0,008368348	1,6666667
DRB1*1301	4	0,066666667	0,933333333	0,966091783	0,033908217	6,6666667
DRB1*1303	3	0,05	0,95	0,974679434	0,025320566	5
DRB1*1305	1	0,016666667	0,983333333	0,991631652	0,008368348	1,6666667
DRB1*1402	2	0,033333333	0,966666667	0,98319208	0,01680792	3,3333333
DRB1*1501	3	0,05	0,95	0,974679434	0,025320566	5
DRB1*1502	2	0,033333333	0,966666667	0,98319208	0,01680792	3,3333333
DRB1*1503	2	0,033333333	0,966666667	0,98319208	0,01680792	3,3333333
DRB1*1602	1	0,016666667	0,983333333	0,991631652	0,008368348	1,6666667
TOTAL	60					

La tabla muestra como mayor expresión genotípica los alelos MHC/HLA-DRB1*. Los alelos DRB1*0301 con un 10%, DRB1*0404 con un 8.33%, y el alelo MHC/HLA-Clase II: DRB1*0901 con un 10% para un total de 28.33% el resto de los alelos se encuentra distribuidos en sumatoria en un porcentaje del 71.67%.

Tabla 10. Frecuencia alelica y génica del MHC/HLA- DRB1* en un grupo de Pacientes con AR de Instalación Temprana.

Alelos HLA-DRB1*	Numero De Alelos	Frecuencia Alelica	1 -Frecuencia Alelica	Raíz Cuadrada	Frecuencia Génica	Porcentaje
DRB1*0101	12	0,2	0,8	0,894427191	0,105572809	20
DRB1*0103	1	0,016666667	0,983333333	0,991631652	0,008368348	1,666666667
DRB1*0301	6	0,1	0,9	0,948683298	0,051316702	10
DRB1*0302	1	0,016666667	0,983333333	0,991631652	0,008368348	1,666666667
DRB1*0401	3	0,05	0,95	0,974679434	0,025320566	5
DRB1*0402	2	0,033333333	0,966666667	0,98319208	0,01680792	3,333333333
DRB1*0404	2	0,033333333	0,966666667	0,98319208	0,01680792	3,333333333
DRB1*0406	1	0,016666667	0,983333333	0,991631652	0,008368348	1,666666667
DRB1*0407	2	0,033333333	0,966666667	0,98319208	0,01680792	3,333333333
DRB1*0408	2	0,033333333	0,966666667	0,98319208	0,01680792	3,333333333
DRB1*0701	2	0,033333333	0,966666667	0,98319208	0,01680792	3,333333333
DRB1*0802	1	0,016666667	0,983333333	0,991631652	0,008368348	1,666666667
DRB1*0901	5	0,083333333	0,916666667	0,957427108	0,042572892	8,333333333
DRB1*1001	4	0,066666667	0,933333333	0,966091783	0,033908217	6,666666667
DRB1*1101	2	0,033333333	0,966666667	0,98319208	0,01680792	3,333333333
DRB1*1301	2	0,033333333	0,966666667	0,98319208	0,01680792	3,333333333
DRB1*1303	2	0,033333333	0,966666667	0,98319208	0,01680792	3,333333333
DRB1*1501	7	0,116666667	0,883333333	0,939858145	0,060141855	11,666666667
DRB1*1503	3	0,05	0,95	0,974679434	0,025320566	5
TOTAL	60					

La tabla muestra la distribución genotípica de los alelos MHC/HLA- DRB1*, en donde la mayor distribución la tienen los alelos DRB1*0101 con un 20%, seguido del DRB1*0301 con un 10%, el DRB1*0901 con un 8.33% y el DRB1*1501 con un 11.66%, para un porcentaje total de alelos del 49.99%. El resto de alelos se encuentran en un menor porcentaje.

Tabla 11. Frecuencia alelica del exón HLA-DRB1* más frecuentemente expresados en pacientes con AIJ poliarticular y AR de instalación temprana y sujetos controles.

HLA-DRB1*	(AIJ) POLIARTICULAR N=30 (%)	CONTROLES N=60 (%)	OR (IC 95%)	Valor de p	AR DE INSTALACION TEMPRANA N=30 (%)	CONTROLES N=60 (%)	OR (IC 95%)	Valor de p
DRB1*0101	3 (5)	7 (6)	0.85 (0.17-3.84)	0.559*	12 (20)	7 (6)	4.04 (1.37-12.19)	0.007** ^B
DRB1*0103	0 (0)	4 (3)	0.00 (0.00-3.07)	0.194*	1 (2)	4 (3)	0.49 (0.02-4.83)	0.459*
DRB1*0301	6 (10)	8 (7)	1.56 (0.46-5.26)	0.304*	6 (10)	8 (7)	1.56 (0.46-5.26)	0.304*
DRB1*0302	0 (0)	2 (2)	0.00 (0.00-11.01)	0.528*	1 (2)	2 (2)	1.00 (ind-ind)	0.706*
DRB1*0401	1 (2)	1 (1)	2.02 (0.0-75.27)	0.556*	3 (5)	1 (1)	6.26 (0.56-159.85)	0.108*
DRB1*0402	3 (5)	0 (0)	Ind	0.035*	2 (3)	0 (0)	Ind	0.109
DRB1*0403	1 (2)	1 (1)	2.02 (0.0-75.27)	0.556*	0 (0)	1 (1)	0.00 (0.00-35.10)	0.666*
DRB1*0404	5 (8)	1 (1)	10.82 (1.18-250.67)	0.016* ^B	2 (3)	1 (1)	4.10 (0.28-116.83)	0.258*
DRB1*0405	2 (3)	1 (1)	4.10 (0.28-116.83)	0.258*	0 (0)	1 (1)	0.00 (0.00-35.10)	0.666*
DRB1*0406	0 (0)	1 (1)	0.00 (0.00-35.10)	0.666*	1 (2)	1 (1)	2.02 (0.0-75.27)	0.556*
DRB1*0407	2 (3)	3 (3)	1.34 (0.15-10.25)	0.540*	2 (3)	3 (3)	1.34 (0.15-10.25)	0.540*
DRB1*0408	1 (2)	0 (0)	Ind	0.333	2 (3)	0 (0)	Ind	0.109*
DRB1*0409	0 (0)	1 (1)	0.00 (0.00-35.10)	0.666*	0 (0)	1 (1)	0.00 (0.00-35.10)	0.666*
DRB1*0411	2 (3)	3 (3)	1.34 (0.15-10.25)	0.540*	0 (0)	3 (3)	0.00 (0.00-4.51)	0.293*
DRB1*0415	0 (3)	1 (1)	0.00 (0.00-35.10)	0.666*	0 (0)	1 (1)	0.00 (0.00-35.10)	0.666*
DRB1*0701	2 (3)	22 (18)	0.15 (0.02-0.71)	0.011** ^B	2 (3)	22 (18)	0.15 (0.02-0.71)	0.011** ^B
DRB1*0801	0 (0)	6 (5)	0.00 (0.00-1.85)	0.084*	0 (0)	6 (5)	0.00 (0.00-1.92)	0.089*
DRB1*0802	2 (3)	1 (1)	4.10 (0.28-116.83)	0.258*	1 (2)	1 (1)	2.02 (0.0-75.27)	0.556*
DRB1*0803	0 (0)	1 (1)	0.00 (0.00-35.10)	0.666*	0 (0)	1 (1)	0.00 (0.00-35.10)	0.666*
DRB1*0901	6 (10)	0 (0)	Ind	0.001* ^B	5 (8)	0 (0)	Ind	0.003* ^B
DRB1*1001	1 (2)	2 (2)	1.00 (ind-ind)	0.706*	4 (7)	2 (2)	4.21 (0.64-34.26)	0.096*
DRB1*1101	4 (7)	6 (5)	1.36	0.440*	2 (3)	6 (5)	0.66	0.465*

			(0.31-5.73)				(0.09-3.75)	
DRB1*1102	0 (0)	7 (6)	0.00 (0.00-1.54)	0.055*	0 (0)	7 (6)	0.00 (0.00-1.54)	0.055*
DRB1*1104	1 (2)	2 (2)	1.00 (ind-ind)	0.706*	0 (0)	2 (2)	0.00 (0.00-11.01)	0.528*
DRB1*1105	0 (0)	1 (1)	0.00 (0.00-35.10)	0.666*	0 (0)	1 (1)	0.00 (0.00-35.10)	0.666*
DRB1*1201	0 (0)	4 (3)	0.00 (0.00-3.07)	0.194*	0 (0)	4 (3)	0.00 (0.00-3.07)	0.194*
DRB1*1301	4 (7)	8 (7)	1.00 (0.24-3.88)	0.612*	2 (3)	8 (7)	0.48 (0.07-2.57)	0.292*
DRB1*1302	0 (0)	2 (2)	0.00 (0.00-11.0)	0.528*	0 (0)	2 (2)	0.00 (0.00-11.0)	0.528*
DRB1*1303	3 (5)	2 (2)	3.11 (0.41-27.4)	0.207*	2 (3)	2 (2)	2.03 (0.20-20.8)	0.407*
DRB1*1304	0 (0)	1 (1)	0.00 (0.00-35.1)	0.666*	0 (0)	1 (1)	0.00 (0.00-35.1)	0.666*
DRB1*1305	1 (2)	1 (1)	2.02 (0.0-75.27)	0.556*	0 (0)	1 (1)	0.00 (0.00-35.1)	0.666*
DRB1*1401	0 (0)	4 (3)	0.00 (0.00-3.07)	0.194*	0 (0)	4 (3)	0.00 (0.00-3.07)	0.194*
DRB1*1402	2 (3)	1 (1)	4.10 (0.28-116.8)	0.258*	0 (0)	1 (1)	0.00 (0.00-35.1)	0.666*
DRB1*1501	3 (5)	8 (7)	0.74 (0.15-3.22)	0.496*	7 (12)	8 (7)	1.85 (0.57-5.99)	0.391**
DRB1*1502	2 (3)	1 (1)	4.10 (0.28-116.83)	0.258*	0 (0)	1 (1)	0.00 (0.00-35.1)	0.666*
DRB1*1503	2 (3)	0 (0)	Ind	0.109	3 (5)	0 (0)	Ind	0.035*
DRB1*1601	0 (0)	4 (3)	0.00 (0.00-3.07)	0.194*	0 (0)	4 (3)	0.00 (0.00-3.07)	0.194*
DRB1*1602	1 (2)	0 (0)	Ind	0.333	0 (0)	0 (0)	Ind	Ind
DRB1*1604	0 (0)	2 (2)	0.00 (0.00-11.01)	0.528*	0 (0)	2 (2)	0.00 (0.00-11.0)	0.528*
TOTAL	60 (100)	120 (100)			60 (100)	120 (100)		

**Test de Yates; *Test Exacto de Fisher. B: Corrección de Bonferroni Ajustado < 0,025 con un (1) Grado de Libertad y correlación de 1.

La tabla muestra los alelos HLA-DRB1* presentes en un grupo de pacientes con (AIJ) poliarticular y AR de Instalación Temprana como posibles marcadores de susceptibilidad o protección para las dos entidades.

Tabla 12. Frecuencia alelica del exón 2 en los alelos HLA-DRB1* más frecuentemente expresados en un grupo de pacientes sufriendo de AIJ Poliarticular Y AR de Instalación Temprana.

HLA-DRB1*	(AIJ) POLIARTICULAR N=30 (%)	CONTROLES N=60 (%)	OR (IC 95%)	Valor de p	AR DE INSTALACION TEMPRANA N=30 (%)	CONTROLES N=60 (%)	OR (IC 95%)	Valor de p
DRB1*0101	3 (5)	7 (6)	0.85 (0.17-3.84)	0.559*	12 (20)	7 (6)	4.04 (1.37-12.19)	0.007** ^B
DRB1*0404	5 (8)	1 (1)	10.82 (1.18-250.67)	0.016* ^B	2 (3)	1 (1)	4.10 (0.28-116.83)	0.258*
DRB1*0701	2 (3)	22 (18)	0.15 (0.02-0.71)	0.011** ^B	2 (3)	22 (18)	0.15 (0.02-0.71)	0.011** ^B

**Test de Yates; *Test Exact de Fisher. B: Corrección de Bonferroni Ajustado<0,025 con un (1) Grado de Libertad y una correlación de 1.

La tabla muestra al alelo HLA-DRB1*0404 como un posible marcador de susceptibilidad para (AIJ) poliarticular (OR=10.82; IC: 1.18-250.67; p=0,016.) El alelo HLA-DRB1*0701 se muestra como un marcador de protección tanto para (AIJ) poliarticular, (OR= 0.15; IC: 0.02-0.71); p=0.011) como para AR de Instalación temprana (OR= 0.15; IC: 0.02-0.71) con un valor de p=0.011.

Nótese en la tabla como el alelo HLA-DRB1*0101 se sugiere como un posible marcador de susceptibilidad para AR de instalación temprana, (OR= 4.04; IC: 1.37-12.19) p=0,007.

Tabla 13. Análisis de asociación de las frecuencias alélicas del polimorfismo C1858T de PTPN22 en controles y pacientes con AIJ Poliarticular y AR Reumatoide de Instalación Temprana.

PTPN22 (C1858T)	(AIJ) POLIARTICULAR N=30 (%)	CONTROLES N=60 (%)	OR (IC 95%)	Valor de p	AR DE INSTALACION TEMPRANA N=30 (%)	CONTROLES N=60 (%)	OR (IC 95%)	Valor de p
CC	27 (90)	59 (98,3)	0,23 (0,0337- 1,6655)	0,070543**	22 (81,5)	59 (98,3)	0,05 (0,00-0,41)	0,0005* ^B
CT	2 (6,7)	1 (1,7)	3,10 (0,39- 24,667)	0,212881*	6 (18,5)	1 (1,7)	16,09 (1,73-375)	0,0037* ^B
TT	1 (3,3)	0 (0,0)	0,19 (0,161-102,88)	0,154987*	2 (Ind)	0 (0,0)	6,31 (0,29-136)	0,043114
Total	30	60			30	60		

**Test Yates, Ind: Indeterminado, *Test Exacto de Fisher, B: Corrección de Bonferroni Ajustado <0,025 con un (1) Grado de Libertad y una correlación de 1.

La tabla describe el polimorfismo (C1858T) de PTPN22 en los pacientes con AIJ Poliarticular. El alelo silvestre (C/C) se expreso con un OR=0,23; p=0,070543, el cual se sugiere como un alelo de protección. El alelo mutado (C/T) con un OR=3,10; p=0,212881 y el alelo homocigoto (T/T) un OR= 0,19; p=0,106* y en los pacientes con Artritis Reumatoide de Instalación Temprana el alelo silvestre (C/C) se expreso con un OR=0,06; p=0,0005* sugiriéndolo como un alelo de protección para AR. El alelo mutado (C/T) mostró un OR=16,09; p=0,0037* lo cual indica que es un alelo asociado con susceptibilidad en esta entidad. El cálculo de Bonferroni de muestra que la posición de los alelos del PTPN22 específicamente el alelo mutante (CT) posiblemente es un marcador de susceptibilidad para (AR) de Instalación Temprana con un valor de p<0,025.

Tabla 14. Secuencia aminoacídica de los residuos de la posición 70-74 (epitope compartido) del MHC/HLA-DRB1* y su asociación con Artritis Reumatoide De Instalación Temprana.

ALELOS MHC/HLA-CLASE II: DRB1*	EPITOPE COMPARTIDO Pocket 4 (70-74)	ARTRITIS REUMATOIDE DE INSTALACION TEMPRANA n= 60 (%)	CONTROLES n=120 (%)	OR IC (95%)	Valor de p
*1301, *1304 *0103, *0402, *1302, *1102 *1303	DERRA	5 (8)	22 (37)	0,40 (0,13-1,21)	0,12**
	DKRAA	2 (3)	2 (3)	2,03 (0,20-20,84)	0,60*
*1101, *0415, *1104, *1305, 1602 *0801, *0802, *0803 *0701	DRRAA	2 (3)	10 (17)	0,38 (0,06-1,94)	0,34*
	DRRAL	1 (2)	8 (13)	0,24 (0,01-1,94)	0,28*
	DRRGQ	2 (3)	22 (37)	0,15 (0,02-0,71)	0,01**^B
*1501, *1502, *1503 *0401, *0409 *0301, *0302	QARAA	10 (17)	9 (15)	2,47 (0,8-7,12)	0,10**
	QKRAA	3 (5)	2 (3)	3,11 (0,41-27,43)	0,34*
	QKRGR	7 (12)	10 (17)	1,45 (0,47-4,44)	0,65**
*0101, *0404, *0405, *0408 *0406, *0407, *0403, *0411 *1001 *0901, *1401 *1105 *1201 *1601, *1604 TOTAL	QRRAA	16 (27)	10 (17)	4,00 (1,56-10,37)	0,002**^B
	QRRAE	3 (5)	8 (13)	0,74 (0,15-3,22)	0,75*
	RRRAA	4 (7)	2 (3)	4,21 (0,64-34,26)	0,09*
	RRRAE	5 (8)	4 (7)	2,64 (0,58-12,27)	0,16*
	VDTYC	0 (0,00)	1 (2)	0,00 (0,00-35,10)	1,0*
	DRPAA	0 (0,00)	4 (7)	0,00 (0,00-3,07)	0,30*
	ERRAA	0 (0,00)	6 (10)	0,00 (0,00-1,85)	0,18*
		60 (100)	120 (100)		

**Corrección De Yates; *Test Exacto De Fisher; B: Corrección de Bonferroni Ajustado<0,025 con un (1) Grado de Libertad y una correlación de 1.

La tabla describe al alelo HLA-DRB1*0701 cuya secuencia en la posición (70-74) del bolsillo 4 de la tercera región hipervariable de la cadena HLA-DRB1* (**DRRGQ**) con un (OR=0,15; IC: 0,02-0,71) con un valor de p=0,01, el cual se sugiere como un posible alelo de protección para este grupo de pacientes con AR de instalación temprana. Los alelos HLA-DRB1*0101,*0404 y *0405 con una secuencia en la posición (70-74) de (**QRRAA**) se asoció como un posible alelo de susceptibilidad a la enfermedad con un (OR= 4,00; IC: 1,56-10,37) con un valor de p=0,002.

Tabla 15. Secuencia aminoacídica de los residuos de la posición 70-74 (epitope compartido) del MHC/HLA-CLASE II: DRB1* y su asociación con Artritis Idiopática Juvenil Poliarticular.

ALELOS MHC/HLA-Clase II: DRB1*	EPITOPE COMPARTIDO Pocket 4 (70-74)	AIJ POLIARTICULAR n= 60 (%)	CONTROLES n=120 (%)	OR IC (95%)	Valor de p
*1302, *1304, *0103, *0402, *1301, *1102, *1303	DERRA	7 (12)	22 (37)	0,59 (0,21-1,57)	0,35**
	DKRAA	3 (5)	2 (3)	3,11 (0,41-2743)	0,34*
*1101, *0415, *1104, *1305, *1602 *0801, *0802, *0803	DRRAA	7 (12)	10 (17)	1,45 (0,47-4,44)	0,65**
	DRRAL	2 (3)	8 (13)	0,48 (0,07-2,57)	0,49*
*0701	DRRGQ	2 (3)	22 (37)	0,15 (0,02-0,71)	0,01**^B
*1501, *1502, *1503	QARAA	7 (12)	9 (15)	1,63 (0,51-5,11)	0,52**
*0401, *0409	QKRAA	1 (2)	2 (3)	1,00 (Ind-Ind)	1,0*
*0301, *0302	QKRGR	6 (10)	10 (17)	1,22 (0,37-3,91)	0,93**
*0101, *0404, *0405, *0408, *1402	QRRAA	13 (22)	10 (17)	3,04 (1,15-8,13)	0,02**^B
*0403, *0407, *0406, *0411	QRRAE	5 (8)	8 (13)	1,27 (0,34-4,56)	0,76*
1001	RRRAA	1 (2)	2 (3)	1,00 (Ind-Ind)	1,0
*0901, *1401	RRRAE	6 (10)	4 (7)	3,22 (0,76-14,29)	0,09*
1105	VDTYC	0 (0,0)	1 (2)	0,00 (0,00-35,10)	1,0
1201	DRPAA	0 (0,0)	4 (7)	0,00 (0,00-3,07)	0,3
*1601, *1604	ERRAA	0 (0,0)	6 (10)	0,00 (0,00-1,85)	0,2*
TOTAL		60 (100)	120 (100)		

**Corrección De Yates; *Test Exacto De Fisher; B: Corrección de Bonferroni Ajustado < 0,025 con un (1) Grado de Libertad y una correlación de 1.

La tabla describe como el alelo HLA-DRB1*0701 cuya secuencia en la posición (70-74) del Bolsillo 4 de la tercera región hipervariable de la cadena HLA-DRB1* (DRRGQ) se expresa con un (OR= 0,15; IC: 0,02-0,71) con un valor de p=0,01 el cual se sugiere como un alelo de posible protección. Los alelos HLA-DRB1*0101, *0404, *0405, *0408 y *1402 con la secuencia (QRRAA) presentaron un OR=3,04; IC (1,58-8,13) con un valor de p=0,02 lo cual sugiere como alelos de posible susceptibilidad para la presentación de la enfermedad en esta población de Colombianos con Artritis Idiopática Juvenil Poliarticular.

19.1. PROPUESTA DE UNA CLASIFICACIÓN DEL EPITOPE COMPARTIDO COMUNES PARA (AIJ) POLIARTICULAR Y AR DE INSTALACION TEMPRANA.

Se realizo un análisis de los aminoácidos que hacen parte del epitope compartido (SE), según la asociación existentes de estos con la susceptibilidad o protección en (AIJ) poliarticular y AR de instalación temprana. El análisis arrojó una posible clasificación, apoyándose en el papel que los aminoácidos pueden cumplir en el reconocimiento antigénico³. Es así como se determinó que el aminoácido ácido aspartico (D) confiere cierto grado de protección al encontrarse en la posición 70 del (SE) y el aminoácido glutamina (Q) confiere cierto grado de susceptibilidad al encontrarse en la posición 70 del (SE). Se notó en los análisis de asociación que el aminoácido arginina (R) en cualquier posición de la 71 a la 74 del (SE) del exón 2 de la molécula MHC/HLA- DRB1* tendría un papel importante a través de las fuerzas intermoleculares que interactúan, produciendo cambios en el espacio o conformación molecular del (SE) dependiendo del aminoácido que se encuentre en la posición 70 específicamente (D) o (Q) produciendo una sinergia en la protección o susceptibilidad en las dos patologías; a su vez se identificaron aminoácidos en el epitope compartido “Shared Epitope” (SE) cuyo papel sería neutro, independientemente de la posición en donde encuentre el aminoácido (R) en el (SE), los cuales no fueron objeto de análisis en la presente investigación.

Se propone entonces la siguiente clasificación según las asociaciones encontradas en los análisis de asociación descritos en las tablas anteriores:

1. Secuencias de alelos HLA-DRB1* con (SE) de protección para ambas patologías (AIJ) poliarticular y AR de instalación temprana.

³ *Unos de los principales objetivos de la presente clasificación fue determinar el papel preponderante que pudiese estar cumpliendo el aminoácido (R) en las fuerzas intermoleculares (iónicas y no iónicas) como las de Van der Waals como unas de las principales fuerzas covalentes de interacción electrostática de iones con otros o con moléculas neutras.*

2. Secuencias de alelos HLA-DRB1* con (SE) de susceptibilidad para ambas patologías (AIJ) poliarticular y AR de instalación temprana.
3. Secuencias de alelos HLA-DRB1* con (SE) y demás aminoácidos neutros para ambas patologías (AIJ) poliarticular y AR de instalación temprana.
4. Clasificación general del (SE)

1. Secuencias de alelos HLA-DRB1* con (SE) de protección para ambas patologías (AIJ) poliarticular y AR de instalación temprana.

Las secuencias de (SE) de alelos HLA-DRB1* asociados a protección se clasificaron con la convención letra **(F)**, debido a que poseen en la posición 70 el aminoácido (D) y en cualquier posición de forma individual o repetida entre las posiciones 71 a 74 del (SE) el aminoácido (R) con un posible papel en el cambio de conformación espacial de la molecular al momento de acoplar el antígeno.

1.1. Sistematización de la clasificación por convención.

F: epitopes compartidos con el aminoácido (D) en la posición 70 del bolsillo 4 de la molécula MHC-DRB1*.

F₁: para las secuencias **(D/RR/)**

F₂: para las secuencias **(D/R//)**

F₃: para las secuencias **(DRR//)**

/: *Cualquier otro aminoácido diferente a (D) o (R) dentro del (SE)*

2. Secuencias de alelos HLA-DRB1* con (SE) de susceptibilidad para ambas patologías (AIJ) poliarticular y AR de instalación temprana.

Las secuencias de (SE) de alelos MHC/HLA:DRB1* asociados a susceptibilidad se clasificaron con la convención de la letra (**S**), debido a que poseen en la posición 70 el aminoácido (Q) y en cualquier posición de individual o repetida entre las posiciones 71 a 74 del (SE) el aminoácido (R) con un posible papel en el cambio de conformación espacial de la molecular al momento de acoplar el antígeno.

2.1. Sistematización de la clasificación por convención.

S: epitopes compartido con el aminoácido (Q) en la posición 70 del bolsillo 4 de la molécula MHC/HLA-DRB1*.

S₁: para las secuencias (**Q/R//**)

S₂: para las secuencias (**Q/R/R**)

S₃: para las secuencias (**QRR//**)

/: *Cualquier otro aminoácido diferente a (Q) o (R) dentro del (SE).*

3. Secuencias de alelos HLA-DRB1* con (SE) y demás aminoácidos neutros para ambas patologías (AIJ) poliarticular y AR de instalación temprana.

Secuencias de aminoácidos con un papel neutro ya que no se pudieron asociar con protección o susceptibilidad para las patologías (AIJ) poliarticular y AR de instalación temprana.

3.1. Sistematización de la clasificación por convención.

X₁: Demás secuencias (neutras).

4. Clasificación general del epitope compartido (SE).

Al momento de tener la identificación y determinadas las secuencias de protección o susceptibilidad según la clasificación expuesta se decidió realizar la sumatoria (Σ) de las secuencias proponiendo la siguiente clasificación o convención:

Para las secuencias con el aminoácido (**D**) en la posición 70 seguido del aminoácido (**R**) en cualquier posición del (SE) se considero como protección con la convención de (-) en ambas patologías (AIJ) poliarticular y AR de instalación temprana, entonces la sumatoria de (SE) de posible protección con la convención de (F) que dando representado como: $\Sigma F^{(-)}$.

Para las secuencias con el aminoácido (**Q**) en la posición 70 seguido del aminoácido (**R**) en cualquier posición del (SE) se considero como de susceptibilidad con la convención (+) en ambas patologías (AIJ) poliarticular y AR de instalación temprana, entonces la sumatoria de (SE) de posible susceptibilidad con la convención de (S) que dando representado como: $\Sigma S^{(+)}$. Esta clasificación ayudo a calcular y proponer de manera global en la presente investigación el papel preponderante del (SE) en las dos patologías tanto de manera independiente como grupal considerándolo como un *“posible sistema común para ambas patologías”*.

Reduciendo la clasificación a la siguiente convención dentro del modelo⁴:

1. Epitopes compartidos asociado a protección con el signo (-) quedando con la convención: $\Sigma SE^{(-)}$
2. Epitopes compartidos asociado a susceptibilidad con el signo (+) quedando con la convención: $\Sigma SE^{(+)}$

⁴La clasificación de estas secuencias (SE) fueron creadas de acuerdo a los alelos HLA-DRB1* los cuales se encontraron en el presente estudio como alelos de susceptibilidad o protección para las patologías objetos de investigación.

3. Epitopes compartidos de secuencias neutras sin un papel aparente: X_1

Proponiendo la convención al análisis de la secuencia aminoacídica (70-74) del epitope compartido del bolsillo 4 de MHC/HLA-Clase II: DRB1*

$$\sum SE^{(-)}: F1+F2+F3$$

$$\sum SE^{(+)}: S1+S2+S3$$

X_1

Tabla 16. Frecuencia de aminoácidos que hacen parte del bolsillo 4 en la posición (70) del epítopo compartido del MHC/HLA- DRB1* implicados en la susceptibilidad o protección en las dos entidades (AIJ) Poliarticular y AR de Instalación Temprana

AMINOACIDOS DEL EPITOPE COMPARTIDO EN LA POSICION (70) DEL BOLSILLO 4 DEL MHC/HLA-CLASE II: DRB1*	AIJ POLIARTICULAR n=60 (%)	CONTROLES n=120 (%)	OR	IC	Valor de p	AR REUMATOIDE DE INSTALACION TEMPRANA n=60 (%)	CONTROLES n=120 (%)	OR	IC	Valor de p
D	22 (36,7)	65 (54,2)	0,49	0,25-0,97	0,0397*	12 (20)	65 (54,4)	0,22	0,10-0,48	0,0000* ^B
Q	30 (50)	40 (33,3)	2,00	1,01-3,96	0,045*	39 (65)	40 (33,3)	3,71	1,84-7,53	0,0001* ^B
R	8 (13,3)	6 (5)	2,92	0,86-10,10	0,0735**	9 (15)	6 (4,8)	3,35	1,02-11,30	0,045**
X ¹	0 (0)	9 (7,5)	0,00	0,00-1,14	0,0234**	0 (0)	9 (7,5)	0,00	0,00-1,14	0,023**
Total	60 (100)	120 (100)				60 (100)	120 (100)			

*Test de Yates; **Test Exacto de Fisher; B: Corrección de Bonferroni Ajustado < 0,025 con un (1) Grado de Libertad y una correlación de 1. Aminoácidos que conforman el cuarto bolsillo de unión (Pocket 4): D: Acido Aspártico; Q: Glutamina; R: Arginina; X¹: Demás Aminoácidos.

La tabla describe como el aminoácido de la posición (70) del bolsillo 4 de la región hipervariable de la cadena DRB1, el cual corresponde al aminoácido ácido aspártico (D) contribuye en ambas patologías como un aminoácido de posible protección. Para (AIJ) Poliarticular el aminoácido ácido aspártico (D) un OR=0,49; IC (0,25-0,97) y un valor de p=0,0397* sugiriéndolo como posible protector y para Artritis Reumatoide de Instalación Temprana el aminoácido (D) un OR=0,22; IC (0,10-0,48) y un valor de p=0,0000* sugiriéndolo como posible protector para no presentar la enfermedad. Con relación al aminoácido Glutamina (Q) en la posición (70) del bolsillo 4 de la región hipervariable de la cadena DRB1 se encontró asociado como un aminoácido de posible susceptibilidad en las dos entidades clínicas (AIJ) Poliarticular y AR de Instalación Temprana. Para (AIJ) poliarticular un OR= 2,0; IC (1,01-3,96) con un valor de p=0,045* y para Artritis de Instalación Temprana un OR=3,71; IC (1,84-7,53) con un valor de p=0,0001* con un posible papel en la susceptibilidad de presentar la enfermedad. En pacientes con Artritis Reumatoide de Instalación Temprana se encontró asociado de posible

susceptibilidad a la enfermedad con un OR=3,35; IC: (1,02-11,30) y un valor de $p=0,045^{**}$ para este grupo de pacientes Colombianos.

Tabla 17. Secuencias del epítoto compartido en la posición (70-74) del bolsillo 4 del MHC/HLA- DRB1* implicados en la susceptibilidad o protección en las dos entidades en una población Colombiana.

SECUENCIAS DEL EPITOPE COMPARTIDO (POCKET 4) POSICIÓN (70- 74) EN LOS DOS GRUPOS DE PACIENTES Y CONTROLES DEL ALELO HLA-DRB1*	(AIJ) POLIARTICULAR n=60 (%)					AR DE INSTALACIÓN TEMPRANA n=60 (%)				
	CONTROLES n=120 (%)	OR	IC	Valor de p	CONTROLES n=120 (%)	OR	IC	Valor de p		
F ₁	9 (15)	23 (19,2)	0,74	0,29-1,85	0,629*	5 (8,3)	22 (18,3)	0,40	0,13-1,21	0,121*
F ₂	0 (0)	2 (1,7)	0,00	0,00-8,24	0,553**	2 (3,3)	2 (1,7)	2,03	0,20-20,84	0,602**
F ₃	13 (21,7)	40 (33,3)	0,55	0,25-1,20	0,148*	5 (8,3)	40 (33,3)	0,18	0,06-0,52	0,0005 ^B
S ₁	8 (13,6)	11 (9,2)	1,52	0,52-4,40	0,548*	13 (21,7)	11 (9,2)	2,74	1,06-7,15	0,0363*
S ₂	6 (10)	10 (8,3)	1,22	0,37-3,91	0,926*	7 (11,7)	10 (8,3)	1,45	0,47-4,44	0,652*
S ₃	16 (26,7)	19 (15,8)	1,93	0,85-4,38	0,1256*	16 (26,7)	10 (8,3)	4,00	1,56-10,37	0,0021 ^B
X ¹	8 (13,3)	15 (12,5)	0,37	0,15-0,92	0,031*	12 (20)	25 (20,9)	0,95	0,41-2,18	0,948*
Total	60 (100)	120 (100)				60 (100)	120 (100)			

*Test de Yates; **Test Exacto de Fisher. B: Corrección de Bonferroni Ajustado < 0,025 con un (1) Grado de Libertad y una correlación de 1. Aminoácidos que conforman el cuarto bolsillo de unión (Pocket 4): D: Acido Aspártico; Q: Glutamina; R: Arginina. Clasificación De Secuencias: F₁: (D/RR/); F₂ (D/R//); F₃ (DRR//); S₁: (Q/R//); S₂ (Q/R/R); S₃ (QRR//); X¹: Demás Secuencias (Neutras).

Nótese en la tabla como la secuencia [F₃] se sugiere como posiblemente asociado a protección en pacientes con AR de Instalación Temprana con un OR=0,18; IC (0,06-0,52) con un valor de p<0,05, la secuencia (S₁) se encontró posiblemente asociado a susceptibilidad con un OR=2,74; IC (1,06-7,15) y un valor de p<0,05, la secuencia (S₃) se encontró como un epítoto de posible susceptibilidad con un OR=4,00; IC (1,56-10,37) y un valor de p<0,05 para este grupo de pacientes con Artritis Reumatoide de Instalación Temprana.

Tabla 18. Sumatoria de las frecuencias de epitopes compartidos del bolsillo (4) posición (70-74) del exón 4 del alelo MHC: HLA-DRB1* en los dos grupos de pacientes y controles implicados en la susceptibilidad o protección en las dos entidades en una población Colombiana.

SECUENCIAS DEL EPITOPE COMPARTIDOS DEL BOLSILLO (4) EN LA POSICION (70-74) EN LOS DOS GRUPOS DE PACIENTES Y CONTROLES DEL ALELO MHC/HLA-CLASE II: DRB1*	AIJ POLIARTICULAR n=60 (%)	CONTROLES n=120 (%)	OR	IC	Valor de p	AR DE INSTALACIÓN TEMPRANA n=60 (%)	CONTROLES n=120 (%)	OR	IC	Valor de p
$\sum SE^{(-)}: F_1+F_2+F_3$	22 (31,4)	65 (54,2)	0,49	0,25-0,97	0,0397*	12	64	0,22	0,10-0,48	0,0000* ^B
$\sum SE^{(+)}: S_1+S_2+S_3$	30 (50)	40 (33,3)	2,00	1,01-3,96	0,0454*	36	31	4,31	2,12-8,80	0,0000* ^B
X_1	8 (13,3)	15 (12,5)	0,37	0,15-0,92	0,031*	12 (20)	25 (20,9)	0,95	0,41-2,18	0,948*
Total	60 (100)	120 (100)				60 (100)	120 (100)			

*Test de Yates; **Test Exacto de Fisher. B: Corrección de Bonferroni Ajustado <0,025 con un (1) Grado de Libertad y una correlación de 1. Aminoácidos que conforman el cuarto bolsillo de unión (Pocket 4): D: Acido Aspártico; Q: Glutamina; R: Arginina. Convención De Secuencias: F₁: (D/RR/); F₂ (D/R/); F₃ (DRR/); S₁: (Q/R/); S₂ (Q/R/R); S₃ (QRR/); X₁: Demás Secuencias.; \sum : Sumatoria de secuencias; SE⁽⁻⁾: Epitope Compartido de Protección; SE⁽⁺⁾: Epitope Compartido de Susceptibilidad.

Nótese en la tabla como al momento de realizar la sumatoria de las secuencias con el epitope compartido asociado a protección ($\sum SE^{(-)}: F_1+F_2+F_3$) en las dos entidades (AIJ) Poliarticular y AR de Instalación Temprana, se encontró que en ambas patologías es un epitope importante sugiriéndolo como protector cuando el aminoácido presente en la posición (70) correspondía a un Ácido Aspártico (D) con un OR=0,49; IC (0,25-0,97) con un valor de p<0,05 en pacientes con (AIJ) Poliarticular; mientras que para los pacientes con AR de Instalación Temprana un OR=0,22; IC (0,10-0,48) con un valor de p<0,05 sugiriendo al igual con una posible asociación a protección. Al asociar el aminoácido (R) precedido por (Q) en la posición (70) con las siguientes secuencias ($\sum SE^{(+)}: S_1+S_2+S_3$) se encontró como un factor de riesgo o susceptibilidad para (AIJ) Poliarticular con un OR=2,00; IC (1,01-3,96) con un valor de p<0,05, al igual que para AR de Instalación Temprana con un OR=4,31; IC (2,12-8,80) con un valor de p<0,05 lo cual lo sugiere con un posible papel en la

susceptibilidad de presentar la enfermedad en este grupo de pacientes Colombianos. El cálculo de Bonferroni demuestra que la posición de los aminoácidos en la posición 70 (D) (Q) y el aminoácido (R) en cualquier posición tienen un papel mas preponderante en AR de Instalación Temprana con un valor de $p < 0,025$.

19.2. DISEÑO DEL MODELO DE ANALISIS MULTIVARIADO DE REGRESION LOGISTICA PARA DETERMINAR SISTEMAS GENETICOS COMUNES Y POLIMORFISMOS MOLECULARES- (c1858t) PTPN22 Y MHC/HLA:DRB1*

Para el análisis multivariado se propuso la construcción de un modelo con el fin de determinar las moléculas y polimorfismos moleculares comunes de los dos sistemas genéticos PTPN22 y HLA-DRB1* para (AIJ) poliarticular y AR de instalación temprana.

Se determinaron las siguientes fases o pasos:

- 1. Selección preliminar de las moléculas MHC/HLA-DRB1 y PTPN22 consideradas importantes en el estudio, es decir las que se identificaron como los alelos, que se expresaron y que pudieron asociarse como posibles marcadores con cierto grado de susceptibilidad o protección de acuerdo a la significancia estadística $p < 0.05$. Las variables fueron escogidas según criterios del investigador.*
- 2. Análisis del comportamiento de las variables.*

Para esta fase se tomaron las moléculas de los dos sistemas genéticos (PTPN22 y HLA-DRB1*) que al momento de estimar el OR (probabilidad) mostraron cierto grado de asociación como posibles marcadores de susceptibilidad o protección. Esto ayudo a identificar los epitopes compartidos de HLA-DRB1* y polimorfismos moleculares del PTPN22 (c1858t) asociados sistemáticamente como:

- a) Polimorfismos del PTPN22 asociados a susceptibilidad o protección para (AIJ) poliarticular y AR de instalación Temprana.
- b) Alelos HLA-DRB1* asociados a susceptibilidad o protección para (AIJ) poliarticular y AR de instalación Temprana.

- c) Epitopes compartidos (SE) asociados a susceptibilidad o protección para (AIJ) poliarticular y AR de instalación Temprana

Esta clasificación demostró ser acertada al momento de contrastar la información con investigaciones previas del grupo de investigación de la Universidad del Norte de inmunología y biología molecular (Garavito y colaboradores) y con la literatura científica.

3. Detección de interacciones comunes.

Se realizó una búsqueda de posibles interacciones proponiendo una clasificación del epítipo compartido con un análisis estratificado y sistemático de estos (SE) (ver clasificación de (SE)).

4. Definición del modelo multivariado.

Para definir el modelo se tomaron como medidas de significancia estadística de acuerdo a la hipótesis de investigación planteada los cálculos de (R-cuadrado ajustado) (ANOVA).

- a) R-Cuadrado ajustado: este cálculo arroja en porcentaje la variabilidad de una muestra con respecto a otra que comparte ciertas características comunes. (AIJ) poliarticular y AR de instalación temprana.
- b) ANOVA: ayuda a realizar la comparación de medias entre dos o más poblaciones, la cual depende de tener previamente identificadas las variables independientes y la dependiente, tomando en consideración la hipótesis de la investigación.

5. Evaluación del modelo.

Se tomaron los valores de p ajustados de los respectivos cálculos anteriormente mencionados, obteniendo resultados de un método complejo de fácil interpretación en forma de tabla. El modelo mostro ser un recurso poderoso para la detección de posibles interacciones comunes para las respectivas medidas de asociación ajustadas y comunes para ambas patologías (AIJ) poliarticular y AR de instalación temprana, en relación a los polimorfismos de PTPN22 (C1858T), alelos HLA-DRB1.

Tabla 19. Análisis de regresión logística múltiple de los alelos MHC/HLA-DRB1 como alelos comunes asociados a susceptibilidad o protección para las dos entidades (AIJ) Poliarticular y (AR) de Instalación Temprana

Principales Efectos	Suma de Cuadrados	gl	Media de Cuadrados	F-Ratio	P-Valué	OR (P-Valué)
A: HLA-DRB1*0101	1,51725	1	1,61725	7.43	0.0087	0.337 (0.009)
B: HLA-DRB1*0404	0.57429	1	0.57429	2.64	0.1102	-0.198 (0.110)
C: HLA-DRB1*0405	0.87267	1	0.87267	4.01	0.0504	-0.244 (0.050)
D: HLA-DRB1*0408	0.179327	1	0.179327	0.82	0.3682	0,115 (0.368)
E: HLA-DRB1*0701	0.14148	1	0.14148	0.65	0.4237	-0.103 (0.424)
F: HLA-DRB1*1402	0.436475	1	0.436475	2.01	0,1626	-0.172 (0.163)
RESIDUAL	11.536	53	0.217661			

TOTAL (Corregido) 15.0 59 (*R-cuadrado (ajustado por grados de libertad)= 14,3866%*)

OR: Tomado del Coeficiente estandarizado de Beta

Fuente	ANOVA				
	Suma de Cuadrados	gl	Media de Cuadrados	F-Ratio	P-Valué
Modelo	3.46396	6	0.577326	2.65	0.0252
Residual	11.536	53	0.217661		
TOTAL (Corregido)	15.0	59			

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de los pacientes según las contribuciones dadas por todos los factores. Los valores de p de la prueba de la significación estadística de cada uno de los factores. Dado que el valor p es inferior a 0.05, este factor HLA-DRB1 tiene una estadística de efecto significativo para este grupo de pacientes con un nivel de confianza del 95% dentro del modelo estadístico. El R-cuadrado ajustado estadísticamente es el más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes,

es 14,3866% de la variabilidad de los pacientes. Dos (2) de los alelos presentados HLA-DRB1*0101, *0405; tienen valores de $p < 0.05$, los cuales muestran que estos alelos tienen un efecto estadísticamente significativo como posible alelos comunes en el grupo de pacientes con (AIJ) Poli articular y AR de Instalación Temprana con un nivel del 95%.

Tabla 20. Análisis de regresión logística univariado (ANOVA) del polimorfismo (C1958T) PTPN22 en (AIJ) Poli articular y AR de Instalación Temprana.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Media de Cuadrados	F-Ratio	P-Valué	OR (P-valúe)
<i>Modelo</i>	0.878	2	0.439	3.544	0.179	-0.240 (0.065)
<i>Residual</i>	14.122	57	0.248			
<i>TOTAL (Corregido)</i>	15	59				

R-cuadrado (ajustado por grados de libertad) = 2.5%

Puesto que el P-valor en la tabla ANOVA es mayor a 0.10 no hay una relación estadísticamente significativa entre PTPN22 en los pacientes con (AIJ) Poli articular y AR de Instalación Temprana con un nivel de confianza del 90%. El estadístico R-cuadrado indica un 2.5% de la variabilidad en PTPN22 la cual es muy débil como posible alelo común en (AIJ) Poli articular y AR de Instalación Temprana.

ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Media de Cuadrados	F-Ratio	P-Valué
<i>Entre los grupos</i>	0.81667	1	0.816667	3.54	0.0648
<i>Dentro de los grupos</i>	13.3667	58	0.23046		
<i>TOTAL (Corregido)</i>	14.1833	59			

El F-ratio para este caso es igual a 3,54364, es una relación entre los grupos se estiman dentro del grupo, como el valor de p de la prueba F es mayor o igual a 0.05, no hay un diferencia estadísticamente significativa entre la media de los pacientes para PTPN22 con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 21. Análisis de regresión logística entre los polimorfismos de los alelos MHC/HLA-DRB1 y (C1858T) PTPN22 asociados a susceptibilidad o protección para las dos entidades (AIJ) Poliarticular y (AR) de Instalación Temprana.

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Media de Cuadrados	F-Ratio	P-Valué	OR (P-valúe)
Principales Efectos						
A: PTPN22	0.800374	2	0.400187	1.90	0.1598	-0.228 (0.61)
B: HLA-DRB1*0101	1.8049	1	1.8049	8.57	0.0051	0.354 (0.05)
C: HLA-DRB1*0404	0.511806	1	0.511806	2.43	0,1251	-0.184 (0.128)
D: HLA-DRB1*0405	0.74465	1	0.74465	3.54	0,0657	-0.226 (0.064)
E: HLA-DRB1*0408	0.1500773	1	0.150773	0.72	0,4013	0.110 (0.381)
F: HLA-DRB1*0701	0.16764	1	0.16764	0.80	0.3764	-0.108 (0.387)
G: HLA-DRB1*1402	0.319086	1	0.319086	1.52	0,2239	-0.151(0.212)
RESIDUAL	10.7357	51	0.210503			
TOTAL (Corregido)	15.0	59				

(R-Cuadrado (ajustado por grados de libertad) = 18.4897%)

OR: Tomado del Coeficiente estandarizado de Beta

ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	gl	Media de Cuadrados	F-Ratio	P-Valué
<i>Modelo</i>	<i>4.22407</i>	<i>7</i>	<i>0.603438</i>	<i>2.91</i>	<i>0.0120</i>
<i>Residual</i>	<i>10.7759</i>	<i>52</i>	<i>0.207229</i>		
<i>TOTAL (Corregido)</i>	<i>15.0</i>	<i>59</i>			

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de los PACIENTES en las contribuciones del polimorfismo (C1858T) PTPN22 y los alelos HLA-DRB1* como factores independientes en el grupo de pacientes con (AIJ) Poli articular y AR de Instalación Temprana. Dado que las sumas de cuadrados han sido elegidas por defecto, la contribución de cada uno de los alelos es medida y eliminado los efectos de todos los demás factores

confusores. Se arrojan los valores de p con significancia estadística de cada uno de los polimorfismos (C1858T) PTPN22 y de los alelos HLA-DRB1* presentes en los dos grupos de pacientes. Puesto que el P-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,05 dentro del modelo estadístico, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables en el 95% nivel de confianza. El R-cuadrado ajustado estadísticamente es el más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes el cual arroja un 18,4897% de la variabilidad de los pacientes. Solamente un alelo HLA-DRB1* 0101 tiene un valor de p inferior a 0.05, como posible alelo común en las dos entidades (AIJ) Poliarticular y AR de Instalación Temprana con un nivel del 95 %.

Tabla 22. Resumen del análisis de regresión logística entre los polimorfismos y los alelos MHC: HLA-DRB1 y (C1858T) PTPN22 asociados a susceptibilidad o protección para las dos entidades (AIJ) Poliarticular y (AR) de Instalación Temprana.

	ANALISIS DE REGRESION MULTIVARIADO DE ALELOS HLA-DRB1*								
	ALELOS HLA-DRB1*	Suma de Cuadrados	gl	Media de Cuadrados	F-Ratio	P-Valué	Valor de p del Modelo	OR (P-valúe)	R-Cuadrado Ajustado (%)
(AIJ) Poliarticular y AR de Instalación Temprana	*0101	1,51725	1	1,61725	7,43	0,0087	0,0252	0.34 (0.009)	14,38660%
	*0405	0,87267	1	0.87267	4,01	0,0504		-0.24 (0.110)	
	ANALISIS MULTIVARIADO (C1858T) PTPN22 Y HLA-DRB1*								
	PTPN22 (C1858T)	0,800374	2	0,400187	1,9	0,1598	0.0120	-0.228 (0.61)	18,490%
HLA-DRB1*0101	1,8049	1	18,049	8,57	0,0051	0.354 (0.05)			
(AIJ) Poliarticular y AR de Instalación Temprana	ANALISIS BIVARIADO DE REGRESION LOGISTICA (C1858T) PTPN22								
	Entre los grupos	0,81667	2	0,878	3,544	0,0648	0,179	-0.24 (0.065)	2.5%
	Dentro de los grupos	13,3667	57	0,248					
	TOTAL (Corregido)	14,1833	59						

gl: Grados de libertad

Nótese en la tabla al correlacionar los alelos *MHC/HLA-Clase II: DRB1** con el grado de variabilidad para las dos entidades (AIJ) Poliarticular, (AR) de Instalación Temprana se encontró en un porcentaje del 14,3866% con un valor de $p=0,025$ con un nivel de confianza del 90% dentro del modelo estadístico. Al incluir al modelo de regresión logística el polimorfismo PTPN22 (C1858T), aumento cierto grado la variabilidad a un 18,5% con un valor de $p=0,012$ con un nivel de confianza del 95% dentro del modelo estadístico. El análisis univariado del polimorfismo de (C1858T) PTPN22 para pacientes con las dos entidades (AIJ) Poliarticular y AR de Instalación Temprana arrojó un valor de $p= 0.179$ por lo tanto PTPN22 no tiene un efecto estadísticamente significativo como

posible polimorfismo común para pacientes con (AIJ) poliarticular y AR de Instalación temprana con un 95% de nivel de confianza dentro del modelo estadístico.

20. DISCUSION.

Los resultados de las asociaciones en los dos sistemas genéticos: PTPN22 (C1858T) y MHC/HLA-Clase II: DRB1* en pacientes con Artritis de Instalación Temprana y Artritis Idiopática Juvenil Poliarticular, arrojaron resultados similares fueron muy controvertidos pero a la vez soportados por los diferentes estudios realizados a nivel mundial ⁽¹⁶⁻¹¹⁵⁾.

En relación con Artritis Reumatoide De Instalación Temprana de este grupo poblacional de pacientes al momento de asociar el polimorfismo del gen PTPN22 (C1858T) como un posible polimorfismo de susceptibilidad arrojó un (OR=16,09 [95% (1,73-375,2), p=0.0037]) para el polimorfismo (C/T) valores por encima de los reportados por otros estudios incluso realizados en población Colombiana ⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾. La asociación más robusta descrita para un gen no-MHC ha sido la variante R620W del gen PTPN22, replicada en un amplio número de poblaciones de origen caucásico. En población Colombiana (Medellín y Bucaramanga) no se observa que este polimorfismo confiriera riesgo de susceptibilidad para la artritis reumatoide (10). Los resultados de asociación con los alelos HLA-DRB1*0101, *0404, *0405, *0408, los cuales poseen el epítipo compartido en las posiciones 70-74 (SE) cuya secuencia aminoacídica es (QRRAA) mostraron un (OR=4,00 [95% (1,56-10,37), p=0.002]) congruente con los datos descritos por otros autores como posibles alelos de susceptibilidad ^(70,71,72,73). Con relación al alelo HLA-DRB1*0701 con (SE) (DRRGQ), se asoció como un alelo de protección a la enfermedad con un (OR=0.15 [95% (0.02-0.71), p=0.01]) para este mismo grupo de pacientes ⁽¹⁰⁾.

En el grupo de pacientes con Artritis Idiopática Juvenil Poliarticular al momento de asociar el alelo HLA-DRB1*0404 mostraron un OR=10.82 [95% (1,18-250.67), p=0.016]) mostrándose como un alelo de susceptibilidad congruentes los resultados con los informados por otros estudio ^(51,79-83).

Es claro la asociación que puede existir entre los alelos MHC/HLA-DRB1 con la presencia de (AIJ) Poliarticular y que los aminoácidos en las posiciones (70-74) de la región hipervariable del bolsillo 4 son sitios importante en la presentación del péptido a los receptores de los linfocitos T aloreactivos tipo CD4⁺ por ser altamente funcionales para el desarrollo de Enfermedades Autoinmunes como sitios moleculares determinantes de riesgo ⁽⁸²⁻⁸⁵⁾. Se encontró que el alelo HLA-DRB1*0701 cuyo (SE) es (DRRGQ) se comporto como un alelo de protección con un (OR=0.15 [95% (0.02-0.71; p=0.01)]) como lo referencian otros autores a nivel mundial ⁽¹⁰⁾. Se destaca que este alelo también se muestra en nuestros resultados como un alelo de protección para AR de instalación temprana.

Con el PTPN22 en este mismo grupo de pacientes no se encontró significancia estadística al momento de la asociación con un (OR=3,10 [95% (0.39-24,7), p=0.21]) con el polimorfismo (C/T). Estos resultados pueden interpretarse como ausencia de asociación por heterogeneidad genética dada la mezcla de la población o bien como riesgo de susceptibilidad muy bajo, que implicaría que posiblemente el estudio no alcanzó suficiente poder estadístico en razon a la n del estudiado ^(10, 86- 88).

Cuando se asoció el aminoácido (D) en la posición (70) del bolsillo 4 con la protección a la no presentación de la enfermedad en pacientes con (AIJ) Poliarticular se encontró un OR=0,49 con un valor de p<0,05, con el aminoácido (Q) con un OR=2,00 y un valor de p<0,05 como un aminoácido de susceptibilidad a desarrollar AIJ Poliarticular. En pacientes con AR de Instalación Temprana el aminoácido (D) un OR=0,22 con una p<0,05 y el aminoácido (Q) con un OR=3,71 con un valor de p<0,05 como un aminoácido de susceptibilidad al encontrarse en la posición (70) del bolsillo 4 de la región hipervariable de la cadena DRb1. El aminoácido (R) no se encontró asociado en pacientes con (AIJ) Poliarticular ni para susceptibilidad ni protección con un OR=2,96 y una p>0,05, sin embargo en pacientes con AR de Instalación temprana se encontró asociado con

susceptibilidad con un $OR=3,35$ y un valor de $p<0,05$, lo cual sugiere que los aminoácidos de la posición (70) del bolsillo 4 si confieren cierta potencial electrostático al acople del péptido debido tal vez al cambio conformacional que estos aminoácidos confieren (D), (Q) y (R) en la posición (70), donde el aminoácido (R) debido a tamaño y conformación molecular aumenta de alguna manera la afinidad del péptido con el bolsillo 4 dependiendo del aminoácido que lo precede ya sea (D) o (Q) o el mismo en la posición (70)⁽¹⁰⁾. Al momento de asociar las secuencias específicas del epítopo compartido en la posición (70) con el aminoácido (D) relacionado con (R) en cualquier posición entre (71-74) del bolsillo 4, no se encontró ningún tipo de asociación en pacientes con (AIJ) Poliarticular, este mismo fenómeno sucedió con el aminoácido (Q) en la posición (70) seguido del aminoácido (R) en cualquier posición entre la (71-74) del bolsillo 4. (Ver tabla 17). En los pacientes con AR de Instalación Temprana se encontró asociado la secuencia F_3 (DRR//) con un $OR=0,18$ y un valor de $p<0,05$ como secuencia protectora, la secuencia S_1 (Q/R//) como de susceptibilidad con un $OR=2,74$ y un valor de $p=0,0363$, al igual que la secuencia S_3 (QRR//) con un $OR=4,00$ y una $p=0,0021$ ⁽¹⁰⁶⁻¹¹⁷⁾ (Ver tabla 18).

La clasificación realizada y analizada para la presente investigación sugiere la necesidad de hallar nuevas formas de asociar las secuencia con subgrupos de pacientes con las secuencias específicas y posiciones aminoacidicas de acuerdo a las características de los aminoácidos posiblemente implicados ya que esta clasificación podría tener relevancia en el tratamiento y pronóstico de las enfermedades autoinmunes específicamente con la (AIJ) Poliarticular y (AR) de Instalación Temprana como ha sido ya demostrado por otros estudios.

Al momento de asociar las sumatorias de las secuencias implicadas al desarrollo o protección en las dos entidades se encontró que para (AIJ) Poliarticular como AR de Instalación Temprana los aminoácidos (D), (Q) y (R) en la posición 70 del

bolsillo 4 tienen un papel importante para el desarrollo o protección a la enfermedad de manera común pero con cierto grado de variabilidad (Ver tabla 19).

Al realizar la correlación entre el grupo de pacientes es decir entre (AIJ) Poliarticular y AR de Instalación Temprana para los alelos *MHC/HLA-Clase II: DRB1** en un porcentaje del 14,3866% con un valor de $p=0.0252$ con un nivel de confianza del 95%, sin embargo al incluir al modelo de regresión logística el polimorfismo (C1858T) PTPN22, aumento cierto grado la variabilidad a un 18,5% con un valor de $p=0,0120$ con un nivel de confianza del 90% ⁽¹⁰⁸⁻¹¹⁵⁾ (Ver tabla 22).

El grado de diferencia determinado por el cálculo de ajuste de Bonferroni presentado en cada uno de los análisis, puede ser debido al grado de variabilidad genética de la población estudiada, ya que estos son marcadores que pueden combinarse con diferentes modos de herencia y por lo tanto las estimaciones de riesgo pueden también ser diferentes o variar.

En la literatura hay una escasa información sobre la correlación existente entre estos dos sistemas genéticos como posibles genes comunes para la presentación y pronóstico de (AIJ) Poliarticular y AR de Instalación Temprana ⁽¹¹²⁻¹¹⁵⁾. Refinar el estudio a un análisis de ligamiento familiar para PTPN22 y HLA-DRB1* para esta población de Colombianos en padres con hijos afectados por las dos entidades ya que una sola relación específica del PTPN22 podría explicar el desarrollo o pronóstico de la enfermedad sobre todo (AIJ) Poliarticular ⁽¹¹⁵⁾.

En la escogencia de los pacientes pudieron haber existido errores en la escogencia de los pacientes ya que en la práctica clínica no siempre es posible establecer un fenotipo certero aunque se sigan rigurosamente por el clínico ⁽¹¹⁹⁾.

En cuanto al tamaño de la muestra fue motivo de modelización constante durante el desarrollo de la presente investigación donde se realizó una aproximación común al cálculo del tamaño muestral teniendo en cuenta la experiencia del grupo

e investigación y al tamaño escogido en el macro proyecto apoyado por Colciencias ya que la presente investigación se puede determinar cómo un estudio piloto, esto nos ayudo a inferir la frecuencia alelica y genotípica en nuestra población. Se considero dentro del estudio una tasa previsible de errores en los experimentos de genotipificación que compensara en un momento un mayor tamaño de la población para no ver disminuido nuestro poder estadístico. Consideramos para el presente estudio que los resultados son comparables con otros desarrollados a nivel mundial ya que aunque debido a la mezcla poblacional ni por razones genéticas ni ambientales los resultados se pueden determinar como espurios debido a la consolidación de los resultados. Se debe anotar que un análisis de un solo polimorfismo (C1858T) PTPN22 en ambas patologías puede llevar a asociaciones espurias, porque la variante puede encontrarse en desequilibrio de ligamiento con otra u otras variantes, constituyendo un haplotipo característico como puede estar sucediendo con los resultados encontrados en pacientes con (AIJ) Poliarticular ⁽¹¹⁹⁾.

19. CONCLUSION

Son muchos los sistemas genéticos implicados en la susceptibilidad o protección en Artritis Reumatoide (AR) de Instalación Temprana y Artritis Idiopática Juvenil (AIJ) Poliarticular, y a la vez comunes para ambas entidades, los resultados del presente estudio, confirman de alguna manera la influencia de los dos sistemas genéticos y polimorfismos moleculares de PTPN22 (C1858T) y HLA-DRB1* en la autoinmunidad de las entidades mencionadas e indican que los fenotipos autoinmunes podrían representar resultados pleiotrópicos de estos genes lo cual a la luz de los conocimientos actuales no se han podido determinar cómo sistemas genéticos específicos y comunes en Artritis Idiopática Juvenil Poliarticular y Artritis Adulta de Instalación Temprana, enfermedades que se piensa tienen una base de mecanismos inmunogenéticos similares por lo cual fue la hipótesis del presente trabajo.

Los sistemas genéticos como el MHC-Clase-II; codifica para genes localizados en el cromosoma 6p21 y el PTPN22 codifica para una fosfatasa linfoide de la tirosina (LYP) en el cromosoma 1q33. Estos sistemas posiblemente comunes en Artritis Reumatoide de Instalación Temprana y Artritis Idiopática Juvenil Poliarticular son moléculas que participan en mecanismos cruciales en la cascada inmune, y a la vez están implicados en la activación de linfocitos T CD4+, aunque los mecanismos reguladores no son totalmente comprendidos. Los epitopes compartidos (SE+) de los genes (MHC/HLA-Clase II: DRB1*) y el polimorfismo del (C1858T) PTPN22, podrían considerarse como posibles genes comunes, pero debido a la mezcla de la población del Caribe Colombiano los datos no son totalmente concluyentes, sobre todo para (AIJ) Poliarticular, considerando que es la menos estudiada a nivel mundial y cuyo diagnóstico diferencial con los otros subtipos (AIJ) u otras enfermedades autoinmunes es aun en día confuso. Los sistemas genéticos estudiados (HLA-Clase II: DRB1*, PTPN22), actúan como reguladores positivos y negativos en la activación de linfocitos T autoreactivos

CD4+, llevando al desarrollo de fenotipos autoinmunes. Al momento de asociar los sistemas genéticos (HLA-Clase II DRB1* Vs PTPN22), no se encontró asociación significativa en el análisis multivariado pero pudo ser a la n escogida para el presente estudio.

Las secuencias compartidas de HLA-DRB1* son las que tienen una mayor importancia en la posible presentación fenotípica en las dos patologías (Artritis Adulta De Instalación Temprana y Artritis Idiopática Juvenil Poliarticular) lo cual fue concluyente al momento de proponer la clasificación surgida de la necesidad de observar el posible rol de los aminoácidos (D) y (Q) en la posición 70 del bolsillo del exón 4 del epítipo compartido y el posible papel que pudiese estar cumpliendo el aminoácido (R) en el cambio conformacional del epítipo al momento de reconocer el antígeno. La naturaleza crónica de ambas patologías, las cuales podrían tener mecanismos moleculares comunes demuestra que en la clínica las terapias de tratamiento aplicadas son muy similares y con resultados muy concordantes entre ambas, como para llegar a concluir que la (AIJ) es una forma de Artritis del Adulto en el infante.

A pesar de que (AR) de Instalación Temprana y (AIJ) Poliarticular, se expresan ambas por la aparición de un proceso inflamatorio articular crónico, a priori se podría decir que no son tan diferentes, pero en otras formas de (AIJ) como la oligoarticular o sistémica, estos dos sistemas genéticos podrían llegar actuar de manera diferente, ya que desde el acercamiento del clínico hacia la (AIJ), cuando ha tratado la AR del Adulto, éste tiene la necesidad de adquirir cierto grado de aprendizaje y un esfuerzo mental para la comprensión de la aparición de la (AIJ) en general donde la diferencia no radica solamente en la presentación clínica de las entidades, sino también en aspectos importantes de la patogénesis, aunque a un nivel molecular compartan ciertos sistemas como los presentados en el presente estudio.

Genéticamente ambos grupos de enfermedades (AR) de Instalación Temprana y (AIJ) Poliarticular, se podría decir tienen un factor común de protección asociado por el alelo HLA-Clase II: DRB1*0701. El análisis de la secuencia de los aminoácidos entre las posiciones 70-74 muestra que en ambas entidades existen secuencias que se comparten como marcadores de protección o susceptibilidad. Por otra parte, la posición del aminoácido (R), en la secuencia 70-74 podría tener un papel importante para el desarrollo o protección en ambas entidades. Se podría inferir a través de los resultados, que los marcadores genéticos y moleculares desempeñan un papel en la amplificación de la respuesta inflamatoria conllevando a un desequilibrio en las moléculas pro inflamatorias en la (AR) del Adulto y en la (AIJ) Poliarticular, donde el papel de las citocinas e interleucinas es similar en ambas patologías, es decir las secuencias del (SE+) (QKRRA), (QRRAA) y (QRRAE), dada su conformación molecular en el espacio, determinarían de alguna manera la presentación del antígeno a los receptores de los linfocitos T autoreactivos, y podrían generar perfiles de citocinas en la cascada inflamatoria similares.

El HLA-DRB1*04 y sus subtipos alélicos están mayormente asociados con (AR) del Adulto de Instalación Temprana. Los pacientes que sufren (AIJ) Poliarticular debido a la menor prevalencia de este subgrupo clínico y los pocos estudios realizados a nivel mundial y sumado al número pequeño de nuestra población analizada, nos lleva a no poder dar una conclusión veraz y comparable con la Artritis del Adulto de Instalación Temprana en decir que los dos sistemas genéticos (HLA-Clase II DRB1* y PTPN22) tienen mecanismos comunes o similares para ambas patologías ya que en las dos entidades se produce una amplificación de la respuesta inflamatoria, que se perpetúa en el tiempo, esta amplificación podría estar determinada por los sistemas genéticos (HLA-Clase II DRB1* y PTPN22 (C1858T) con posibles papeles similares pero no idénticos en la (AR) de Instalación Temprana y en pacientes con (AIJ) en sus diferentes subtipos clínicos. Clínicamente se sabe que la (AR) del Adulto responde bien a los

tratamientos con agentes Anti-TNF alfa, solos o en asociación con metotrexate (MTX), la (AIJ) Poliarticular responde de manera muy similar. Se concluye que (AR) de Instalación Temprana y (AIJ) Poliarticular, parecen tener características genéticas similares o comunes pero se tendrían que desarrollar estudios de cohortes con una mayor población para llegar a comprobar que la (AIJ) Poliarticular es una forma infantil de (AR) del Adulto de Instalación Temprana.

22. BIBLIOGRAFÍA.

1. Guibert Toledano Marlana, Reyes Llerena Gil A. Artritis Reumatoide Temprana. Reto Y Enfoque En El Nuevo Siglo. Rev. Cubana De Reumatología, 2005. Vol. 7, Págs. 7-8.
2. Baranzini, Sergio E. The Genetics Of Autoimmune Disease: A Networked Perspective. Immunology, 2009. Vol. 21, Págs. 596-605.
3. Virginia Torres Lima, Ana Maria Torres Lima, Maria Victoria Hernandez Cuellar Y Roberto Amaro Relova. Inmunopatogenia De La Artritis Reumatoide. Conceptos Actuales. Rev. Cubana Med Gen Integr.1998, Vol. 14, Págs. 429-433.
4. Anaya J, Gomez L, John Castiblanco. Is There A Common Genetic Basis For Autoimmune Diseases? .Clinical And Developmental Immunology, 2006. Págs. 185-195.
5. Oliver Brand, Stephen Gough And Joanne Heward.HLA, CTLA-4 And PTPN22: Shared Genetic Master-Key To Autoimmunity? Cambridge University Press. 2005. 23, Vol. 7, Págs. 23-34.
6. Kallberg, H.Padyukov, L. Plenge, R. M. Ronnelid, J. Y Gregersen, Et Al. Gene-Gene And Gene Environment Interactions Involvig Hla-Drb1, Ptpn22 And Smoking In Two Subsets Of Rheumatoid Arthritis. Am. J. Hum. Genet. 2007, Vol. 80, Págs. 867-875.
7. Castiblanco J, Anaya J. The Nature And Nurture Of Common Autoimmunity. 1109, Ann. N. Y. Acad. 2007, Págs. 1-8.
8. E. Martín Alcalde, S. Cantero Blanco, F. J. Sánchez García. Nuevas Perspectivas En El Tratamiento De La Artritis Reumatoide. Farm Hosp (Madrid) 2003. Vol. 27. N.º 6, Pp. 360-370.

9. Alan J Silman And Jacqueline E Pearson. Epidemiology And Genetics Of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Res* 2002, 4 (Suppl 3):S265-S272.
10. Delgado A, Martín J, Granados J, Anaya J. Epidemiología Genética De La Artritis Reumatoide: ¿Qué Esperar De América Latina?. *Biomedica* 2006. Pag. 562-584.
11. Páez M, Gómez L, Mv, Anaya J. Implicaciones Funcionales De Los Linfocitos B En El Desarrollo De La Artritis Reumatoide. *Med Unab*. 2006. Vol. 9 Número 1. Pag 34-44.
12. Audrey H. Lynn, "C. Kent Kwok, Colleen M. Venglish, Christopher E. Aston, And Aravinda Chakravarti. Genetic Epidemiology Of Rheumatoid Arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* 1995. 57:150-159.
13. Beverley Wilkinson, Jocelyn S. Downey And Christopher E. Rudd. T-Cell Signaling And Immune System Disorders. Cambridge University Press. 2005. Vol. 7. Issue 20-29.
14. Mustelin T. Are Other Protein Tyrosine Phosphatases Than PTPN22 associated with autoimmunity? *Seminars in Immunology*. (2006). Pp:254–260.
15. Peter K. Gregersen A, Hye-Soon Lee A, Franak Batliwalla A, Ann B. Begovich. PTPN22: Setting Thresholds For Autoimmunity. *Seminars In Immunology*. (2006). Issue: 8. Pp:214–223.
16. Xiao Yu, Jin-Peng Sun, Yantao He, Xiaoling Guo, Sijiu Liu, Bo Zhou, Andy Hudmon, And Zhong-Yin Zhang. Structure, Inhibitor, And Regulatory Mechanism Of Lyp A Lymphoid-Specific Tyrosine Phosphatase Implicated In Autoimmune Diseases. *PNAS*. 2007. Pp:104. 197.

17. Escuela Andaluza De Salud Pública. Glucosamida En Artrosis: ¿Previene La Progresión De La Enfermedad?. Boletín Terapéutico Andaluz (Bta) 2002. Vol: 18. Issue: 5. Pp:17-18.
18. Edyta Majorczyk, Monika Jasek¹, Rafał Płoski, Marta Wagner, Et Al. Association Of PTPN22 Single Nucleotide Polymorphism With Rheumatoid Arthritis But Not With Allergic Asthma. European Journal Of Human Genetics (2007). Issue:15. Pp:1043–1048.
19. Gonzales M. Grara J. Galdo F. Atanez A. Artritis Reumatoide. Guías Clínicas. 2004, Vol.4. Issue: 39.
20. Anaya J. Genes y Artritis Reumatoidea. Revista De Reumatología. [Http://www.encolombia.com/reumatologia6399genes.htm](http://www.encolombia.com/reumatologia6399genes.htm). [En línea] [Citado el: 13 de 02 de 2008.]
21. Artritis En La Mujer, Cómo Tratarla. [Http://Blogellas.Com/Artritis-En-La-Mujer-Como-Tratarla/](http://Blogellas.Com/Artritis-En-La-Mujer-Como-Tratarla/). [En Línea] [Citado El: 23 De 04 De 2010.]
22. O. Kaipiainen-Seppanen And A. Savolainen. Changes In The Incidence Of Juvenile Rheumatoid Arthritis In Finland. Rheumatology. 2001. Vol. 40. Pp.928-932
23. Fisiopatología De La Artritis Reumatoide.
<http://tratamientoy fisiologiade artritis y artrosis.wordpress.com/2010/02/01/fisiopatologia-de-la-artritis-reumatoide/>. [En línea] [Citado el: 03 de 01 de 2009.]
24. Soledad M. Artritis Reumatoide Fisiología Y Tratamiento. <http://www.slideshare.net/rocartoom7/artritis-reumatoide-1665704>. [En línea] [Citado el: 12 de 06 de 2008.]

25. Guerrero R, Echeverri E, Rueda J, González H. Moléculas Coestimuladoras Y Artritis Reumatoide. Revista Colombiana De Reumatología. 2005. Vol. 12 No. 1. Pp. 44-52.
26. Balandraud N, Roudier J And Roudier Ch. Epstein–Barr Virus And Rheumatoid Arthritis. Autoimmunity Reviews. 2004. Vol 3, Issue 5, Pp: 362-367.
27. H.M. Long, T. A. Haigh, N. H. Gudgeon, A. M. Leen, C.-W. Tsang, J. Brooks, E. Landais, E. Houssaint, S. P. Lee, A. B. Rickinson, and G. S. Taylor. CD4⁺ T-Cell Responses to Epstein-Barr Virus (EBV) Latent-Cycle Antigens and the Recognition of EBV-Transformed Lymphoblastoid Cell Lines. Journal of Virology. 2005, Vol. 79, No. 8. Pp. 4896-4907.
28. Mark J Sholomchik. Activating Systemic Autoimmunity: B´S, T´S, And Tolls. Inmmulogy. 2009. Vol. 21. Pp:626-633.
29. Iglesias A, Panqueva U. Toro C. Mejía J. Rondón F. Restrepo J. Ramírez L. Enfermedad De Still: Una Perspectiva Histórica Y Una Revisión Actual. Revista Colombiana De Reumatología. 2008. Vol. 15 No. 3. Pp. 197-206.
30. Poveda B. Metaloproteinasas De La Matriz Extracelular. <http://europa.sim.ucm.es/compludoc/AA?articuloid=743503&donde=castellano&zfr=0>. [En línea] [Citado el: 23 de 06 de 2009.]
31. K. Ikari, S. Momohara, E. Inoue, T. Tomatsu, M. Hara, H. Yamanaka And N. Kamatani. Haplotype Analysis Revealed No Association Between The PTPN22 Gene And Ra In A Japanese Population. Rheumatology 2006. Issue: 45. Pp:1345–1348.
32. Shih-Chia Liu, Tzu-Yang Chang, Yann-Jinn Lee, Chen-Chung Chu, Marie Lin, Zong-Xian Chen, Hsin-Fu Liu, Ching-Wen Dang, Shih-Chuan Chang, Chyou-Shen Lee, Tien-Ling Chen, And Chun-Hsiung Huang. Influence Of

HLA-DRB1 Genes And The Shared Epitope On Genetic. The Journal of Rheumatology. 2007. Vol. 34. Issue. 4. Pp:674-680.

33. Barton A, A. Myerscough, S John, M. Gonzalez-Gay, W. Ollier And J. Worthington. A single Nucleotide Polymorphism In Exon 1 Of Cytotoxic T Lymphocyte Associated-4 (CTLA-4) Is Not Associated With Rheumatoid Arthritis. Rheumatology. 2000. Issue:39. Pp:63-66.
34. Anne Hinks, Steve Eyre, Xiayi Ke, Anne Barton, Paul Martin. Overlap Of Disease Susceptibility Loci For Rheumatoid Arthritis And Juvenile Idiopathic Arthritis. Ann Rheum Dis 2010;69:1049–1053. doi:10.1136/ard.2009.110650
35. Pierer M, Kaltenhäuser S, Arnold S, Wahle M, Baerwald S, Häntzschel H and Wagner U. Association Of PTPN22 (1858) Single-Nucleotide Polymorphism With Rheumatoid Arthritis In A German Cohort: Higher Frequency Of The Risk Allele In Male Compared To Female Patients. Arthritis Research & Therapy 2006, Issue:8. Pp:1186-1945.
36. Soumya Raychaudhuri. Recent Advances In The Genetics Of Rheumatoid Arthritis. Current Opinion in Rheumatology. 2010 - Volume 22 - Issue 2 - p 109–118.
37. Mf Seldin, R Shigeta, et al. Finnish Case–Control And Family Studies Support PTPN22 R620W Polymorphism As A Risk Factor In Rheumatoid Arthritis, But Suggest Only Minimal Or No Effect In Juvenile Idiopathic Arthritis. Genes and immunity. 2005. Issue:6. Pp: 720–722.
38. Myasoedova E, Davis J, Crowson C and Gabriel S. Epidemiology of Rheumatoid Arthritis: Rheumatoid Arthritis and Mortality. Current rheumatology. 2010. Vol 12. Issue 5.

39. Sherine E. Gabriel. The Epidemiology Of Rheumatoid Arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2001. Volume 27, Issue 2, , Pages 269-281
40. Gregersen, P. K, Silver, J. y Winchester, R. J. The Shared Epitope Hypothesis: An Approach To Understanding The Molecular Genetics. *Arthritis and Rheumatism*. 1987. Vol. 30, No. 11. Pp:1205-1213
41. Pierre Antoine Gourrau, Philippe Dieudé, Et.al. A New Classification Of HLA-DRB1 Alleles Differentiates Predisposing And Protective Alleles For Autoantibody Production In Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2007. Vol. 9. Pp:1-8.
42. Begovich, A. B., Carlton, V. E. H. y Honigberg, L. A, And 16 Others. A Missense Single-Nucleotide Polymorphism In A Gene Encoding A Protein Tyrosine Phosphatase (PTPN22) Is Associated With Rheumatoid Arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* 2004. Issue: 75: Pp:330-338.
43. Carlton, V. E. H., Hu, X. y Chokkalingam, A. et al. PTPN22 Genetic Variation: Evidence For Multiple Variants Associated With Rheumatoid Arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* 2005. Vol:77. Pp: 567-581.
44. S. Eyre. Examining The Overlap Between Genome-Wide Rare Variant Association Signals And Linkage Peaks In Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2011 Volume 63, Issue 6, pages 1522–1526.
45. Garavito G, Iglesias A, Egea E, Jaraquemada D, Martínez P, et al. Una Aproximación Al Significado Biológico Del Polimorfismo Del Complejo Mayor De Histocompatibilidad. *El Modelo De La Asociación HLA y ARJ. Uninorte* 2007. No.16. p.53-72.
46. Wan R. Wan Taib, Deborah J. Smyth, Marilyn E. Merriman. The PTPN22 Locus and Rheumatoid Arthritis: No Evidence for an Effect on Risk Independent of Arg620Trp. *PLoS ONE*. 2010. Vol 5. Issue 10. e13544

47. G Garavito, C Malagón, LA Ramírez, OF De La Cruz, E Egea. Polimorfismo De Los Alelos De Los Antígenos De Leucocitos Humanos HLA-DRB1 Y Su Asociación Con La Artritis Reumatoidea Juvenil En Una Muestra De Niños MESTIZOS Colombianos. *Biomédica (Bogotá)*;23(3):254-262
48. American College Of Rheumatology. <http://www.rheumatology.org/> [en línea] [citado: 22/11/2009]
49. Simon H.S. Pearce And Tony R. Merriman. Genetic Progress Towards The Molecular Basis Of Autoimmunity. Elsevier. *Trends In Molecular Medicine*. 2006. Vol.12. Issue 37.
50. Ivana Durinovic-Belló and Gerald T. Nepom. Characterizing T-Cell Autoimmunity. *Contemporary Endocrinology*, 2011, Part 1, 53-68, DOI: 10.1007/978-1-60327-478-4_4
51. Garavito G. Asociación HLA Y Artritis Reumatoide Juvenil. En Busca De Las Bases Moleculares Dependiente Del MHC. Tesis Doctoral. Universidad autonoma de barcelona. http://www.tdx.cbuc.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-1025104-170319/ [En línea] [Citado el: 12 de 12 de 2009.]
52. Carole A. Sargent, Ian Dunham, John Trowsdalet, and R. Duncan Campbel. Human Major Histocompatibility Complex Contains Genes For The Major Heat Shock Protein HSP70. *Immunology* 1989. Vol. 86, Pp. 1968-1972.
53. Reinaldo R. Acosta Hernández; Concepción Castell Pérez; María Julia Hernández Duarte; Abel Pernas González. Morbidity And Mortality Present In A Group Of Cuban Patients Presenting With Rheumatoid Arthritis. *Rev cubana med [online]*. 2009, vol.48, n.2, pp. 1-12.
54. Pérez M. Procesamiento Y Presentación De Antígeno Por Moléculas MHC Clase I Y Clase II. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2006; 44 (Supl 2): 7-10.

55. Thomson W, Barrett J. H, Donn R, Pepper L., Kennedy L. J, W. E. R. Ollier, Silman A, Woo P and Southwood T. Juvenile Idiopathic Arthritis Classified By The ILAR Criteria: HLA Associations In UK Patients. *Rheumatology*. 2002. Vol 41: Pp:1183–1189.
56. Takashi Shiina, Kazuyoshi Hosomichi, Hidetoshi Inoko And Jerzy K Kulski. The HLA Genomic Loci Map: Expression, Interaction, Diversity And Disease. *Journal of Human Genetics* (2009) 54, 15–39.
57. Anura Hewagamaa and Bruce Richardson. The Genetics And Epigenetics Of Autoimmune Diseases. *Journal of Autoimmunity*. 2009. Volume 33, Issue 1, Pages 3-11
58. Michelle L, Hermiston, Zheng Xu, Ravindra Majeti, And Arthur Weiss J. Reciprocal Regulation Of Lymphocyte Activation By Tyrosine Kinases And Phosphatases. *Clin. Invest.* 2002. Vol:109. Pp: 9-14.
59. James A. Traherne, Roger Horton, Anne N. Et al. Genetic Analysis Of Completely Sequenced Disease Associated MHC Haplotypes Identifies Shuffling Of Segments In Recent Human History. *Plos Genet.* January. 2006. Volume 2. Issue: 1 Pp:81-92.
60. Lm Gomez, J-M Anaya, Ci Gonzalez, R Pineda-Tamayo, W Otero, A Arango And J Martin. PTPN22 C1858T Polymorphism In Colombian Patients With Autoimmune Diseases. *Genes And Immunity*. 2005. Vol. 6 Pp:628–631.
61. Carin C. Stamper, Yan Zhang, James F. Tobin, David V. Erbe, Shinji Ikemizu, Simon J. Davis, Mark L. Stahl, Jasbir Seehra, William S. Somers And Lidia Mosyak. Crystal Structure Of The B7-1/CTLA-4 Complex That Inhibits Human Immune Responses. *Nature* 2001. Vol. 410. Pp: 608-611.
62. Genbank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> [En línea] [Citado el: 12 de 12 de 2010.]

63. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Et Al. Immunologic Self-Tolerance Maintained By CD25+CD4+ Naturally Anergic And Supressive T Cells Induction Of Autoimmune By Breaking Their Anergic/Supressive State. *Int Immunol* 1998. Vol. 10. Pp:1969-1980.
64. Ann B. Begovich, Victoria E.H. Carlton, Lee A. Honigberg, Steven J. Schrodi, Anand P. Chokkalingam, Heather C. Alexander, Kristin G. Ardlie, Qiqing Huangnda B, Peter K. Gregersen, Et al. A Missense Single-Nucleotide Polymorphism in a Gene Encoding a Protein Tyrosine Phosphatase (PTPN22) Is Associated with Rheumatoid Arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* 2004. Vol. 75. Pp:330–337
65. Andrade L. Future perspective for diagnosis in autoimmune diseases. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences.* 2009. Vol. 81. Issue: 3. Pp: 367-380.
66. Blanca Rueda, Gisela Orozco, Elena Sánchez, Javier Oliver y Javier Martín. Factores Genéticos Comunes En Autoinmunidad. *Reumatol Clin.* 2008. Vol. 1. Pag: 1-4
67. E W Karlson, L B Chibnik, J Cui, et al. Associations Between Human Leukocyte Rheumatoid Arthritis Phenotypes Of Autoantibody Status, Age At Diagnosis And Erosions In A Large Cohort Study. *Ann Rheum Dis.* 2008 Vol. 67. Pp: 358-363.
68. Tulio C. Lins, Rodrigo G. Vieira, Dario Grattapaglia and Rinaldo W. Pereira. Allele And Haplotype Frequency Distribution In PTPN22 Gene Across Variable Ethnic Groups: Implications For Genetic Association Studies For Autoimmune Diseases. *Autoimmunity.* 2010, Vol. 43, No. 4 : Pages 308-316
69. E W Karlson, Et Al. Associations Between Human Leukocyte Antigen, PTPN22, CTLA-4 Genotypes And Rheumatoid Arthritis Phenotypes Of

Autoantibody Status, Age At Diagnosis And Erosions In A Large Cohort Study. *Ann Rheum Dis.* 2008. Vol. 67. Pp:358–363.

70. James A. Traherne, Roger Horton, Et al. Genetic Analysis Of Completely Sequenced Disease-Associated MHC Haplotypes Identifies Shuffling Of Segments In Recent Human History. *PLoS Genet.* January. 2006. Vol 2. Pp: 1-9.
71. Shih-Chia Liu, Tzu-Yang Chang, Yann-Jinn Lee, et al. HLA-DRB1 Alleles Encoding The “Shared Epitope” Are Associated With Susceptibility To Developing Rheumatoid Arthritis Whereas HLA-DRB1 Alleles Encoding An Aspartic Acid At Position 70 Of The B-Chain Are Protective In Mexican Mestizos. *The Journal of Rheumatology* 2007. Vol. 34. Issue: 4. Pp: 34-44.
72. Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, Purcell S, Lee AT, Karlson EW, Et al. Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in > 4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am J Hum Genet.* 2005. Vol. 77. Pp:1044-1060.
73. Nihal A Fathi, Azza M Ezz Eldin, Eman Mosad, Et al. Diagnostic Performance And Predictive Value Of Rheumatoid Factor, Anti-Cyclic-Citrullinated Peptide Antibodies And HLA-DRB1 Locus Genes In Rheumatoid Arthritis. *International Archives of Medicine.* 2008. Pp. 1-9.
74. Madeleine Singwe-Ngandeu, Axel Finckh, Sylvette Bas, Jean-Marie Tiercy, Cem Gabay. Diagnostic Value Of Anti-Cyclic Citrullinated Peptides And Association With HLA-DRB1 Shared Epitope Alleles In African Rheumatoid Arthritis Patients. *Arthritis Research & Therapy* 2010, 12:R36.
75. Tianfu Wu, Deena Sajitharan & Chandra Mohan. Biomarkers Of Rheumatoid Arthritis: Recent Progress. *Informahealthcare.* 2010, Vol. 4, No. 4 , Pages 293- 305.

76. Gonzalez Escribano MF, Rodriguez R, Valenzuela A et al. CTLA4 polymorphisms In Spanish Patients With Rheumatoid Arthritis. *Tissue Antigens*. 1999. Vol. 53. Pp: 296-300.
77. Barton A, Myerscough A, John S, Gonzalez-Gay M, Ollier W, and Worthington J. A Single Nucleotide Polymorphism In Exon 1 Of Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated-4 (CTLA-4) Is Not Associated With Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2000. Vol. 39. Pp:63-66.
78. Ann W Morgan, James Robinson, Philip G Conaghan, Stephen G Martin, Elizabeth MA Hensor, Et Al. Research Article Evaluation F The Rheumatoid Arthritis Susceptibility Loci HLA-DRB1, PTPN22, OLIG3/TNFAIP3, STAT4 And TRAF1/C5 In An Inception cohort. *Arthritis Research & Therapy*. 2010. Vol. 12. Pp:1-10.
79. Gloria Garavito, Antonio Iglesias, Eduardo Egea, Dolores Jaraquemada, Paz Martínez, Eduardo Enrique Egea. Una Aproximación Al Significado Biológico Del Polimorfismo Del Complejo Mayor De Histocompatibilidad. El Modelo De La Asociación HLA Y ARJ. *Rev. Salud Uninorte*. 2002. Vol. 16. Pp: 53-72.
80. C.O. Jonnson, M. Hedman, M. Karlsson Faresjö, Et al. The association of CTLA-4 and HLA class II Autoimmune Risk Genotype With Regulatory T Cell Marker Expression In 5 -Year-Old Children. *Clinical and Experimental Immunology*, 2006. Vol. 145. Pp:48-55.
81. Gloria Garavito, Clara Malagon, Luís Antonio Ramirez, Oscar De La Cruz, Eduardo Egea, Oscar Uribe, Antonio Iglesias, Paz Martínez, Dolores Jaraquemada. Polimorfismo De Los Alelos De Los Antígenos De Leucocitos Humanos HLA-DRB1 Y Su Asociación Con La Artritis Reumatoide Juvenil En Una Muestra De Niños Mestizos Colombianos. *Biomedica*. 2003. Vol. 23. Pp:254-62.

82. Bianca Milterski, Susanne Drynda, Gundula Boschow, Wolfram Klein, Joachim Oppermann, Jorn Kekow and Jorg Thomas Eppelen. Complex Genetic Predisposition in Adult and Juvenile Rheumatoid Arthritis. *BMC Genetics* 2004, Vol. 5. Issue:2. Pp: 1-14
83. Glenys Thomson, Nishanth Marthandan, Richard M. Single, Et al. Sequence Feature Variant Type (SFVT) Analysis Of The HLA Genetic Association In Juvenile Idiopathic Arthritis. *Rev Biocomputing*. 2010. Pp: 359-370.
84. So-Young Bang, Kyoung-Ho Lee, Soo-Kyung Cho, Hye-Soon Lee, Kyung Wha Lee, Sang-Cheol Bae. Smoking Increases Rheumatoid Arthritis Susceptibility In Individuals Carrying The HLA-DRB1 Shared Epitope, Regardless Of Rheumatoid Factor Or Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody Status. *Arthritis & Rheumatism*. 2010. Vol 62. Issue 2; Pp 369 – 377.
85. Klareskog L, et al. A New Model For An Etiology Of Rheumatoid Arthritis: Smoking May Trigger HLA-DR (Shared Epitope)-Restricted Immune Reactions To Autoantigens Modified By Citrullination. *Arthritis Rheum*. 2006. Vol.54. Pp:38-46.
86. Lae" titia Michou, Sandra Lasbleiz, Anne-Christine Rat, Paola Migliorini, Et al. Linkage Proof For PTPN22, A Rheumatoid Arthritis Susceptibility Gene And A Human Autoimmunity Gene. *PNAS*. 2007. vol. 104. Pp: 1649-1654.
87. P. Harrison, J. J. Pointon, C. Farrar, M. A. Brown and B. P. Wordsworth. Effects Of PTPN22 C1858T Polymorphism On Susceptibility And Clinical Characteristics Of British Caucasian Rheumatoid Arthritis Patients. *Rheumatology*. 2006. Vol. 45. Pp: 1009–1011.
88. ME. Ramírez, G. Quintana, JE. Caminos, MF. Garcés, LA. Cepeda, P. Coral, F. Rondón, J.F. Restrepo, J.M. Romero, J. Martin, A. Iglesias.

Asociación Entre Manifestaciones Clínicas De Enfermedades Autoinmunes Con Los Polimorfismos De PTPN22, STAT4, CTLA-4 En Una Población Colombiana. Resúmenes Reumatología Adultos. 2009. Vol. 16 No. 2.

89. Gisela Orozco, Behrooz Z. Alizadeh, Ange´lica M. Delgado Vega, Miguel A. Gonzalez, Et al. Association Of STAT4 With Rheumatoid Arthritis A Replication Study In Three European Populations. *Arthritis & Rheumatism* 2008. Vol. 58. Issue. 7. Pp: 1974-1980.
90. Blanca Rueda, Gisela Orozco, Elena Sánchez, Javier Oliver. Factores Genéticos Comunes En Autoinmunidad. *Reumatol Clin.* 2008;4. Supl 1:1-4.
91. Cordell HJ, Clayton DG. Genetic Association Studies. *Lancet.* 2005; 366:1121-1131.
92. Mirentxu I. Iruretagoyena B, Sergio H. Iacobelli G. Células Dendríticas Como Determinantes Del Equilibrio Entre Inmunidad Y Autoinmunidad. *Reumatología* 2005; 21(2):58-64.
93. Peter C. Taylor, Puja Mehta, Thomas Tull. A. Etiopathology Of Rheumatoid Arthritis. *Rev Medicine.* 2010. Volume 38, Issue 4, Pages 163-166.
94. Susan D. Thompson, Michael G. Barnes, Thomas A. Griffin, Alexei A. Grom, David N. Glass. Heterogeneity In Juvenile Idiopathic Arthritis: Impact Of Molecular Profiling Based On DNA Polymorphism And Gene Expression Patterns. *Arthritis & Rheumatism.* 2010. Vol. 62. Issue 9. Pp: 2611–2615.
95. Gloria Garavito, Edmond J. Yunis, Eduardo Egea, Luis A. Ramirez, Clara Malagon, Antonio Iglesias, Oscar F. De La Cruz, Oscar Uribe, Edgar Navarro, Paz Martinez, and Dolores Jaraquemada. HLA-DRB1 Allelos and HLA-DRB1 Shared Epitopes Are Markers for Juvenile Rheumatoid Arthritis Subgroups in Colombian Mestizos. *Human Immunology.* 2004. (65): 359-365.

96. Ariana Barberá, María del C Domínguez. Características E Inmunopatogenesis De La Artritis Reumatoide. Estado Actual Del Tratamiento. *Biotecnología Aplicada* 2004;21:189-201
97. Anaya JM, Correa P, Mantilla RD, Jiménez F, Kuffner T, McNicholl JM. Prevalencia Y Severidad De La Artritis Reumatoidea En Población Afrocolombiana de Quibdó. *Acta Med Colomb* 1998; 23: 322-333.
98. Clavijo Acero E, Molina Ramos T, Bernal Gómez A, Pinilla Roa A. Incidencia Del HLA En Artritis Reumatoidea (resumen) *Acta Med Colomb* 1990; 15(suppl): 267.
99. Yunis JJ, Salazar M, Deulofeut R, et al. DRB1*0404 Allele And Rheumatoid Arthritis In The Guambiano Amerindian Tribe Of Colombia (Resumen). *Arthritis Rheum* 1994; 38(suppl): 4
100. Avila LM, Garzón AM, Talero OH, Reyes E, Valle RR. Estudio Inmunogenético En Pacientes Colombianos Con Artritis Reumatoide (resumen). *Rev Colomb Reumatol* 1995; 2: 90.
101. Rothman KJ (2002) *Epidemiology: an introduction*. Oxford University Press, New York.
102. Henrik Kaïllberg, Leonid Padyukov, Robert M. Plenge, Johan Rönnelid, Peter K. Gregersen, Annette H. M. van der Helm-van Mil, Rene E. M. Toes, Tom W. Huizinga, Lars Klareskog, and Lars Alfredsson. Gene-Gene and Gene-Environment Interactions Involving HLA-DRB1, PTPN22, and Smoking in Two Subsets of Rheumatoid Arthritis. 2007. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;80:867–875.
103. Carlo Perricone. An Overview on the Genetic Of Rheumatoid Arthritis: A Never-Ending Story. *Autoimmunity Reviews*. 2011 (65): 245-250.

104. D Hilderson, F Corstjens, P Moons. Adolescents with juvenile idiopathic arthritis: who cares after the age of 16? *Clinical and experimental rheumatology* 2010, vol. 28, no5, pp. 790-797
105. MacKay K, Eyre S, Myerscough A, Milicic A, Barton A, Laval S, et al. Whole-Genome Linkage Analysis Of Rheumatoid Arthritis Susceptibility Loci In 252 Affected Sibling Pairs In The United Kingdom. *Arthritis Rheum* 2002;46:632–9.
106. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Kallberg H, Bengtsson C, Grunewald J, et al, the Epidemiological Investigation Of Rheumatoid Arthritis Study Group. A New Model For An Etiology Of Rheumatoid Arthritis: Smoking May Trigger HLA–DR (Shared Epitope)–Restricted Immune Reactions To Autoantigens Modified By Citrullination. *Arthritis Rheum* 2006; 54:38–46.
107. Pedersen M, Jacobsen S, Klarlund M, Pedersen BV, Wiik A, Wohlfahrt J, et al. Environmental Risk Factors Differ Between Rheumatoid Arthritis With And Without Auto-Antibodies Against Cyclic Citrullinated Peptides. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R133.
108. Linn-Rasker SP, van der Helm-van Mil AH, van Gaalen FA, Kloppenburg M, de Vries RR, le Cessie S, et al. Smoking Is A Risk Factor For Anti-CCP Antibodies Only In Rheumatoid Arthritis Patients Who Carry HLA-DRB1 Shared Epitope Alleles. *Ann Rheum Dis* 2006;65:366–71.
109. Michou L, Teixeira VH, Pierlot C, Lasbleiz S, Bardin T, Dieude P, et al. Associations Between Genetic Factors, Tobacco Smoking And Autoantibodies In Familial And Sporadic Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:466–70.
110. Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. Cutting Edge: The Conversion Of Arginine To Citrulline Allows For A High-

Affinity Peptide Interaction With The Rheumatoid Arthritis associated HLA-DRB1*0401 MHC Class II Molecule. *J Immunol* 2003;171:538–41.

111. Lee AT, Li W, Liew A, Bombardier C, Weisman M, Massarotti EM, et al. The PTPN22 R620W Polymorphism Associates with RF Positive Rheumatoid Arthritis In A Dose-Dependent Manner, But Not With HLA-SE Status. *Genes Immun* 2005; 6:129–33.

112. Rieck M, Arechiga A, Onengut-Gumuscu S, Greenbaum C, Concannon P, Buckner JH. Genetic Variation In PTPN22 Corresponds To Altered Function Of T And B Lymphocytes. *J Immunol* 2007;179:4704–10

113. Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orru V, Zavattari P, et al. Autoimmune-Associated Lymphoid Tyrosine Phosphatase Is A Gain-Of-Function Variant. *Nat Genet* 2005;37:1317–9.

114. Michou L, S Lasbleiz, AC Rata, P Migliorini, R Westhovens, Barrera P, H Alves, C Pierlot, E Glikmans, S Garnier, Dausset J, Vaz C, M Fernandes, Petit-E Teixeira, Lemaire, Pascual-Salcedo D, S Bombardieri, Dequeker J, Radstake TR, Van Riel P, L van de Putte, Lopes-Vaz A, B Prum, Bardin T, Dieudé P, F Cornélis; Consorcio Europeo de Familias artritis reumatoide. Linkage Proof For PTPN22, A Rheumatoid Arthritis Susceptibility Gene And A Human Autoimmunity Gene. *Proc Natl Acad Sci EE.UU. A.* 2007 Jan 30; 104 (5) :1649-54.

115. Barnetche T, Constantin A, Cantagrel A, Cambon-Thomsen A, Gourraud PA. New Classification Of HLA-DRB1 Alleles In Rheumatoid Arthritis Susceptibility: A Combined Analysis Of Worldwide Samples. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(1):R26.

116. Michou L, Croiseau P, Petit-Teixeira E, du Montcel ST, Lemaire I, Pierlot C, Osorio J, Frigui W, Lasbleiz S, Quillet P, Bardin T, Prum B, Clerget-Darpoux F, Cornélis F; European Consortium on Rheumatoid Arthritis

Families. Validation of the Reshaped Shared Epitope HLA-DRB1 Classification In Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(3):R79.

117. Gyetvai A, Szekanecz Z, Soós L, Szabó Z, Fekete A, Kapitány A, Teodorescu M, Sipka S, Szegedi G, Lakos G. New Classification Of The Shared Epitope In Rheumatoid Arthritis: Impact On The Production Of Various Anti-Citrullinated Protein Antibodies. *Rheumatology (Oxford).* 2010 Jan;49(1):25-33.

118. Newton JL, Harney SM, Wordsworth BP, Brown MA. A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2004; 5:151-7.

119. Rodríguez F. Et, al. Guía practica a los estudios de asociación genética. Consideración sobre su utilidad clínica. *Nefrología.* 2009; 29 (6): 582-588

ANEXOS

Universidad del Norte
Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular

CONSENTIMIENTO INFORMADO

*Cualquier anomalía que usted observe durante el período de estudio por favor comunicarse con el investigador principal del proyecto Dra. Gloria Garavito de Egea 3509486 – 3509337, oficina ubicada en la Universidad del Norte en el bloque del laboratorio # 3.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: MARCADORES DE DOS SISTEMAS GENETICOS Y POLIMORFISMOS MOLECULARES (MHC/HLA-DRB1- PTPN22 (C1858T) ASOCIADOS A ENFERMEDAD REUMATICA: AIJ POLIARTICULAR Y AR DE INSTALACION TEMPRANA EN UN GRUPO DE PACIENTES COLOMBIANOS.

Yo _____ he sido invitado a participar en el proyecto de investigación titulado **MARCADORES DE DOS SISTEMAS GENETICOS Y POLIMORFISMOS MOLECULARES (MHC/HLA-DRB1- PTPN22 (C1858T) ASOCIADOS A ENFERMEDAD REUMATICA: AIJ POLIARTICULAR Y AR DE INSTALACION TEMPRANA EN UN GRUPO DE PACIENTES COLOMBIANOS.**

1. proyecto que va a ser realizado por investigadores del grupo de Inmunología y Biología Molecular adscrito al departamento de Ciencias Básicas Médicas, de la División Ciencias de la Salud de la Universidad del Norte de Colombia.
2. El propósito específico de este proyecto, es llevar a cabo varios ensayos experimentales con una muestra de sangre venosa periférica, con el fin de estudiar los **MARCADORES DE DOS SISTEMAS GENETICOS Y POLIMORFISMOS MOLECULARES (MHC/HLA-DRB1- PTPN22 (C1858T) ASOCIADOS A ENFERMEDAD REUMATICA: AIJ POLIARTICULAR Y AR DE INSTALACION TEMPRANA.** Para ello se me ha informado que:
 - a. Que (AIJ) Poliarticular y (AR) de Instalación Temprana son unas enfermedades autoinmunes en que el sistema inmunológico ataca erróneamente células y tejidos sanos.
 - b. Que cualquier persona puede padecer (AIJ) Poliarticular y (AR) de Instalación Temprana aunque las mujeres tienen mayor riesgo de enfermarse.
 - c. Que mi participación en este estudio es una voluntaria contribución al desarrollo de la ciencia y a la mejoría de la salud de nuestros semejantes.
 - d. Que acepto participar en este estudio, previa evaluación médica, se me solicitará la donación de una (1) muestra de sangre de 10cc obtenida de una vena de mi antebrazo, que será recolectada durante una consulta médica.
 - e. Que el tiempo necesario para la toma de muestras es aproximadamente de 10 minutos.
 - f. Que la muestra de sangre será tomada por personal de un equipo médico capacitado, entrenado e idóneo.
 - g. Que este estudio se considera en el marco de la Reglamentación Colombiana como de bajo riesgo.
 - h. Que la toma de muestra de sangre puede producir algo de dolor o enrojecimiento en el área de la veno-punción y en raras ocasiones sensación de mareo de la que me recuperaré rápido y espontáneamente sin que produzca complicación alguna.
 - i. Que los procedimientos de toma de muestra no representan ningún costo para mí.
 - j. Que podré solicitar información o aclaración de mi participación en este estudio a cualquiera de los investigadores.
 - k. Que mi participación en este proyecto permitirá y contribuirá a generar un nuevo conocimiento acerca de la genética (AIJ) Poliarticular y (AR) de Instalación Temprana y de

los mecanismos de inmunorregulación y en el futuro podría ser la base para el desarrollo de métodos de diagnóstico o tratamientos más precisos y eficaces.

- l. Que cualquier información adicional e importante encontrada durante el periodo de duración del estudio, que pudiese resultar importante para mi salud, me será comunicada oportuna y de forma inmediata.
- m. Que tuve una entrevista con el investigador y entendí y comprendí de manera clara y adecuada la información que se me suministró sobre el citado proyecto y se respondió satisfactoriamente a todas mis inquietudes y preguntas.
- n. Que mi participación es absolutamente voluntaria sin necesidad de recibir estímulos o motivaciones especiales por parte del equipo investigador y de igual manera estoy en libertad de retirarme cuando lo desee sin necesidad de dar explicaciones.
- o. Que la información generada por este estudio es estrictamente confidencial. Las muestras biológicas y la data que genere es estudio, para publicaciones científicas no será identificada con mi nombre.
- p. Que se me entregará una copia del consentimiento informado antes de proceder a la toma de muestra de sangre.

Nota: Las muestras de sangre tomadas a los sujetos involucrados en el estudio de investigación serán utilizados únicamente para el desarrollo de esta investigación.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, de forma libre, consciente y voluntaria, expreso mi autorización a la Universidad del Norte para participar en este proyecto.

Yo, mayor de edad e identificado con la cédula de ciudadanía N° _____ manifiesto:

- 1. Que el siguiente consentimiento me fue entregado antes del momento de la toma de la muestra y me fueron explicadas las implicaciones correspondientes por parte de un investigador del grupo. Luego de las aclaraciones pertinentes para dar el aval.
- 2. Que soy consciente que la sangre que donaré, así como la colaboración que prestaré, será utilizada con fines de investigación y que nadie obtendrá ningún tipo de lucro con ellas.
- 3. Soy también consciente que la participación y el procedimiento en este estudio no representa ningún peligro para mi salud y que el procedimiento para la toma de la muestra es seguro.

Que en constancia, firmo este consentimiento informado, en la ciudad de Barranquilla, el día ___ de _____ del año 200___, en presencia del investigador y de dos testigos.

PACIENTE:

Nombre y firma _____
c.c.

Dirección y fecha: _____

TELEFONO _____

Investigador: Nombre y firma _____
c.c.

Testigo1: Nombre y firma _____
c.c.

Testigo2: Nombre y firma _____
c.c.

FORMATO DE RECOLECCION CLINICA

DIAGNOSTICO _____ CODIGO _____

A. DATOS GENERALES.

Nombre y Apellido _____ TEL _____
Dirección _____ fecha de nacimiento _____

1. sexo: M__ F__

2. Edad.

1	16 a 20	
2	21 a 30	
3	31 a 40	
4	41 a 50	
5	50 a 61	
6	61 a 70	
7	71 a 80	

3. Procedencia.

Ciudad _____ Departamento _____

B. HISTORIA DE LA ENFERMEDAD.

1. Debe reunir mínimo cuatro criterios para la clasificación de AR.

1. rigidez matinal ()
2. artritis de tres o mas articulaciones ()
3. artritis de las articulaciones de las manos ()
4. artritis simétrica ()
5. nódulos reumatoides ()
6. factor reumatoideo Pos () Neg ()
7. cambios radiológicos ()
8. ACCP ()

2. Duración de la enfermedad desde el inicio de los síntomas (en meses) hasta la primera visita.

1	0 a 3	
2	3 a 6	
3	6 a 9	
4	9 a 12	

C. FORMAS CLINICAS DEL INICIO DE LA ENFERMEDAD.

3. En cuanto al número de las articulaciones.

1	Monoarticular	
---	---------------	--

2	Oligoarticular	
3	Poliarticular	

4. Tipo de comienzo.

1	Abrupto	
2	Gradual	

D. TIEMPO TRANSCURRIDO EN MESES ENTRE EL COMPROMISO DISTAL (PEQUEÑAS ARTICULACIONES) Y EL COMPROMISO PROXIMAL (MEDIANAS O GRANDES ARTICULACIONES) SI SU EVOLUCION HA SIDO ASI:

1	0 a 3	
2	3 a 6	
3	6 a 9	
4	9 a 12	

E. FUE PRECEDIDA LA AR POR:

1. entetitis o tendinitis
2. artralgia inflamatoria

ARTICULACIÓN	DERECHA					IZQUIERDA				
Hombros										
Codos										
Carpos										
Rodillas										
MCF	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
IFP	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5

G. EXAMEN FISICO GENERAL.

1. Fuma si ___ No _____

Signos vitales.

1. peso: _____
2. tensión arterial _____
3. frecuencia cardiaca _____
4. talla _____.

5. Examen Físico

Sistema	Normal	Anormal	No realizado	Detalles
Aspecto general				
Cabeza				
Nariz, orejas y garganta				
Cuello				
Piel				
Pulmones				

Corazón				
Abdomen				
Óseo				
Neurológico				
Genito urinario				
Otros				

H. SEROLOGIA

RA Test: ()

ANN: ()

Título y Patron: ()

ANTECEDENTES CLINICOS.

1. Sufre usted de otra enfermedad autoinmune SI__ NO__

Cual _____

2. padece otra tipo de enfermedad SI__ NO__

Cual _____

OBSERVACIONES

Base de datos: Tipificaciones HLA clase II y PTPN22 (AIJ) Poliarticular

CODIGO NUEVO	CODIGO	DIAGNOSTICO	PTN22 (1858) C/T	PTPN22 CATEGORICA	ALELOS HLA DRB1		HAPLOTIPOS HLA DRB1*]
AIJ-001	ARJ-075	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0101	0405	0101/0405
AIJ-002	ARJ-077	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	1602	0402	1602/0402
AIJ-003	ARJ-150	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0701	1301	0701/1301
AIJ-004	ARJ- 153	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0403	0404	0403/0404
AIJ-005	ARJ- 175	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0701	0408	0701/0408
AIJ-006	AR-ARJ-040	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0407	1501	0407/1501
AIJ-007	AR-ARJ-045	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0101	1101	0101/1101
AIJ-008	AR-ARJ-046	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0405	0301	0405/0301
AIJ-009	AR-ARJ-052	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0901	1104	0901/1104
AIJ-010	AR-ARJ-056	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0404	1301	0404/1301
AIJ-011	AR-ARJ-057	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	1402	0411	1402/0411
AIJ-012	AR-ARJ-060	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	1502	0404	1503/0404
AIJ-013	AR-ARJ-109	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	1501	1101	1501/1101
AIJ-014	AR-ARJ-070	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0411	1303	0411/1303
AIJ-015	AR-ARJ-080	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0802	0901	0802/0901
AIJ-016	AR-ARJ-005	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0301	0901	0301/0901
AIJ-017	AR-ARJ-042	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0901	1303	0901/1303
AIJ-018	AR-ARJ-047	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0301	0402	0301/0402
AIJ-019	AR-ARJ-048	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0402	0301	0403/0301
AIJ-020	AR-ARJ-049	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0301	1303	0301/1303
AIJ-021	AR-ARJ-050	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CT	2,00	0407	1502	0407/1502
AIJ-022	AR-ARJ-051	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	TT	3,00	0301	1301	0301/1301
AIJ-023	AR-ARJ-053	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	1101	1503	1101/1503
AIJ-024	AR-ARJ-054	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0404	0101	0404/0101
AIJ-025	AR-ARJ-055	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	1101	0901	1101/0901
AIJ-026	AR-ARJ-059	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	1503	1301	1503/1301
AIJ-027	AR-ARJ-089	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	1501	1001	1501/1001
AIJ-028	AR-ARJ-068	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CT	2,00	0404	1305	0404/1339
AIJ-029	AR-ARJ-090	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0901	0401	0901/0401
AIJ-030	AR-ARJ-105	ARTRITIS IDIOPATICA JUVENIL POLIARTICULAR	CC	1,00	0802	1402	0802/1402

Base de datos: Tipificaciones HLA clase II y PTPN22 AR de Instalación Temprana

NUEVO CODIGO	CODIGO	DIAGNOSTICO	PTPN22	PTPN22 Categorica	ALELOS HLA DRB1		HAPLOTIPOS HLA- DRB1*
AR-001	AR-183	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	IND	0,00	1503	0302	1503/0302
AR-002	AR-ARJ-001	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0301	1501	0301/1501
AR-003	AR-ARJ-002	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0101	0901	0101/0901
AR-004	AR-ARJ-003	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	1501	0301	1501/0301
AR-005	AR-ARJ-004	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CT	2,00	1001	1303	1001/1303
AR-006	AR-ARJ-009	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0404	1001	0404/1001
AR-007	AR-ARJ-013	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0101	1501	0101/1501
AR-008	AR-ARJ-014	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CT	2,00	0901	1503	0901/1503
AR-009	AR-ARJ-018	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CT	2,00	1301	0301	1301/0301
AR-010	AR-ARJ-020	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0101	0404	0101/0404
AR-011	AR-ARJ-021	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	1501	1001	1501/1001
AR-012	AR-ARJ-022	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0408	0407	0408/0407
AR-013	AR-ARJ-023	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0301	1501	0301/1501
AR-014	AR-ARJ-025	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0101	1501	0101/1501
AR-015	AR-ARJ-030	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CT	2,00	0701	0701	0701/0701
AR-016	AR-ARJ-026	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0101	1101	0101/1101
AR-017	AR-ARJ-028	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0101	0301	0101/0301
AR-018	AR-ARJ-031	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0101	1503	0101/1503
AR-019	AR-ARJ-032	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0101	0901	0101/0901
AR-020	AR-ARJ-033	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	1303	0401	1303/0401
AR-021	AR-ARJ-034	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0101	0401	0101/0401
AR-022	AR-ARJ-035	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	IND	0,00	0101	0101	0101/0101
AR-023	AR-ARJ-058	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0101	1101	0101/1101
AR-024	AR-ARJ-102	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0402	1501	0402/1501
AR-025	AR-ARJ-103	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0802	0901	0802/0901
AR-026	AR-ARJ-104	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0301	0901	0301/0901
AR-027	AR-ARJ-006	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0401	0402	0401/0402
AR-028	AR-ARJ-008	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CT	2,00	0406	0408	0406/0408
AR-029	AR-ARJ-019	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CT	2,00	1301	0407	1301/0407
AR-030	AR-ARJ-039	ARTRITIS REUMATOIDE DEL ADULTO DE INICIO TEMPRANO	CC	1,00	0103	1001	0103/1001

Base de datos: Tipificaciones HLA clase II y PTPN22 de los controles

CODIGO NUEVO	CODIGO	PTPN22 CONTROLES	CONTROLES PTPN22 CATEGORICAS	CONTROLES ALELOS HLA DRB1		HAPLOTIPOS HLA DRB1
CO-001	CO - 58	CC	1,00	1501	0407	1501/0407
CO-002	CO - 69	CC	1,00	1102	0701	1102/0701
CO-003	CO - 72	CC	1,00	0103	1102	0103/1102
CO-004	CO - 75	CC	1,00	0301	1601	0301/1601
CO-005	CO - 76	CC	1,00	0404	1303	0404/1303
CO-006	CO - 77	CC	1,00	1104	0103	1104/0103
CO-007	CO - 87	CC	1,00	1301	1304	1301/1304
CO-008	CO - 88	CC	1,00	1501	1302	1501/1302
CO-009	CO - 89	CT	2,00	0301	0407	0301/0407
CO-010	CO - 104	CC	1,00	1501	1102	1501/1102
CO-011	CO - 114	CC	1,00	0411	1301	0411/1301
CO-012	CO - 115	CC	1,00	0701	0701	0701/0701
CO-013	CO - 126	CC	1,00	0801	0701	0801/0701
CO-014	CO - 127	CC	1,00	0405	0801	0405/0801
CO-015	CO - 132	CC	1,00	0101	0406	0101/0406
CO-016	CO - 133	CC	1,00	0701	0101	0701/0101
CO-017	CO - 142	CC	1,00	0101	1501	0101/1501
CO-018	CO - 143	CC	1,00	1501	1102	1501/1102
CO-019	CO - 155	CC	1,00	1401	1401	1401/1401
CO-020	CO - 160	CC	1,00	0701	1501	0701/1501
CO-021	CO - 175	CC	1,00	0301	1305	0301/1305
CO-022	CO - 176	CC	1,00	0411	0701	0411/0701
CO-023	CO - 177	CC	1,00	1201	1301	1201/1301
CO-024	CO - 179	CC	1,00	0701	1104	0701/1104
CO-025	CO - 182	CC	1,00	1101	1401	1101/1401
CO-026	CO - 183	CC	1,00	0701	1102	0701/1102

CO-027	CO - 186	CC	1,00	1201	0701	1201/0701
CO-028	CO - 188	CC	1,00	1501	1402	1501/1402
CO-029	CO-198	CC	1,00	1601	1303	1601/1303
CO-030	CO-201	CC	1,00	0803	1102	0803/1102
CO-031	CO-202	CC	1,00	0801	0801	0801/0801
CO-032	AS-010	CC	1,00	0103	0401	0103/0401
CO-033	AS- 013	CC	1,00	0415	1604	0415/1604
CO-034	AS - 015	CC	1,00	1502	0701	1502/0701
CO-035	AS - 021	CC	1,00	1501	1101	1501/1101
CO-036	AS- 043	CC	1,00	0301	1301	0301/1301
CO-037	AS- 046	CC	1,00	0101	0103	0101/0103
CO-038	AS- 061	CC	1,00	0101	0701	0101/0701
CO-039	CO-071	CC	1,00	0301	1401	0301/1401
CO-040	CO-180	CC	1,00	0701	1201	0701/1201
CO-041	CO-164	CC	1,00	0301	1102	0301/1102
CO-042	CO-145	CC	1,00	0301	1101	0301/1101
CO-043	CO-150	CC	1,00	0101	0701	0101/0701
CO-044	CO-154	CC	1,00	1101	1001	1101/1001
CO-045	CO-140	CC	1,00	0407	0701	0407/0701
CO-046	CO- 130	CC	1,00	0701	0302	0701/0302
CO-047	CO- 156	CC	1,00	1601	0801	0412/0801
CO-048	CO- 159	CC	1,00	0701	1301	0701/1301
CO-049	CO- 161	CC	1,00	1105	0801	1105/0801
CO-050	CO- 166	CC	1,00	0701	1302	0701/1302
CO-051	CO-141	CC	1,00	1604	1301	1604/1301
CO-052	CO-169	CC	1,00	1301	0701	1301/0701
CO-053	CO-178	CC	1,00	1101	1201	1101/1201
CO-054	CO- 209	CC	1,00	1301	0302	1301/0302

CO-055	CO- 211	CC	1,00	0301	1601	0301/1601
CO-056	CO- 212	CC	1,00	0701	1001	0701/1001
CO-057	CO- 214	CC	1,00	0409	1101	0401/1101
CO-058	CO- 215	CC	1,00	0403	0701	0411/0701
CO-059	CO- 216	CC	1,00	0802	0411	0802/0411
CO-060	CO- 217	CC	1,00	0101	0701	0101/0701

