



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa



Posgrado en
Biología Experimental

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Evaluación de los polimorfismos -2578C/A, -1154G/A y -634G/C del factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF-A*) y su relación con la susceptibilidad a desarrollar artritis reumatoide en la población mestiza mexicana.”

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestra en Biología Experimental

PRESENTA

Biol. Exp. Ana Karen Rodríguez Elías

COMITÉ TUTORAL

Codirector interno: Dr. Héctor Fernando Serrano

Codirectora interna: Dra. Silvia Jiménez Morales

Asesor: Dr. Julián Ramírez Bello

CDMX. 2018



“El programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), registro 001481, en el nivel consolidado, y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”. Para la realización de los estudios de maestría la alumna Ana Karen Rodríguez Elías, contó con el apoyo de beca CONACyT mediante el número de registro 302376/CVU: 566605. Este proyecto fue financiado por CONACyT (FOSISS- 233107).

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Edmundo Bonilla Gonzalez
Depto. De Ciencias de la Salud, UAM-I
Presidente

Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo
Depto. De Ciencias de la Salud, UAM-I
Vocal

Dra. Maria de los Ángeles Aguilar Santamaría
Depto. De Ciencias de la Salud, UAM-I
Vocal

Dr. Héctor Fernando Serrano
Depto. De Ciencias de la Salud, UAM-I
Secretario

AGRADECIMIENTOS

“Si haces planes para un año, siembra arroz.
Si lo haces por dos lustros, planta árboles.
Si los haces para toda la vida, educa a una persona”.

Proverbio chino

Al Dr. Julián R.B., la Dr. Silvia J.M. y Dr. H.F. Serrano, mi gratitud por su infinita paciencia y profesionalidad. Han sido pilar importante para el desarrollo de este proyecto. Tienen todo mi respeto y mi más sincero reconocimiento por su esfuerzo y dedicación.

A mis compañeros de maestría y amigos: Azucena, Atzin, Marco, Elizabeth, Gabriela, Abraham y Norma, por su amistad y palabras de aliento para continuar con este trabajo y no permitir que me rindiera.

A mis compañeros de laboratorio: Mayra, Daniela y Elizabeth, por todo el apoyo ofrecido para la elaboración de este proyecto.

Al posgrado de Biología Experimental por aceptarme y darme la oportunidad de aprender.

A todos ustedes que siempre han estado conmigo en buenos y malos momentos, hoy culmino esta meta, les brindo mi eterno agradecimiento.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Epidemiología	2
1.2	Manifestaciones clínicas	2
1.2.1	Manifestaciones articulares	3
1.2.2	Manifestaciones extra articulares	3
1.3	Diagnóstico	3
1.4	Fisiopatología	4
1.4.1	Citocinas	6
1.4.2	Anticuerpos	8
1.5	Angiogénesis en la sinovitis reumatoide	10
1.5.1	Hipoxia	11
1.6	Etiología	12
1.6.1	Factores ambientales	12
1.6.2	Factor genético	14
1.7	Componente genético en artritis reumatoide	14
1.8	SNPs y variabilidad genética	15
1.8.1	Implicaciones funcionales de los SNPs	16
1.9	Identificación de SNPs en enfermedades multifactoriales.	18
1.9.1	PCR de tiempo real con sondas TaqMan®	19
1.9.2	Secuenciación automática o capilar	20
1.10	Estrategias para la identificación de genes asociados con AR	20
1.10.1	Estudios de ligamiento	21
1.10.2	Estudios de asociación genética	21
1.10.3	Estudios de asociación caso-control	22
1.10.4	Estudios de asociación basados en familias	23
1.10.5	Estudios de gen candidato	23
2.	ANTECEDENTES	24
2.1	Genes asociados con AR	24
2.1.1	Complejo principal de histocompatibilidad clase II	25
2.1.2	Genes no HLA	25

2.2	VEGF-A	27
2.3	Papel de <i>VEGF-A</i> en AR	29
2.3.1	Expresión y función de receptores de <i>VEGF-A</i> en AR	31
2.3.2	SNPs en el gen <i>VEGF-A</i> : -2578C/A, -1154G/A y -634G/C	33
3.	JUSTIFICACIÓN	35
4.	HIPÓTESIS	36
5.	OBJETIVO GENERAL	36
6.	OBJETIVOS PARTICULARES	36
7.	MATERIAL Y MÉTODO	37
7.1	Población de estudio	37
7.2	Recolección de muestras	39
7.3	Extracción del DNA genómico para la extracción del DNA	39
7.4	Discriminación alélica, técnica de 5´exonucleasa (TaqMan)	41
7.4.1	Preparación de la master mix	42
7.5	Validación de los SNPs de <i>VEGF-A</i> mediante secuenciación	42
7.5.1	Purificación de los productos de PCR	44
7.6	Estimación del tamaño de muestra y poder estadístico del estudio	45
7.7	Evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg	45
7.8	Análisis de asociación entre casos y controles	46
8.	RESULTADOS	47
8.1	Población analizada	47
8.2	Equilibrio de Hardy-Weinberg	49
8.2.1	SNP -2578 C/A	49
8.2.2	SNP -1154 G/A	50
8.2.3	SNP -634 G/C	51
8.3	Análisis de secuenciación	52
8.4	Análisis de haplotipos y LD	54
9.	DISCUSIÓN	55
10.	CONCLUSIONES	61
11.	PERSPECTIVAS	61
12.	BIBLIOGRAFÍA	62
13.	ARTICULOS PUBLICADOS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Estructura de una articulación normal y con AR.....	6
FIGURA 3. Enfermedad autoinmune multifactorial.....	14
FIGURA 4. Efecto funcional de SNPs.....	20
FIGURA 5. Estructura del gen, ARNm y proteína de VEGF-A.....	32
FIGURA 6. Perpetuación del proceso inflamatorio en AR mediado por <i>VEGF</i>	34
FIGURA 7. Estructura y funciones de los receptores de VEGF.....	36
FIGURA 8. Gel de agarosa al 2%, productos de PCR purificados.....	50
FIGURA 9. Población analizada.....	53
FIGURA 10. Distribución geográfica de los individuos analizados	55
FIGURA 11. Electroferograma de la región promotora de <i>VEGF-A</i>	61
FIGURA 12. Haplotipos obtenidos al analizar los tres snps de <i>VEGF-A</i>	62
FIGURA 13. ID ente los snp de <i>VEGF-A</i>	62

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Criterios de clasificación para AR.....	4
TABLA 2. Genes que han mostrado asociación con AR.....	26
TABLA 3. Características de los SNPs de VEGF-A analizados en este estudio..	41
TABLA 4. Diseño de oligos para el análisis de los SNPs evaluados.....	45
TABLA 5. Frecuencias de genotipos y alelos del SNP -2578C/A en casos con AR y controles.....	49
TABLA 6. Frecuencias de genotipos y alelos del SNP -2578C/A de VEGF-A en población femenina con AR y controles.....	50
TABLA 7. Frecuencias de genotipos y alelos obtenidos del SNP -1154G/A en VEGF-A en casos con AR y controles.....	50
TABLA 8. Frecuencias de genotipos y alelos del SNP -1154G/A en VEGF-A en población femenina.....	51
TABLA 9. Frecuencias de genotipos y alelos del SNP -634 G/C de VEGF-A en la población general.....	51
TABLA 10. Frecuencias de genotipos y alelos del SNP -634 G/C de VEGF-A en la población femenina.....	52
TABLA 11. Cuantificación de las diferentes muestras y valores de pureza obtenidos. SNP 1: -634 G/C; SNP 2: -1154 G/A; SNP 3: -2578 C/A.....	53

ABREVIATURAS

ACPA: anticuerpos antipéptido cíclico citrulinado.

ACR: colegio americano de reumatología.

Anti-PCC: anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados

AR: artritis reumatoide.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

EA: enfermedad autoinmune

EMCT: enfermedad mixta del tejido conjuntivo

EULAR: liga europea contra el reumatismo.

FIH1: inhibidor de HIF1- α .

FR: factor reumatoide.

HIF: factor inducible por hipoxia

HIF- α : subunidad alfa de HIF

HIF- β : subunidad beta de HIF

HRE: elementos de respuesta a hipoxia

IFN- γ : interferón gamma

IgG: inmunoglobulinas isotipo G

IL: Interleucinas

LES: lupus eritematoso sistémico.

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1

MMP: metaloproteasas de la matriz extracelular.

Nk: células asesinas naturales

NP-1: neuropilinas 1.

NP-2: neuropilinas 2

PCR: proteína C reactiva.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PHD: proteína prolil hidroxilasa

Región Fc: fracción cristalizable de las inmunoglobulinas

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido

cSNP: SNPs codificante.

rSNP: SNP reguladores

srSNP: SNPs RNA estructural

SI: sistema inmune

SSP: síndrome de Sjögren primario

Th1: células T colaboradoras de tipo 1.

TLR: receptor tipo toll

TNF: factor de necrosis tumoral

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa.

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

VEGFR1 o Flt-1: receptor 1 de VEGF

VEGFR2 o KDR: receptor 2 de VEGF

VEGFR3 o FLT-4: receptor 3 de VEGF

VSG: velocidad de sedimentación glomerular.

RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica, inflamatoria y autoinmune de etiología multifactorial que afecta principalmente a mujeres. Diversos factores ambientales y genéticos contribuyen en su desarrollo. Algunos genes que codifican para proteínas que regulan el sistema inmunológico han sido asociados con susceptibilidad a AR. Uno de ellos es el gen VEGF-A, el cual codifica para el factor de crecimiento endotelial vascular tipo A y juega un papel importante en el proceso angiogénico y proinflamatorio en AR. En este gen se han identificado polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) reportados como factores de riesgo para AR y otras entidades humanas, como el -1154 G/A (rs1570360), -2578 C/A (rs699947) y -634 G/C (rs2010963). Nuestro objetivo fue determinar si los SNPs -1154 G/A, -2578 C/A y -634 G/C confieren riesgo para AR en nuestra población.

El estudio incluyó 364 casos diagnosticados con AR y 323 controles sin antecedentes familiares (en tres generaciones) de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. La edad promedio en ambos grupos fue de 52 años, con una desviación estándar de ± 13 para los pacientes y ± 8 en los controles. Todos los individuos fueron reclutados en el Hospital Juárez de México. El DNA se obtuvo a partir de una muestra de sangre periférica. La genotipificación se realizó mediante la técnica de 5' exonucleasa usando sondas TaqMan. El Equilibrio de Hardy-Weinberg (E-HW) se evaluó mediante el programa Finetti; mientras que el Odds Ratio (OR), intervalo de confianza (IC) 95% y el valor de p fueron estimados mediante el programa Epidat.

La distribución de los SNPs -2578 C/A y -1154 G/A entre los casos y controles no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, el alelo C del SNP -634 G/C mostró una mayor frecuencia en casos en comparación con los controles para la población general (OR=1.97; P=0.003) y mujeres (OR=1.86; P=0.011), sin embargo, no se cumplió con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Nuestros datos sugieren que el SNP -634 G/C confiere riesgo para padecer AR en nuestra población de estudio. Este es el primer estudio que identificó una asociación entre la variante -634G/C de *VEGF-A* con susceptibilidad para AR.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, inflammatory and autoimmune disease of multifactorial etiology that mainly affects women. Various environmental and genetic factors contribute to its development. Some genes that code proteins and that regulate the immune system have been associated with susceptibility to RA. One of them is the *VEGF-A* gene, which codes for vascular endothelial growth factor type A and plays an important role in the angiogenic and pro-inflammatory process in RA. In this gene, single-nucleotide polymorphisms (SNPs) reported as risk factors for RA and other human entities such as -1154G/A (rs1570360), -2578C/A (rs699947) and -634 G/C have been identified. (rs2010963). Our objective was to determine if the -1154 G/A, -2578 C/A and -634G/C confer risk for RA in our population.

The study included 364 cases diagnosed with RA and 323 controls with no family history (in three generations) of inflammatory and autoimmune diseases. Both the cases and the controls were recruited at the Hospital Juárez de México. The DNA was obtained from a peripheral blood sample. Genotyping was performed using the 5' exonuclease technique using TaqMan probes. The Hardy-Weinberg Equilibrium (E-HW) was evaluated through the Finetti program; while the Odds Ratio (OR), 95% confidence interval (CI) and the value of p were estimated using the Epidat program.

The distribution of the SNPs -2578 C / A and -1154 G / A between the cases and controls did not present statistically significant differences. However, the C allele of the SNP -634 G / C presented a higher frequency in cases compared to the controls for general population (OR = 1.97, P = 0.003) and women (OR = 1.86, P = 0.011), nevertheless Hardy-Weinberg equilibrium was not met. Our data suggest that the SNP -634 G / C confers risk for RA in our study population. This is the first study to identify an association between the -634 G / C variant of *VEGF-A* with susceptibility to RA.

1. INTRODUCCIÓN

Una de las propiedades fundamentales del sistema inmune (SI) radica en la capacidad de discriminar entre antígenos propios y extraños, lo cual logra mediante dos mecanismos inmunológicos: inmunidad innata y adaptativa. Sin embargo, debido a diversos mecanismos, ambos tipos de inmunidad pueden fallar, ya sea por: a) una inadecuada respuesta a patógenos (inmunodeficiencia); b) por una respuesta exagerada e inapropiada a un antígeno (hipersensibilidad); y por c) pérdida de la tolerancia a antígenos propios (autoinmunidad). Ésta última, puede dar origen a enfermedades autoinmunes (EA) como la Artritis reumatoide (AR) (Sánchez-Rodríguez S *et al.*, 2004).

La AR una enfermedad crónica, inflamatoria, local o sistémica, que afecta principalmente la membrana sinovial de las articulaciones con movimiento. La AR se caracteriza por inflamación poliarticular de pequeñas y grandes articulaciones, con posible compromiso sistémico en cualquier momento de su evolución, e incluye la formación de autoanticuerpos y manifestaciones extra-articulares (Davis *et al.*, 2012; Mendoza-Vázquez *et al.*, 2013).

Esta enfermedad, no solo es la patología inflamatoria articular más frecuente en adultos, también es una de las más importantes causas de discapacidad, muerte por infartos, y declive socioeconómico debido al elevado costo del tratamiento (Mendoza-Vázquez *et al.*, 2013; McInnes y Schett, 2011).

1.1 Epidemiología

La prevalencia mundial de AR es del 1%, aunque en países industrializados varía entre 0.5 al 2%, con una incidencia anual de 12 a 200 por 100,000 habitantes vivos. La AR es más frecuente en mujeres que en varones (de 2 a 3 mujeres por cada varón afectado) y el pico de edad de aparición es de 30 a 55 años, aunque puede presentarse a cualquier edad (Kurko *et al.*, 2013; McInnes y Schett, 2011).

En México, esta entidad afecta al 1.6% de la población general, siendo del 2.09% en mujeres y del 0.85% en hombres y constituye el principal motivo de consulta en el servicio de reumatología (Mendoza-Vázquez *et al.*, 2013). Cabe mencionar que la prevalencia de la AR en nuestro país varía dependiendo de la zona geográfica estudiada; por ejemplo en Yucatán es de 2.8%, Chihuahua de 1.9%, Sinaloa de 1.8%, Ciudad de México de 1% y Nuevo León de 0.7% (Pelaez-Ballestas *et al.*, 2011).

1.2 Manifestaciones clínicas

En general, en la población femenina la AR se manifiesta entre los 30-50 años de edad, mientras los hombres se presenta de forma tardía. En cerca del 50% de los casos la presentación clínica de la enfermedad es insidiosa, con una duración de varias semanas, e inicia con astenia, fatiga, debilidad, cansancio o pérdida de peso, rigidez muscular, depresión, anorexia y fiebre. Entre el 8 al 15% de los pacientes presentan un comienzo agudo caracterizado con dolor persistente en los músculos; mientras que entre un 15% al 20% de los casos tienen un inicio intermedio, desarrollándose en días o semanas (Khurana y Berney, 2005; Mendoza-Vázquez *et al.*, 2013).

1.2.1 Manifestaciones articulares

Los pacientes con AR presentan un proceso inflamatorio, el cual perjudica principalmente las articulaciones de las manos como las interfalángicas y metacarpofalángicas, pero también puede afectar muñecas, codos, caderas, rodillas, pies, tobillos, cuello, así como la columna cervical (Khurana y Berney, 2005).

1.2.2 Manifestaciones extra articulares

La misma respuesta defectuosa que origina la inflamación de las articulaciones puede afectar muchos órganos y sistemas del cuerpo, incluyendo el sistema hematopoyético, (anemia), vasos sanguíneos (vasculitis), corazón (enfermedad cardiaca), pulmones (pleuritis, fibrosis pulmonar y nódulos pulmonares), sistema nervioso (Síndrome de túnel carpiano), piel (nódulos reumatoides) y ojos (escleritiis) (Prete *et al.*, 2011).

1.3 Diagnóstico

El diagnóstico de AR lo realizan los médicos reumatólogos, quienes toman en cuenta la historia clínica y exploración física, auxiliada por estudios de laboratorio y radiodiagnóstico. Actualmente, los criterios empleados para el diagnóstico de la AR son los establecidos por el Colegio Americano de Reumatología (American College of Rheumatology: ACR) y la liga europea contra el reumatismo (EULAR) (Tabla 1). Cada criterio tiene un valor y para establecer el diagnóstico de AR se requiere una puntuación mayor a seis (Aletaha *et al.*, 2010). En esta clasificación, los pacientes deben presentar al menos una articulación con sinovitis clínica de tipo primaria.

TABLA 1. Criterios de clasificación para artritis reumatoide, ACR-EULAR 2010

Los pacientes deben presentar al menos una articulación con sinovitis clínica, la cual no debe ser originada por otra causa.

	Puntuación
A) Afectación articular	
• 1 articulación grande	0
• 2-10 articulaciones grandes	1
• 1-3 articulaciones pequeñas (con o sin involucro de articulaciones grandes)	2
• 4-10 articulaciones pequeñas (con o sin involucro de articulaciones grandes)	3
• Mas de 10 articulaciones (con al menos una articulación pequeña)	5
B) Serología	
• FR y ACPA negativos	0
• FR y ACPA positivos a títulos bajos (igual o menos de 3 veces lo normal)	2
• FR y ACPA positivos a títulos altos (más de 3 veces lo normal)	3
C) Reactantes de fase aguda (al menos 1 presente para la clasificación)	
• VSG o PCR normales	0
• VSG o PCR elevadas	1
D) Duración de los síntomas	
• Menos de 6 semanas	0
• 6 semanas o más	1

FR: Factor Reumatoide, ACPA: Anticuerpos antipéptido cíclico citrulinado, VSG: Velocidad de sedimentación glomerular, PCR: Proteína C reactiva (Aletaha et al., 2010).

1.4 Fisiopatología

La razón por la cual se desencadena la AR es desconocida; sin embargo, diversos estudios sugieren que su inicio se debe a una respuesta inmunológica anómala para algún antígeno no identificado (exógeno o endógeno), y cuyo procesamiento está dado por macrófagos u otra célula presentadora de antígenos. Éstas, activarían de manera anormal a los linfocitos B y T (los cuales pueden ser también autorreactivos), un fenómeno mediado por varias interleucinas (IL) o citocinas que

son producidas por ellas y que inducen la activación de fibroblastos sinoviales y la proliferación de células endoteliales y de otros tipos celulares involucrados en AR (McInnes y Schett, 2007).

La membrana sinovial no afectada por AR está formada por una matriz bien organizada que contiene proteoglicanos. Dentro de esta estructura se encuentran las células sinoviales (parecidos a fibroblastos y macrófagos), así como una red de capilares y vasos linfáticos. Entre el cartílago y la membrana sinovial está el líquido sinovial, que nutre y lubrica a las articulaciones (Paleolog, 2009).

En AR, la membrana sinovial está infiltrada principalmente por linfocitos T CD4⁺, linfocitos B y macrófagos. El volumen del líquido sinovial aumenta, lo que lleva a inflamación articular y dolor. Además, el sinovio se endurece, pasando de una a dos capas de células hasta alcanzar aproximadamente seis a ocho capas, convirtiéndose en un tejido invasivo, dañando el cartílago, hueso o tendón (Paleolog, 2009). Ello da lugar al cambio histológico característico de AR caracterizado por la formación de un tejido de granulación, invasivo, y altamente vascularizado, denominado *pannus* (Fig. 1) (McInnes y Schett, 2011).

El *pannus* está compuesto fundamentalmente por fibroblastos sinoviales (los cuales responden a múltiples estímulos inducidos por citosinas, factores de crecimiento) y macrófagos activos, que a través de la producción de enzimas proteolíticas conocidas como metaloproteasas de la matriz extracelular (MMP) degradan la matriz cartilaginosa y destruyen el cartílago (McInnes y Schett, 2011). La membrana sinovial también está constituida por osteoclastos que promueven la reabsorción ósea (Goronzy y Weyand, 2009). La invasión del hueso por el

pannus, da lugar a erosiones óseas, destrucción del hueso, tendones y ligamentos (Figura 1) (McInnes y Schett, 2011).

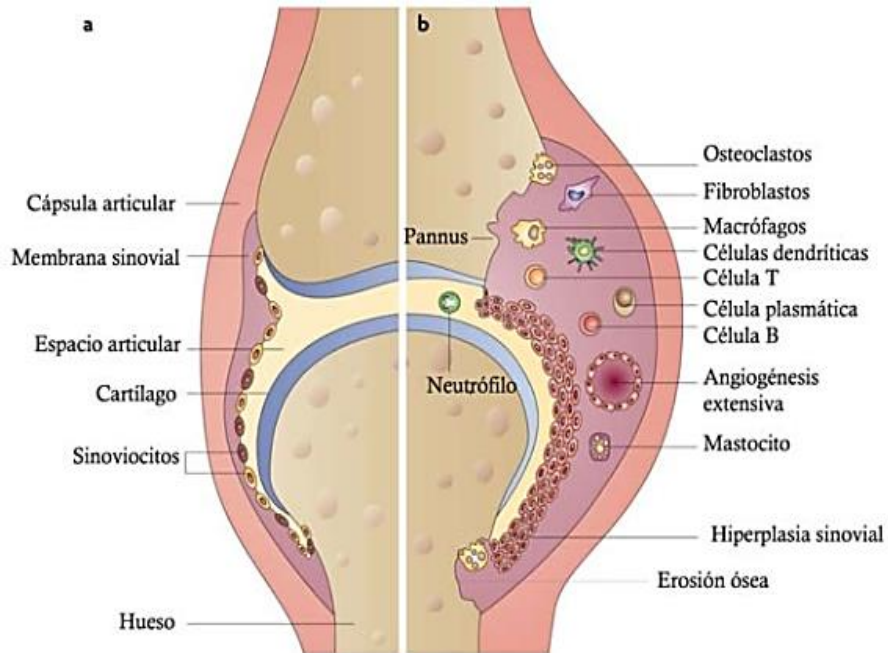


FIGURA 1. Estructura de una articulación normal y con AR. Esquema de una articulación normal (a) y una articulación afectada con AR (b). En AR, la membrana sinovial sufre de hiperplasia y existe infiltración de células inflamatorias dando lugar a inflamación crónica. Con la progresión de la enfermedad, la membrana sinovial se convierte en un tejido patológico denominado pannus, que migra sobre y dentro del cartílago articular y el hueso. Imagen y texto tomados de Smolen y Steiner, 2003.

1.4.1 Citocinas

Las citocinas desempeñan un papel fundamental en AR, debido a que tienen implicaciones funcionales importantes en diferentes procesos tales como inflamación, activación, proliferación y diferenciación de células del SI (Redlich y Smolen, 2012).

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular (< 30kD) con vida media corta, producidas principalmente por células del SI y otros tejidos; además son

mediadores fundamentales de la transmisión de señales intercelulares (Redlich y Smolen, 2012).

El factor de necrosis tumoral (TNF) es la citocina proinflamatoria más estudiada en AR, diversos hallazgos la han identificado como una (o tal vez la principal) de las principales citocinas involucradas en el inicio, perpetuación, actividad y gravedad de la enfermedad. Esta proteína a su vez puede inducir la expresión de otras citocinas, tales como IL-1 e IL-6 (Brennan et al., 1989).

En un modelo murino, se demostró que la sobreexpresión de TNF es suficiente para inducir AR (Keffer et al., 1991). Se ha señalado que tanto TNF como IL-1 son potentes estimuladores de la activación de fibroblastos sinoviales, osteoclastos y condrocitos, los cuales liberan MMPs, proteínas involucradas en la destrucción tisular. La sobre expresión de IL-1 β y TNF conduce a la estimulación de sinoviocitos, contribuyendo aún más en la destrucción articular (McInnes y Schett, 2007; Sanchez-Ramon et al., 2011). Por su parte, IL-6 participa en la activación de linfocitos B, además de estar involucrada en la diferenciación de linfocitos T citotóxicos y en la actividad pro-inflamatoria. IL-6 es también uno de los factores fisiopatológicos más importantes de resorción ósea y destrucción articular (McInnes y Schett, 2007).

Por otro lado, la IL-17, producida primariamente por células Th17, ha sido involucrada con el desarrollo y perpetuación de la AR. Esta citosina induce la producción de otras citocinas inflamatorias en el sinovio de pacientes con AR, promueve la sobrevivencia de sinoviocitos y de células inflamatorias. Así, IL-17, conlleva a un aumento del número de sinoviocitos y células inflamatorias,

hiperplasia y a inflamación exacerbada en las articulaciones de los pacientes con AR (Benedetti y Miossec, 2014). La interacción entre la IL-17 e IL-23 ejercen un control de retroalimentación positiva sobre su propia producción en los fibroblastos sinoviales, perpetuando la inflamación sinovial en AR y también regulan la producción de MMP (Sanchez-Ramon et al., 2011).

Otra citosina de relevancia en AR es IL-18, también denominada factor inductor del interferón gamma (IFN- γ). IL-18 promueve la activación de linfocitos T citotóxicos y células asesinas naturales (NK), las cuales secretan IFN- γ y aumentan el efecto de IL-12. A su vez, el IFN- γ estimula la activación de los monocitos por contacto celular directo con linfocitos T activados, y aumenta la secreción de IL-1 β y TNF promoviendo quimiotaxis de neutrófilos mediada por IL-8. IL-12 producida en los macrófagos, participa en la activación de las células T colaboradoras de tipo 1 (Th1), induce la producción de TNF e IL-1 y estimula la producción células NK e IFN- γ (Sanchez-Ramon et al., 2011).

1.4.2 Anticuerpos

La pérdida de la auto-tolerancia es característico en AR, un proceso biológico que conlleva a la producción de diversos auto-anticuerpos, incluyendo el factor reumatoide (FR), anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados (anti-PCC), y otros que se han relacionado con el pronóstico de la enfermedad, destrucción articular y manifestaciones extra articulares (Alunno et al., 2015, Turesson et al., 2007).

➤ Factor reumatoide

La primera evidencia de autoinmunidad en AR, fue debido a la identificación y caracterización del FR, auto-anticuerpo que se une a la región Fc (fracción

cristalizable) de las inmunoglobulinas isotipo G (IgG). El FR representa un biomarcador no específico para AR, debido a que aumenta como consecuencia de la activación de la respuesta inmune en el contexto de la formación de complejos inmunes (Olivares Martínez et al., 2011).

La presencia del FR se asocia con una enfermedad clínica más grave y con complicaciones a nivel vascular, en comparación con pacientes que no lo presentan. En estadios tempranos de la enfermedad, cerca del 30% de los casos son positivos para este auto-anticuerpo; mientras, entre el 60-70% de los pacientes presentan anticuerpos contra anti-PCC (Turesson et al., 2007).

Adicionalmente, estas proteínas pueden presentarse en altos niveles en infecciones crónicas y en otras patologías autoinmunes como: lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC) y síndrome de Sjögren primario (SSP) (Olivares Martínez et al., 2011).

➤ Anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados (anti-PCC).

Las modificaciones postraduccionales (MPT) son cambios químicos que sufren las proteínas después de ser sintetizadas. Una de las MPT es la citrulinación, la cual conlleva la conversión de un residuo arginina (carga positiva) en citrulina (neutra), evento bioquímico llevado a cabo por la enzima peptidil arginina desaminasa (PAD) (Turesson et al., 2007; Pratt et al., 2009).

Si bien la citrulinación no es específica en AR, los anti-PCC tienen una sensibilidad mayor del 80% y especificidad del 98% en pacientes con AR. Además de la alta sensibilidad y especificidad, estos se detectan en etapas tempranas de AR (hasta

10 años antes del cuadro clínico), y sus niveles correlaciona con una enfermedad más grave y con erosiones articulares (Olivares Martínez et al., 2011). Los anti-PCC contribuyen al daño de la membrana sinovial, pero no necesariamente son la causa del padecimiento (Arend y Firestein, 2012).

➤ Otros anticuerpos

En años recientes, el estudio de la reactividad de los anticuerpos anti-proteínas citrulinadas ha adquirido gran interés, llegando a identificarse otros diferentes a los anti-CCPs asociados con AR. Ejemplos de estos son los anticuerpos antifactor perinuclear (AFP) y antiqueratina (AKA) dirigidos contra filagrina citrulinada y los anticuerpos anti-Sa, los cuales reconocen vimentina citrulinada (Olivares Martínez et al., 2011). Igualmente, se ha sugerido la participación de anticuerpos en contra de antígenos del cartílago articular y extra-articular (Firestein et al., 2013).

1.5 Angiogénesis en la sinovitis reumatoide

Durante la etapa temprana de AR se presenta el proceso de angiogénesis, el cual promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (Cañete, 2004). La angiogénesis es causado en las articulaciones por inflamación local, ya que la formación de vasos sanguíneos es requerido para el suministro del oxígeno, de nutrientes, de filtración de diversas moléculas (factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, etc.) y células inflamatorias derivados de la sangre (neutrófilos, monocitos, linfocitos B, linfocitos T, etc.), permitiendo de esta forma la perpetuación del *pannus* (Paleolog, 2009; Marrelli et al., 2011). De esta forma, la angiogénesis constituye un mecanismo crucial en la

patogenia de AR (Ferrara *et al.*, 2003; Yoo *et al.*, 2008); por lo que puede ser considerada como una “enfermedad angiogénica”, ya que se asocia con la neovascularización del tejido activo (Chen *et al.*, 2012).

1.5.1 Hipoxia

Particularmente, durante el proceso de expansión del tejido afectado en AR, el metabolismo celular en éste aumenta la demanda de oxígeno y de nutrientes; sin embargo, como el suministro de oxígeno es insuficiente, se genera una disminución en sus niveles, originando que la membrana sinovial presenta un estado hipóxico. Una de las principales proteínas reguladoras de la respuesta adaptativa relacionada con alteraciones en los niveles de oxígeno, pertenece a la proteína de la familia de factores de transcripción denominados factores inducibles por hipoxia (HIF); siendo la angiogénesis consecuencia probable de la hipoxia sinovial en AR (Konisti *et al.*, 2012).

Por otra parte, la hipoxia puede desencadenar y/o perpetuar el proceso inflamatorio en AR. Los bajos niveles de oxígeno están asociados con acumulación de células inflamatorias, expresión elevada de HIF y de genes que responden a hipoxia y a niveles elevados de citocinas pro-inflamatorias (Fig. 2). Uno de estos genes es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Konisti *et al.*, 2012), cuya proteína y receptores, presentan niveles elevado en pacientes con AR en comparación con individuos sanos (Fava *et al.*, 1994; Koch *et al.*, 1994; Paleolog *et al.*, 1998; Ballara *et al.*, 2001; Kurosaka *et al.*, 2010).

La interacción dinámica que existe entre angiogénesis, proceso inflamatorio y la presencia de hipoxia, pueden modificar la expresión de diferentes genes que se sabe, tienen un papel importante en la patogénesis de AR (Konisti *et al.*, 2012).

1.6 Etiología

AR es una enfermedad multifactorial, de origen desconocido. Sin embargo, algunos estudios han mostrado que diversos factores participan en su desarrollo, e incluye a factores ambientales, hormonales, agentes infecciosos, anticuerpos y genéticos (Figura 2) (McInnes y Schett, 2011).

1.6.1 Factores ambientales

Si bien, aun no se conocen con precisión los factores ambientales que contribuyen al desarrollo de AR, se sabe que el tabaco, el polvo de sílice, el aceite mineral, la dieta e incluso las presiones sociales podrían desencadenar la enfermedad (Karlson and Deane 2012, Smolen, Aletaha *et al.* 2018).

De todos éstos, el tabaquismo es el factor de riesgo mejor definido en AR, ya que se ha reportado que las mujeres que han fumado por más de 20 años presentan un riesgo relativo (RR) de 1.4 a AR comparado con mujeres no fumadoras. Dicho riesgo disminuye lentamente después de dejar de fumar (Karlson *et al.*, 1999). Además, el tabaquismo se ha asociado con el desarrollo de manifestaciones extra-articulares (Firestein *et al.*, 2013).

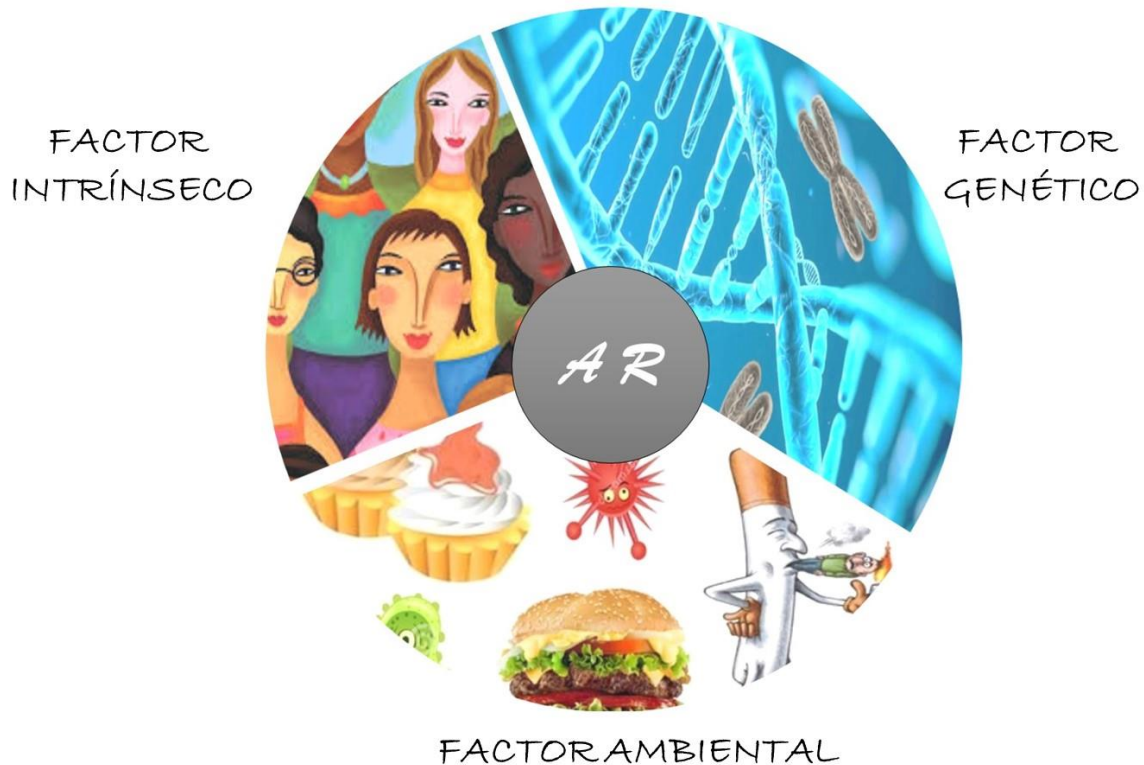


FIGURA 2. Enfermedad autoinmune multifactorial. AR se desarrolla en un individuo por la influencia de un fondo genético de susceptibilidad, factores ambientales (alimentación, fármacos, tabaquismos) y el factor intrínseco (etnia, edad, genero, inmunológicos y hormonales). La combinación no solo da origen a la presencia de AR, sino que también impacta en la gravedad y *actividad*.

Otros factores asociados son la exposición al polvo de sílice, el cual observa un RR de 3.43 (Karlson y Deane, 2012). La duración de la lactancia también se ha asociado a AR, pero de manera interesante la relación es inversa (Liao *et al.*, 2009).

Dentro de los microorganismos descritos que pudieran tener una posible asociación con el desarrollo de AR se encuentran las bacterias *Proteus mirabilis*, *Mycoplasma spp*, *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella copri*; sin embargo, los datos no son concluyentes (Firestein *et al.*, 2013).

Por otra parte, se ha demostrado que las infecciones virales por rubeola, el virus de *Ross River* y parvovirus B19 producen poliartritis aguda (presencia de inflamación en 4 o más articulaciones y su tiempo de evolución es menor de 6 semanas), pero no existe evidencia que éstos inicien AR crónica (McInnes y Schett, 2011). Adicionalmente, el virus de *Epstein-Barr* se considera como agente probable para el desencadenamiento de AR; sin embargo, actualmente esto no ha sido completamente demostrado (Lossius *et al.*, 2012; Arleevskaya *et al.*, 2016; Mahabadi *et al.*, 2016).

1.6.2 Factor genético

Diversos estudios en epidemiología genética han demostrado que la AR es un padecimiento con alta predisposición genético. De hecho, se ha estimado que la contribución del componente genético (Heredabilidad) en AR es de hasta en un 60%, el 40% restante le corresponde al factor ambiental (MacGregor *et al.*, 2000).

1.7 Componente genético en artritis reumatoide

La AR es una patología con alta predisposición genética, observándose hasta cuatro veces más prevalente en familiares de primer grado. Se ha estimado que la heredabilidad en AR es del 60-70% (Rodriguez-Elias, Maldonado-Murillo *et al.* 2016, Knevel, Huizinga *et al.* 2017, Smolen, Aletaha *et al.* 2018).

Estudios realizados en familias y gemelos han mostrado la importancia de los genes en el desarrollo de AR (McInnes y Schett, 2011). Entre gemelos monocigotos, genéticamente idénticos, existe una tasa de concordancia elevada de artritis reumatoide (12% a 15%) comparada con la observada en gemelos

dicigotos y hermanos de individuos afectados (2% a 4%) con quienes comparten el 50% del material genético (Jarvinen and Aho 1994, Kurko, Besenyei et al. 2013). Los estudios de riesgo relativo para hermanos de individuos afectados comparado con la de la población general (individuos no relacionados) son de 2 a 10 veces más (Kurko, Besenyei et al. 2013, Rodriguez-Elias, Maldonado-Murillo et al. 2016).

La identificación de los factores genéticos que contribuyen al desarrollo de AR es de gran relevancia, ya que esto ha permitido comprender diversos mecanismos patogénicos de la enfermedad. Actualmente se sabe que variaciones en la secuencia de genes que codifican para proteínas involucradas en la regulación del sistema inmunológico, degradación del cartílago, migración celular, angiogénesis, apoptosis, etc., confieren susceptibilidad y/o protección para desarrollar AR (Kurko *et al.*, 2013). Dentro de estas variantes, se encuentran los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), los cuales, han permitido evaluar su impacto en enfermedades con herencia compleja entre las que se incluye la AR (gravedad, pronóstico, y respuesta a tratamiento).

1.8 SNPs y variabilidad genética

Los polimorfismos genéticos son variaciones en la secuencia del ADN presentes en más del 1% de la población general. En su mayoría son neutras; es decir, no tienen efecto sobre la expresión final del gen o en la estructura y función de la proteína porque se encuentran en secuencias “no funcionales” del ADN (Checa, 2007; Rodriguez-Elias *et al.*, 2016).

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) representan a las variantes genéticas más comúnmente encontradas en el genoma humano (Ramírez-Bello *et al.*, 2013); son variaciones en la secuencia de ADN que afectan una sola base (adenina (A), timina (T), citosina (C) o guanina (G)) de la secuencia del genoma, y son los marcadores genéticos más ampliamente distribuidos en el genoma humano (Iniesta *et al.*, 2005; Genomes Project *et al.*, 2010).

Los SNPs se relacionan con la variabilidad genética y susceptibilidad para padecer diversas enfermedades comunes. Actualmente, se han descrito más de 10 millones de ellos, aunque se ha estimado que existen aproximadamente 20 millones, alcanzando una distribución de aproximadamente un SNP por cada 100-300 nucleótidos (Ramírez-Bello *et al.*, 2013).

Se estima que solamente el 25% de los SNPs descritos hasta el momento están asociados a ciertas patologías, lo cual puede variar dependiendo de la región geográfica y del componente genético de la población. La presencia de una asociación gen-enfermedad estadísticamente significativa facilita la detección de estas variantes moleculares en poblaciones con mayor riesgo para desarrollar cierta enfermedad, pudiendo ser empleadas como marcadores de susceptibilidad (Florez *et al.*, 2003).

1.8.1 Implicaciones funcionales de los SNPs

Algunos SNPs que se han asociado con el desarrollo de enfermedades constituyen SNPs funcionales; es decir pueden modificar el nivel de expresión del gen, la estructura y estabilidad del ARNm, la cantidad de proteína sintetizada o la

actividad de la misma proteína (Ramírez-Bello *et al.*, 2013). Así, estos SNPS se pueden encontrar en regiones no funcionales del ADN, regiones codificantes, sitios de corte y empalme (splicing), regiones de potenciadores (enhancers), promotoras o reguladoras (Checa, 2007).

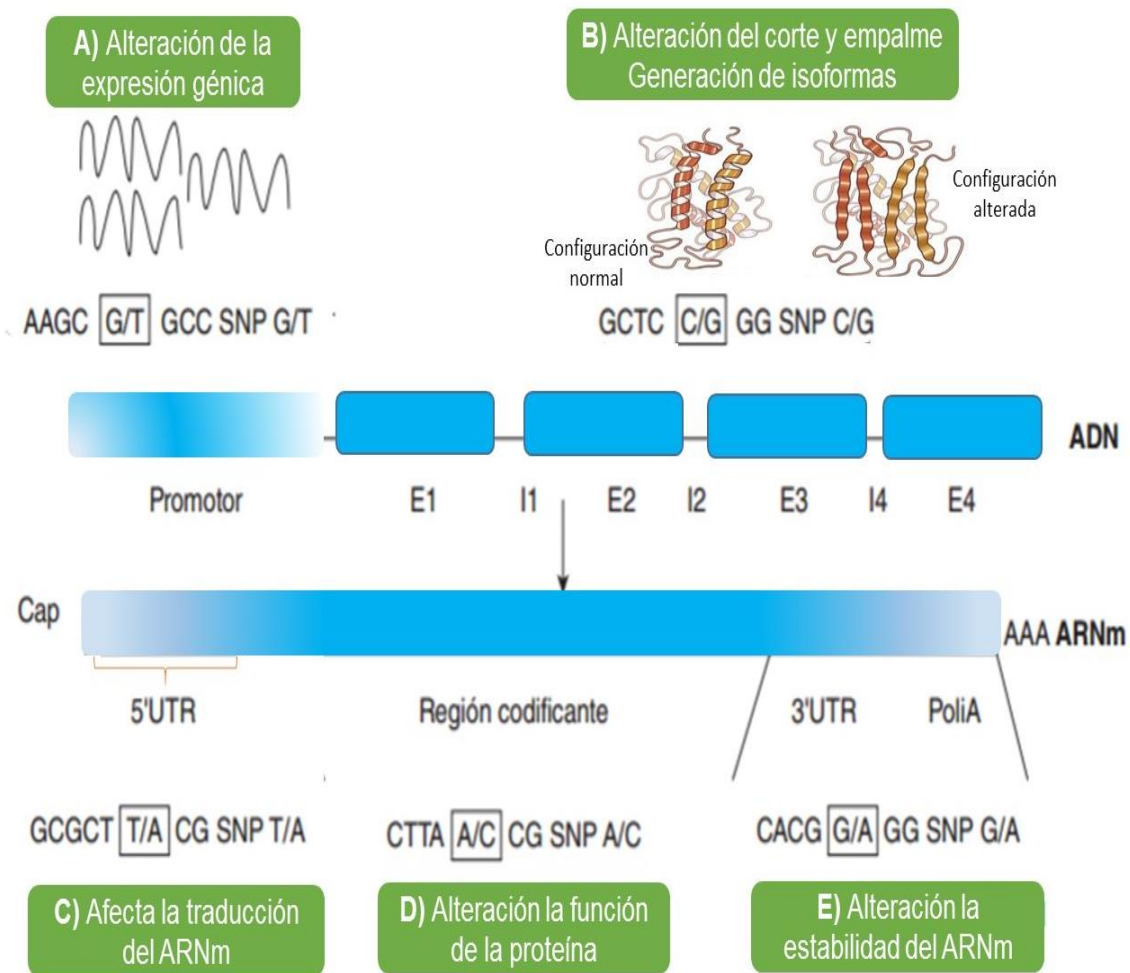


FIGURA 3. Efecto funcional de SNPs. Los rSNPs localizados en el promotor afectan los niveles de expresión (A), mientras, los srSNPs localizados en la estructura de los ARNm afectan al corte y empalme si se encuentran en los intrones-exones (B), la traducción del ARNm a proteínas, (C) si se encuentran en la región 5'UTR, y aunque existen pocos reportes se ha observado que SNPs funcionales ubicados en regiones codificantes y que no cambian aminoácidos tienen un papel importante en la función de la proteína (D); finalmente, SNPs ubicados en la región 3'UTR afectan la estructura y estabilidad del ARNm (E). UTR: región no traducida; E: exón; I: intrón; AUG: sitio de inicio de la traducción; UAG: codón de paro. Imagen y texto tomados de Ramírez-Bello *et al.*, 2013.

De acuerdo con su importancia funcional y localización, se han dividido en rSNPs (SNPs reguladores), srSNPs (SNPs RNA estructurales) y cSNPs (SNPs codificantes) (Figura 3). Los rSNPs se encuentran tanto en las regiones promotoras de genes que sintetizan proteínas, como de genes no codificantes de proteínas y afectan los niveles de expresión génica. Los srSNPs se encuentran tanto en ARNm primarios como en secundarios, incluyendo regiones no traducidas (5'UTR y 3'UTR), intrónicas y codificantes, llegando a afectar la estructura y función de los ARNs, la estabilidad de los ARNm, la poliadenilación de los ARNm, el corte y empalme, la regulación de la traducción de los ARNm a proteínas, la funcionalidad de las proteínas, entre otros procesos biológicos normales de las células-tejidos. Finalmente, los cSNPs se encuentran en exones y se subdividen en sinónimos (si el cambio de nucleótido no cambia aminoácido) y no sinónimos (si el cambio de nucleótido cambia un aminoácido) (Ramírez-Bello *et al.*, 2013).

1.9 Identificación de SNPs en enfermedades multifactoriales.

Existen múltiples herramientas para el análisis de polimorfismos y mutaciones asociadas con enfermedades multifactoriales, estas incluyen la técnica de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), microarreglos de DNA, PCR en tiempo real con sondas de TaqMan® y la secuenciación automática, siendo las últimas dos las de mayor empleo para el análisis de polimorfismos y mutaciones en pacientes con AR (Jiménez-Morales y Sanchez-Brena, 2016).

1.9.1 PCR de tiempo real con sondas TaqMan®

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación exponencial de una molécula de ADN, generando millones de copias de un fragmento. Esto se lleva a cabo con oligonucleótidos o *primers* que son complementario con la cadena molde de ADN. Los *primers* funcionan como punto de inicio para la adición de nucleótidos y para copiar la cadena molde en la PCR. Una vez que el *primer* se une a su blanco, la polimerasa de ADN puede seguir extendiendo la hebra complementaria. En una reacción típica de PCR se usan dos *primers* que flanquean la región de ADN que se desea amplificar. Es una técnica que posee múltiples aplicaciones y por ende existen diferentes tipos de PCR (Griffin y Griffin, 1993; Li *et al.*, 2017).

Algunas variantes de esta técnica como la PCR en tiempo real emplea sondas TaqMan® que permiten la genotipificación de SNPs bialélicos. Esta estrategia se basa en el uso de dos sondas que hibrida con su secuencia de ADN complementaria de manera altamente específica (100%). Las sondas son oligonucleótidos de 13 a 18 *pb* marcados con un fluorocromo: FAM o VIC (uno para cada alelo) en su extremo 5' y con una molécula inhibidora de fluorescencia o *quencher* en el extremo 3'.

Durante la PCR, en la fase de hibridación de *primers*, las sondas hibridan con sus secuencias 100% complementarias e inician la replicación del DNA. En la etapa de extensión por su actividad de exonucleasa, la *taq* polimerasa degrada la sonda, liberando así la fluorescencia de VIC o FAM. Las diferentes longitudes de onda que emiten los fluoróforos (FAM: 518 *nm* y VIC: 554 *nm*) permiten identificar los alelos presentes en la muestra de ADN analizado (Jiménez-Morales y Sánchez-Brena, 2016).

1.9.2 Secuenciación automática o capilar

La secuenciación capilar es otra herramienta molecular que permite identificar cambios de una sola base o pequeñas inserciones o deleciones (indels) y se basa en el método de Sanger. En este método se basa en la capacidad de la DNA polimerasa para generar cadenas de diferentes tamaños de ADN complementario a una cadena patrón, los fragmentos se pueden distinguir entre sí por la incorporación de nucleótidos específicos modificados (ddNTP: dideoxinucleótido) y marcados con un fluorocromo. Estos ddNTP son nucleótidos que carecen de un grupo hidroxilo en su extremo 3', por lo que al incorporarse a la cadena naciente se detiene el proceso de amplificación (Jiménez-Morales y Sánchez-Brena, 2016). El método de Sanger (1977) consiste en realizar cuatro reacciones diferentes de síntesis de ADN, para lo cual se utiliza un ddNTP distinto en cada tubo. Con la mezcla del nucleótido normal (dideoxinucleótidos: dNTP) y el ddNTP, se generan fragmentos complementarios de diferentes tamaños, que terminan en el mismo nucleótido. Mientras tanto, la secuenciación capilar combina 4 dNTPs en una única reacción de elongación, pero marcando a cada ddNTP con un fluorocromo específico. Las moléculas resultantes de la reacción se separan por tamaños mediante un capilar (Jiménez-Morales y Sánchez-Brena, 2016).

1.10 Estrategias para la identificación de genes asociados con AR

En AR como en otras entidades complejas, existen diversos abordajes de estudio para la identificación de regiones y genes que confieren susceptibilidad o gravedad a estos padecimientos, entre ellos están los estudios de ligamiento y los de asociación.

1.10.1 Estudios de ligamiento

Los estudios de ligamiento tienen como objetivo identificar regiones cromosómicas que predisponen o son causa del desarrollo de una enfermedad. En estos, se analizan dos o más marcadores genéticos polimórficos y se evalúa su cosegregación con la enfermedad (marcadores heredados junto con la enfermedad) en familias con pedigríes extensos o pares de hermanos afectados. En los estudios de ligamiento, la cosegregación de un marcador con la enfermedad podría ser indicador de que este marcador se encuentra dentro o aledaño al gen responsable de la AR o de la susceptibilidad a padecerla. Aunque los estudios de ligamiento han aportado gran cantidad de información y permitido identificar genes nuevos ligados a una entidad, la dificultad inherente a la obtención de un gran número de familias con más de un individuo afectado, el patrón complejo de la herencia de la AR y el efecto pequeño de cada factor genético involucrado en la enfermedad, han sido limitantes importantes para el uso de esta estrategia en la identificación de genes relacionados con esta entidad autoinmune.

Tras la identificación de regiones cromosómicas putativas ligadas a AR, son necesarios los análisis más finos de la región que cosegrega con la enfermedad para así poder identificar a las variantes y a los genes responsables de la misma (Mathew, 2001; Cirulli, 2016).

1.10.2 Estudios de asociación genética

Los estudios de asociación resultan útiles para explicar el componente genético involucrado en el desarrollo de enfermedades multifactoriales. Estos estudios se dividen a su vez en: casos-contróles, y los basados en familias. Igualmente,

pueden abordarse desde una perspectiva de gen candidato o de escaneo amplio del genoma (GWAS, siglas en inglés derivadas de *wide genome association study*) (Bush *et al.*, 2016).

1.10.3 Estudios de asociación caso-control

En los estudios caso-control, los casos son individuos afectados y los controles son individuos sanos, ambos grupos son de individuos no relacionados. Los controles, por su parte no deben de tener antecedentes hereditarios de AR ni de ninguna otra EA. El objetivo de este tipo de estudio es comparar frecuencias alélicas y genotípicas de la variante estudiada (uno o varios SNPs del gen candidato), y entonces observar si existe una diferencia estadística entre los grupos (Iniesta *et al.*, 2005; Sevilla, 2007). Si la variante es más común en los casos que en los controles, decimos que la variante está asociada con susceptibilidad; si es más común en controles que en individuos afectados, entonces confiere protección (Sevilla, 2007; Ramírez-Bello *et al.*, 2011).

Esta estrategia presenta limitaciones como la posibilidad de establecer falsas asociaciones por estratificación de la población (poblaciones con apareamiento no azaroso o endogámico), por lo que la muestra puede no ser representativa de la población general o por el desequilibrio de ligamiento (LD, por sus siglas en inglés). EL LD puede ser dado principalmente por una baja tasa de recombinación u origen reciente de las poblaciones. Una alternativa para eliminar estas desventajas es el análisis de marcadores de ancestría (AIMs, por sus siglas en inglés). Los AIMs permiten aparear el grupo de casos y controles de acuerdo con su origen étnico (Santangelo, Gonzalez-Andrade *et al.* 2017)

1.10.4 Estudios de asociación basados en familias

En este análisis se emplea la prueba de desequilibrio de transmisión (TDT). Para aplicarla se requiere el análisis de tríos, donde se incluye al paciente y a sus padres. En el análisis se compara la frecuencia con la que los padres heterocigotos transmiten un alelo específico de un marcador genético (por ejemplo, tipo SNP) al hijo afectado; si uno de los alelos se transmite con mayor frecuencia a los hijos afectados, entonces se sugiere que este alelo está asociado con la enfermedad (Mathew, 2001; Ramírez-Bello *et al.*, 2011).

1.10.5 Estudios de gen candidato

Los estudios de caso-control y los basados en familias (TDT) generalmente analizan genes candidatos. Éstos, son genes que participan en la fisiopatología de AR, genes que tienen reportes de que polimorfismo en ellos están asociados a la enfermedad o genes que en modelos animales han dado evidencia de que contribuyen al desarrollo de esta enfermedad autoinmune o sus fenotipos relacionados (Cordell y Clayton, 2005; Ramírez-Bello *et al.*, 2011). El abordaje de genes candidatos es la estrategia de elección en el estudio de asociación de enfermedades multifactoriales porque son más económicos y no se requieren de muchas muestras (Bush *et al.*, 2016).

➤ Causas de asociación de los SNPs

Los estudios de asociación pueden presentar una asociación directa o indirecta (desequilibrio de ligamiento o estratificación poblacional). Se dice que el SNP tiene una asociación directa cuando la variante asociada (susceptibilidad o protección)

tiene una participación directa desde el punto de vista funcional en la regulación del gen, síntesis de la proteína, regulación de la maduración, por corte y estabilidad del RNAm, etc. (Ramírez-Bello *et al.*, 2011).

La asociación indirecta se presenta cuando la variante asociada a AR está en LD con la verdadera variante funcional. Asimismo, se pueden dar falsas asociaciones entre un marcador genético y la enfermedad, debido a estratificación poblacional (comparación de grupos con un componente ancestral diferente entre ellos) (Cordell y Clayton, 2005; Ramírez-Bello *et al.*, 2011).

Para disminuir los riesgos de estratificación poblacional, se ha propuesto el empleo de marcadores que están distribuidos en todo el genoma y presentan diferentes frecuencias entre las poblaciones; a estos se les denomina marcadores informativos de ancestría (AIM) (Ding *et al.*, 2011). El análisis de entre 40 y 80 AIMS es suficiente para corregir por ancestría en la mayoría de las poblaciones; en poblaciones latinas, incluida la mexicana, se ha reportado que un set de 24 AIMS son útiles (Kosoy *et al.*, 2009).

2. ANTECEDENTES

2.1 Genes asociados con AR

En AR, se sabe que variantes comunes tipo SNPs localizados en genes codificantes y no codificantes de proteínas y que regulan el SI desempeñan un papel determinante en su desarrollo (Ramírez-Bello *et al.*, 2013). Diversos genes han sido asociados con susceptibilidad y gravedad en AR, a la fecha se han descrito cerca de 16 genes (Tabla 2). Dentro de los más consistentemente

asociados se encuentran el complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II).

2.1.1 Complejo principal de histocompatibilidad clase II

Se sabe que el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), tiene un fuerte impacto en el riesgo genético de las enfermedades reumáticas. Se ha demostrado la presencia de loci genéticos de riesgo asociados con los genes del sistema del antígeno leucocitario humano (HLA) ubicados en la región MHC. Los alelos HLA-DRB1, comparten secuencias de aminoácidos conservadas en las posiciones 67 a 74, de la tercera región híper variable de la cadena β , que recibió el nombre del epítoto compartido (EC) (McInnes and Schett 2007). Múltiples estudios han confirmado la asociación de la AR con alelos del HLA-DR en la mayoría de las etnias (Okada, Kishikawa et al. 2017).

2.1.2 Genes no HLA

Otros genes no HLA que han demostrado una asociación consistente con susceptibilidad y gravedad para AR incluyen a genes relevantes en el proceso inflamatorio y angiogénico, por ejemplo: *PTPN22*, *CTLA4* (Plenge et al., 2005), *STAT4* (Lee et al., 2010), *PADI4* (Burr et al., 2005; Takata et al., 2008), *TNFAIP3-OLiG3* (Orozco et al., 2009) y *TRAF1/C5* (Plenge et al., 2007), y otros (Tabla 2). Cabe mencionar, que los estudios de asociación realizados en población mexicana con AR han revelado similitudes y diferencias en los factores genéticos de riesgo para esta entidad con relación a otros grupos étnicos. Por su papel en la fisiopatología de la AR *VEGF* ha sido también investigado, pero su asociación con AR ha generado resultados controversiales (Rodriguez-Elias et al., 2016).

TABLA 2. Genes que han mostrado asociación con susceptibilidad y protección para AR (Rodríguez-Elias et al., 2016).

Gen	Localización	SNP	OR	Valor de p
<i>HLA-DRB1</i>	6p21.3	rs6910071	2.88	1.0 x 10 ⁻²⁹⁹
<i>PTPN22</i>	1p13.3-13.1	R620W	1.91	9.1 x 10 ⁻⁷⁴
<i>PADI4</i>	1p36	rs2240340	1.14	7.5 x 10 ⁻⁵
		rs10818488	1.28	1.40 x 10 ⁻⁸
<i>TRAF1-C5</i>	9q33-34	4 rs3761847	1.13	0.001
		rs3087243	0.44	1 x 10 ⁻⁸
<i>CTLA4</i>	2q33	rs231775	1.16	0.002
<i>STAT 4</i>	2q32.2	rs7574865	1.32	7.2 x 10 ⁻¹⁰
		rs13426947	1.15	7.2 x 10 ⁻¹⁰
		rs2004640	1.14	0.003
<i>IRF5</i>	7q32	rs10488631	1.19	1.2 x 10 ⁻⁶
		rs2004640	1.14	0.003
<i>FCRL3</i>	1q21-23	rs7528684	1.10	0.002
<i>TNFAIP3</i>	6q32	rs6920220	1.22	1 x 10 ⁻⁹
		rs10499194	1.25	6.7 x 10 ⁻⁴
<i>TNF-α</i>	6p21	-308G/A	1.62	3.6 x 10 ⁻⁵
<i>miR-499</i>	20q11.22	rs3746444	1.62	0.001
<i>CD28</i>	2q33	rs1980422	1.11	1.3 x 10 ⁻⁹
<i>CD40</i>	20q12-q13.2	rs4810485	0.87	8.2 x 10 ⁻⁹
<i>FCGR3A</i>	1q23	158V/F	1.25	5 0.01
<i>TYK2</i>	19p13.2	rs34536443	0.62	2.3 x 10 ⁻¹⁴
<i>IRAK1</i>	Xq28	rs13397	1.27	1.2 x 10 ⁻¹²

2.2 VEGF-A

VEGF es una glicoproteína dimérica, la cual regula la inducción de la proliferación y migración de células endoteliales para la formación de nuevos vasos sanguíneos (Ferrara *et al.*, 2003). Hasta el momento se han reportado seis isoformas de *VEGF*, las cuales contienen 121, 145, 165, 183, 189 y 206 residuos de aminoácidos, resultado del complejo procesamiento alternativo del ARNm de este gen. Éstas isoformas difieren tanto en su masa molecular como en sus propiedades biológicas (Ferrara *et al.*, 2003; Cañete, 2004).

La isoforma más estudiada es la constituida por 165 aminoácidos denominada *VEGF-A* o simplemente *VEGF*, está constituida por ocho exones y siete intrones y su producto proteico es una glicoproteína homodimérica de 45 KDa (Ferrara *et al.*, 2003).

La forma activa de *VEGF-A* está compuesta por dos subunidades idénticas. Este homodímero se une en receptores específicos, los cuales presentan actividad tirosin-cinasa (RTK, por *receptor tyrosine kinases*). La modulación de la actividad de *VEGF-A* está dada por la unión a heparina que resulta en una mayor eficiencia de la actividad de cinasa (Martínez-Ezquerro y Herrera, 2006).

La regulación de la expresión de *VEGF-A* se da en múltiples niveles, durante la transcripción, la estabilización de ARNm, el corte y empalme, la traducción y la localización celular diferencial de varias isoformas. *VEGF-A* tiene en su región promotora una secuencia TATA-less (P1) que incluye sitios consenso de unión para factores de transcripción y presenta un segundo promotor interno (PI), el cual dirige la transcripción de uno de los ARNm truncados (Bastide *et al.*, 2008).

La secuencia codificante está flanqueada por la región 5'UTR, la cual abarca 1038 nucleótidos y contiene tres codones de inicio CUG alternos y dos sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) A y B, ambos regulan el inicio de la traducción. La traducción iniciada en el codón CUG genera una isoforma larga de VEGF (VEGF-L), la cual contiene 205 residuos de aminoácidos más comparado con las formas sintetizadas a partir del codón de inicio AUG (Figura 5) (Bastide *et al.*, 2008).

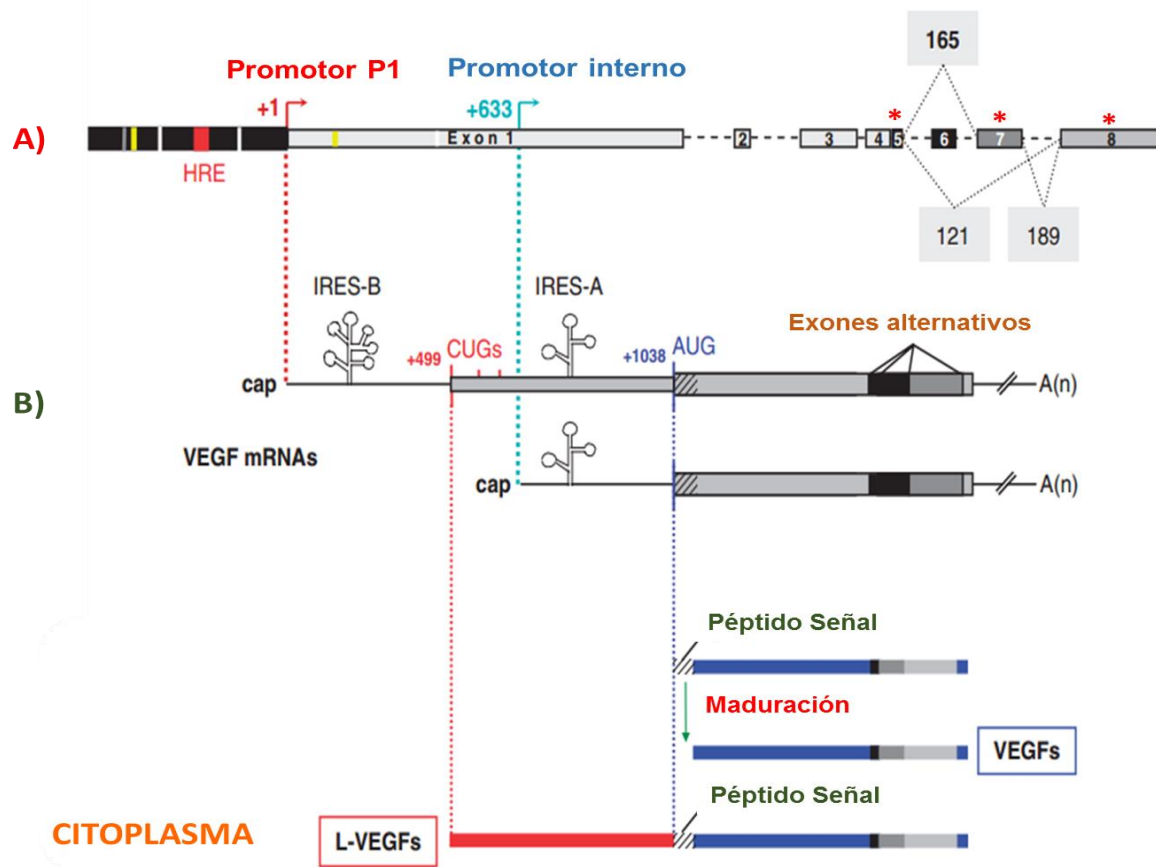


FIGURA 2. Estructura genética de VEGF y del ARNm. **A)** Estructura del gen: P1, representa la región promotora TATA-less que incluye elementos sensible a hipoxia; otro sitio de inicio del promotor dirige la transcripción de un ARNm truncado. Tres exones (5,7 y 8) codificantes se unen alternativamente y dan lugar a varios polipéptidos, siendo las más abundantes las isoformas de 121, 165 y 189 aminoácidos. **B)** Estructura del ARNm: Los 1038 nucleótidos del 5' UTR, río arriba del codón de inicio AUG contienen dos IRES (A y B), los cuales regulan el inicio de la síntesis proteica. El codón CUG origina la expresión de VEGF-L. Imagen y texto tomados de Bastide *et al.*, 2008.

Posteriormente VEGF-L se escinde proteolíticamente por medio una señal peptídica y se convierte en isoformas de menor tamaño (principalmente las isoformas de 121, 165 y 189 aminoácidos), las cuales se secretan al medio extracelular. Aunque no está claro el papel de VEGF-L, se ha sugerido que puede servir como un transcrito largo involucrado en la generación de las isoformas más cortas (Bastide *et al.*, 2008).

2.3 Papel de VEGF-A en AR

Diversos estudios han demostrado que VEGF-A juega un papel importante en el proceso angiogénico y pro-inflamatorio en AR (Ikeda *et al.*, 2000; Ballara *et al.*, 2001; Cañete, 2004; Seung-Ah *et al.*, 2008; Paradowska-Gorycka *et al.*, 2016). En un estudio previo, se encontró que el VEGF-A recombinante aumentó la producción de TNF e IL-6 en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs). Además, se sabe que tanto la proteína VEGF como el ARNm son expresados por macrófagos y fibroblastos sinoviales en el tejido sinovial de pacientes con AR. En cultivos de células sinoviales se ha observado que en condiciones hipóxicas o cuando se estimulan con IL-1, IL-6, IL-17, IL-18, prostaglandina, TGF- β , o por el ligando de CD40, éstas pueden secretar VEGF (Seung-Ah *et al.*, 2008). Adicionalmente, se ha documentado que VEGF-A activa células endoteliales para producir quimiocinas, tales como la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) e IL-8 (Lee *et al.*, 2002).

Por otra parte, los macrófagos producen TNF e IL-6 cuando son estimulados por VEGF-A. TNF e IL-6, potencian la capacidad de los macrófagos y sinoviocitos para secretar VEGF-A; además de estimular las células endoteliales para inducir la

activación de macrófagos mediada por contacto celular, generando de esta manera una retroalimentación positiva (Figura 6) y así servir como un puente funcional entre las células endoteliales y sinoviocitos (Seung-Ah *et al.*, 2008).

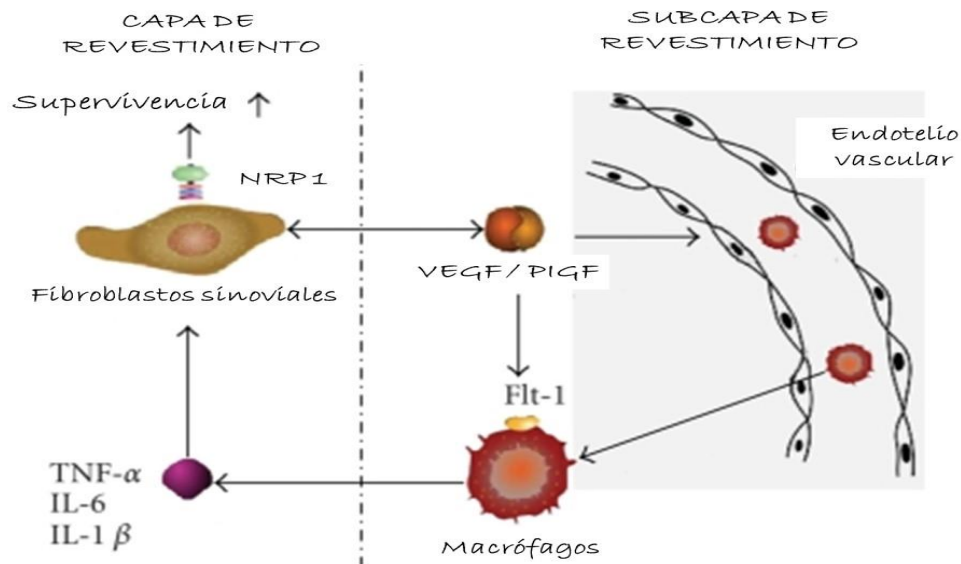


Figura 3. Perpetuación del proceso inflamatorio en AR mediado por VEGF. VEGF, es producido predominantemente por fibroblastos sinoviales, promueve la angiogénesis y estimula la permeabilidad de las células endoteliales vasculares. Los macrófagos son estimulados mediante su unión a VEGF/Flt-1 (Receptor tipo 1 de VEGF) o por contacto celular con células endoteliales activadas, produciendo TNF e IL-6, estas citocinas amplifican la capacidad de los macrófagos y sinoviocitos para secretar VEGF, creando un ciclo de auto-perpetuación inflamatoria. Mientras tanto, VEGF unido a NRP1 impide que los sinoviocitos sean sometidos a apoptosis, lo que conduce a la hiperplasia sinovial. Los sinoviocitos hiperplásicos, a su vez, aumentan la secreción de VEGF y al hacerlo, generan un ciclo de retroalimentación positiva que promueve la supervivencia de las células proinflamatorias. Imagen y texto tomados de Seung-Ah *et al.*, 2008.

Diversos estudios han reportado niveles elevados de algunas isoformas de *VEGF* en el tejido y líquido sinovial, así como en suero de pacientes con AR (Cañete, 2004; Seung-Ah *et al.*, 2008). También se ha observado altos niveles de *VEGF-A* en el fluido sinovial de pacientes con AR en comparación con los casos de osteoartritis. Los niveles de *VEGF-A* se han asociado con actividad de la AR,

particularmente durante el proceso inflamatorio de las articulaciones; así como con erosiones óseas al año de seguimiento. De hecho, la expresión anormal de *VEGF-A*, se ha propuesto como marcador de mal pronóstico y como blanco terapéutico en el tratamiento de la AR (Ballara *et al.*, 2001; Seung-Ah *et al.*, 2008).

En ratones *knockout* para *VEGF* se ha observado una disminución de la patología y del proceso angiogénico, por lo que se sugiere que la inhibición de *VEGF-A* está relacionado con la supresión del proceso inflamatorio en AR (Mould *et al.*, 2003; Seung-Ah *et al.*, 2008).

2.3.1 Expresión y función de receptores de *VEGF-A* en AR

Los miembros de la familia VEGF realizan su función en las células diana a través de tres receptores con actividad tirosina quinasa: a) VEGFR1 o Flt-1; b) VEGFR2 o KDR y c) VEGFR3 o FLT-4, se localizan en células endoteliales y en otros tipos celulares (Figura 7). La neuropilina 1 (NP-1), es un correceptor de *VEGF-A*; una interacción que regula la angiogénesis dependiente de VEGFR2 (Seung-Ah *et al.*, 2008; Lohela *et al.*, 2009).

VEGF-A se une a los receptores VEGFR1 y VEGFR2 (Figura 7). Ambos receptores se expresan en la mayoría de las células endoteliales vasculares. VEGFR1 está presente en monocitos/macrófagos y participa en la activación de estas células. VEGFR2, a su vez es un mediador primario de la proliferación de células endoteliales en respuesta a *VEGF-A* (Luttun *et al.*, 2002; Autiero *et al.*, 2003; Kowanetz y Ferrara, 2006). La señalización de VEGF a través de VEGFR-2 es la principal vía involucrada en la activación de la angiogénesis.

Además, aumenta la permeabilidad endotelial e induce la proliferación, supervivencia, desarrollo y migración de células endoteliales (Lohela *et al.*, 2009).

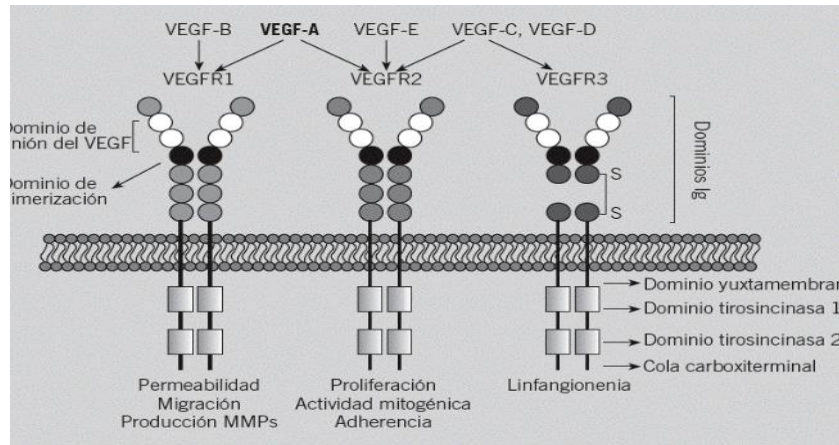


FIGURA 4. Estructura y funciones de los receptores de VEGF. Las distintas isoformas del VEGF se unen en receptores específicos para mediar diversos eventos biológicos. Los receptores del VEGF constan principalmente de 7 dominios de inmunoglobulina (Ig) extracelulares, un dominio transmembrana, un dominio yuxtamembrana, 2 dominios tirosin-cinasa y la región carboxiterminal. Cuando el ligando se une a su receptor, éstos se dimerizan y fosforilan, por lo que transducen la señal hacia el interior de la célula. VEGFR1 se expresa en células endoteliales y monocitos y regula la migración, permeabilidad celular y producción de metaloproteasas. Por su parte, VEGFR2 regula las actividades proliferativas, mitogénicas y la adherencia vascular. El VEGFR3 interviene en la linfangiogenia. TF: factor tisular. Imagen y texto tomados de Barbarroja *et al.*, 2008.

La unión de VEGF-A / VEGFR-2 provoca la dimerización del receptor y su autofosforilación en varios residuos de tirosin quinasa. Así mismo, la interacción de VEGF-A / VEGFR2 induce la expresión de la MMP-2 e integrina $\alpha\beta3$, las cuales participan en la degradación de la membrana, y por lo tanto en la migración endotelial a través de la matriz extracelular para formar nuevos vasos (McInnes y Schett, 2007; Seung-Ah *et al.*, 2008).

La interacción entre VEGFR-1 y VEGFA estimula la producción de citocinas, tales como TNF, IL-6, MCP-1 e IL-8, las cuales son esenciales en la perpetuación de la

inflamación crónica en las articulaciones (Seung-Ah *et al.*, 2008). Esta interacción también induce la activación de macrófagos, la movilización celular desde la médula ósea a la articulación (McInnes y Schett, 2011).

Se ha registrado que NP-1 es el principal receptor de VEGF-A en sinoviocitos de pacientes con AR, cuando no se expresa VEGFR-1 ni VEGFR2 y que tiene una expresión elevada en la capa de revestimiento, leucocitos infiltrantes y células endoteliales de la membrana sinovial. Por lo que, NP-1 parece desempeñar un papel crítico en el mantenimiento de la supervivencia de sinoviocitos en AR. Los niveles elevados de expresión de VEGFR-1 también han sido correlacionados con la velocidad de sedimentación de eritrocitos, mismo que es un marcador de AR activa (Seung-Ah *et al.*, 2008).

2.3.2 SNPs en el gen VEGF-A: -2578C/A, -1154G/A y -634G/C

El gen *VEGF-A* es un *locus* altamente polimórfico ya que contiene cientos de SNPs. Algunos estudios han reportado una asociación entre diversos SNPs localizados en la región promotora de *VEGF* con susceptibilidad para desarrollar enfermedades en donde la angiogénesis es crucial en su fisiopatología, incluyendo cáncer, diabetes, preclamsia, AR, etc. (Awata *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2003; Luizon *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). Los tres SNPs de *VEGF-A* mejor estudiados se localizan en la región promotora y son: -1154G/A (rs1570360), -2578 C/A (rs699947) y -634 G/C (rs2010963) (Han *et al.*, 2004; Nam *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2012; Paradowska-Gorycka *et al.*, 2016).

En un estudio *in vitro* realizado para evaluar la producción de VEGF-A empleando como modelo de estudio la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7, se

observó que la presencia de los SNPs -1154G/A y -634G/C aumenta la actividad del promotor un 71% (Stevens *et al.*, 2003). En cáncer de próstata se ha observado que el alelo A del SNP -1154 G/A confiere protección para la enfermedad y el genotipo AA se asocia con una disminución en los niveles de expresión del gen. Así mismo, aunado al polimorfismo -634G/C, los SNPs -2578G/A y -1154G/A de *VEG-A* también se han asociado con los niveles circulantes de su proteína y con la actividad de la enfermedad. Recientemente, también se reportó que los SNPs -1154 G/A y -2578C/A están asociados con susceptibilidad para desarrollar AR (Paradowska-Gorycka *et al.*, 2016).

La relación entre los SNPs de *VEGF-A* y la susceptibilidad a desarrollar AR se ha documentado en diversas poblaciones, incluyendo la coreana (Han *et al.*, 2004), China (Zhang *et al.*, 2013) y rusa (Konenkov *et al.*, 2013), así como en población inglesa, donde solo la variante -2578C/A mostró asociación con la actividad de la enfermedad y los niveles de VEGF-A en suero (Chen *et al.*, 2012). Sin embargo, en la población española ninguno de los tres SNPs mostro asociación con susceptibilidad a AR (Rueda *et al.*, 2005; Rodriguez-Rodriguez *et al.*, 2011).

Dado que los resultados de asociación entre los SNPs -2578C/A, -1154G/A y -634G/C de *VEGF-A* y AR son controversiales y al no existir información sobre su papel en la susceptibilidad a AR en pacientes Mexicanos, realizamos un estudio de asociación caso-control donde se incluyeron 364 casos con AR y 323 controles atendidos en el Hospital Juárez de México.

3. JUSTIFICACIÓN

La AR representa la enfermedad reumática autoinmune más prevalente en adultos en las diversas poblaciones, cuyo diagnóstico y tratamiento tardío ocasiona incapacidad del paciente, afecta su calidad de vida y puede influir en su sobrevivencia. De hecho, AR constituye una importante causa de mortalidad por infartos. Por lo anterior, y dado que es una enfermedad crónica, su atención tiene un elevado costo socioeconómico tanto para las familias como para el país.

Aunque la etiología de la enfermedad aún no se conoce completamente, es claro que el factor genético juega un papel fundamental en la susceptibilidad para desarrollarla. Aún más, se ha demostrado que algunos de estos factores se asocian con gravedad de la enfermedad o tienen importantes implicaciones en la gravedad y en la respuesta terapéutica.

Por su función en la angiogénesis, *VEGF-A* es un gen candidato para evaluarse en AR, ya que los pacientes con esta enfermedad tienen aumentado el proceso angiogénico en la membrana sinovial. De esta manera, conocer del papel que juegan los polimorfismos localizados en la región promotora del gen *VEGF-A* con susceptibilidad y gravedad en AR en la población mexicana, puede contribuir al entendimiento de su etiología y en un futuro posiblemente pueda ayudar en la identificación de nuevos blancos terapéuticos.

4. HIPÓTESIS

Los SNPs -2578G/A, -1154G/A y -634G/C de *VEGF-A* se encuentran asociados con susceptibilidad y gravedad en pacientes con artritis reumatoide.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar si los SNPs -2578G/A, -1154G/A y -634G/C del gen *VEGF-A* están asociados con susceptibilidad y gravedad en una muestra de pacientes mexicanos con artritis reumatoide.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Conocer la frecuencia de los alelos y genotipos de los polimorfismos -2578G/A, -1154G/A y -634G/C del gen *VEGF-A* en una muestra de individuos mexicanos.
- Determinar si los SNPs -2578G/A, -1154G/A y -634G/C del gen *VEGF-A* se asocian con susceptibilidad para padecer AR.
- Determinar si haplotipos formados por los SNPs -2578G/A, -1154G/A y -634G/C del gen *VEGF-A* confieren riesgo a padecer AR.

7. MATERIAL Y MÉTODO

7.1 Población de estudio

Se recolectaron 364 pacientes con AR y 323 individuos sanos y sin antecedentes de AR. La relación mujer: hombre, tanto en casos como controles fue de 9:1, respectivamente. Todos los participantes fueron mexicanos, atendidos en el Hospital Juárez de México (SSA) y en el Hospital Regional Adolfo López Mateos (ISSSTE). El protocolo se realizó bajo la aprobación de los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad de cada Hospital.

➤ **Criterios de inclusión de los casos.**

El diagnóstico de AR se estableció tomando en cuenta los criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología 2010 y de la Liga Europea Contra el Reumatismo. Pacientes que se auto reconocieron como mexicanos y de padres y abuelos mexicanos. Los pacientes firmaron la carta de consentimiento informado.

➤ **Criterios de exclusión de los casos**

Se excluyeron todos los pacientes positivos para el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), así como para el Virus de Hepatitis B y C (VHB-C) (por razones de seguridad).

A todos aquellos pacientes que fueron transfundidos en las últimas 4 semanas.

➤ **Criterios de eliminación de los casos**

Las muestras de pacientes cuya calidad e integridad no fue la adecuada para el estudio.

A todos los pacientes que decidieron retirarse del protocolo.

➤ **Criterios de inclusión de los controles**

Individuos que no tuvieron antecedentes de enfermedades crónicas inflamatorias, alérgicas, hipertensión, aterosclerosis, asma, infarto agudo al miocardio, tumores líquidos-sólidos, diabetes tipo 2, etc.

Fueron mayores de 40 años y menores de 65, no importando el género (aunque principalmente se captaron mujeres).

Individuos que firmaron la carta de consentimiento informado.

➤ **Criterios de exclusión de los controles**

- Controles positivos para el VIH, así como para VHB-C (por razones de seguridad). Individuos que fueron transfundidos en las últimas 4 semanas.

➤ **Criterios de eliminación de los controles**

- Las muestras de controles cuya calidad e integridad no fue la adecuada para el estudio.
- A todos los controles que decidieron retirarse del protocolo.

7.2 Recolección de muestras

Los médicos Reumatólogos informaron a cada paciente sobre los objetivos del protocolo, una vez que aceptaron participar en el proyecto, se procedió a firmar la carta de consentimiento informado. Posteriormente, de cada participante se tomaron 5 ml de sangre periférica (por punción venosa) en tubos con EDTA como anticoagulante. Por otro lado, las muestras sanguíneas de los controles fueron tomadas de los servicios de Banco de Sangre del Hospital Juárez de México con previa firma de consentimiento informado.

7.3 Extracción del DNA genómico para la extracción del DNA

- Los tubos fueron centrifugados a 2,700 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 10 minutos para realizar la separación de plasma, leucocitos y eritrocitos.
- Se realizó la extracción del ADN a partir de los leucocitos con el kit Stratec Universal kit (STRATEC Biomedical AG, Germany) siguiendo las indicaciones del fabricante.
- Se tomó la capa de leucocitos y se transfirió a un tubo estéril de 50 mL, se colocaron 15 mL de buffer de lisis de eritrocitos (EL), se agitó en vórtex por 30 s y se incubó en hielo por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 15 min y se eliminó el sobrenadante por decantación. Para eliminar a todos los eritrocitos, se realizó un segundo lavado con buffer EL (7.5 ml), con una agitación previa para disolver el paquete celular y romper los eritrocitos presentes. Después de la centrifugar a 3000 rpm por 15 min, se eliminó el

sobrenadante, dejando en el tubo 500ul de buffer para disolver el paquete celular. . Enseguida, se procedió a colocar 30 μ l de proteinasa K con 3 ml de buffer de lisis (HL), se agitó durante 1 minuto y se incubó durante 10 minutos a 60 °C en un baño maría.

- A continuación se colocaron 3 ml de buffer de precipitación y se homogenizó perfectamente, se centrifugó la muestra a 4700 rpm. / 8 minutos, se retiró el sobrenadante con pipeta automática.
- Para la precipitación, se agregaron 3 ml de alcohol al 70%, la mezcla se agitó en vórtex, se centrifugó a 4700 rpm. / 7 minutos y se decantó sin tirar la pastilla formada.
- Se dejó secar el DNA (pastilla) por 30 minutos, se agregaron 600 μ l de buffer U e incubó durante 10 minutos a 60 °C, con agitación constante.
- El DNA se cuantificó en el equipo NanoDrop 1000-ND. Las muestras que presentaron valores de 260/280 nm iguales o mayores a 1.8 fueron considerados para el estudio
- Posteriormente, se realizaron diluciones de cada una de las muestras en una concentración final de 5 ng/ μ L (concentración adecuada para la genotipificación de cada polimorfismo).
- Las muestras fueron distribuidas en placas de 96 pozos separando los casos (n=364) y controles (n=323). En cada pozo se agregó una muestra de 3 μ L de DNA (15 ng totales) y se almacenó hasta su uso. La localización de las muestras siempre fue la misma para cada una de las placas.

7.4 Discriminación alélica, técnica de 5' exonucleasa (TaqMan)

La discriminación de los dos alelos de cada SNP de *VEGF-A* fueron evaluados mediante el uso de sondas TaqMan (Tabla 3) y con la técnica de 5' exonucleasa (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

TABLA 3. Características de los SNPs de *VEGF-A* analizados en este estudio.

Posición del SNP en el gen	ID de SNP (Rs)	Región en el gen	Secuencia
-2578 C/A	rs699947	Promotor	AGCTGTAGGCCAGACCCTGGCA[A/C]GATCT
-1154 G/A	rs1570360	Promotor	CCCGAGCCGCGTGTGGA[A/G]GGGCTGAGG
-634 G/C	rs2010963	Promotor	GCGGGCGTGCGAGCAGCGAAAG[C/G]GACA

Esta herramienta emplea sondas fluorescentes para el análisis de cada alelo de los SNPs; cada sonda es específica para un alelo. Las sondas sólo hibridan con la secuencia blanco si existe complementariedad perfecta de nucleótidos. Así, la sonda 100% complementaria a su secuencia blanco (donde se localiza el alelo del SNP a evaluarse) se une de manera específica a ella. Al inicio de la reacción de amplificación, se unen primero las sondas debido a su T_m mayor en comparación con el par de primers que iniciarán la reacción de amplificación de la región que rodea al SNP. Una vez unidos los primers y la sonda, la *ampliTaq Gold* inicia con la replicación del DNA y al llegar a la región de la sonda, la *ampliTaq Gold* (por su actividad DNA exonucleasa comienza degradar la sonda, liberando así la fluorescencia de VIC o FAM según sea el caso. La fluorescencia es leída con un scanner del equipo CFX96 Real Time Systems de BioRad.

7.4.1 Preparación de la master mix

- Se realizó una mezcla de reacción para cada muestra, la cual contenía: 2.435 μ l de agua libre de DNAsas; 0.065 μ l de sondas para cada SNP y el par de primer; así como 2.5 μ l del mix que contiene DNA polimerasa ampliTaq Gold, Mg₂Cl, dNTPs y buffer.
- Posteriormente, se agregaron 5 μ l de mezcla de reacción en cada pozo de las placas.
- Se colocaron las placas en el equipo de tiempo real, bajo el siguiente programa:
- Pre-PCR: 1 ciclo: 2 min a 50°C (temperatura a la cual se retira el anticuerpo unido a la enzima) y 10 min a 95 °C
- PCR: 40 ciclos: 15 seg a 95 °C y 1 min a 60°C
- Post-PCR: infinito a 4°C
- Una vez finalizado los ciclos de PCR se procedió a leer la fluorescencia emitida empleándose el software BioRad CFX96 manager.

7.5 Validación de los SNPs de VEGF-A mediante secuenciación

La genotipificación de los 3 SNPs de *VEGF-A* mediante sondas TaqMan fue validada mediante secuenciación automática en muestras con genotipos conocidos. Para esto, inicialmente se estandarizaron las condiciones de PCR con un par de oligos específicos para cada una de las regiones donde se localizaban los SNPs (Tabla 4). Posteriormente, se observó el producto de PCR en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (Figura 8), se purificaron los productos de PCR y posteriormente con el kit BigDye Terminator de Applied Biosystems se analizó la secuencia de cada nucleótido. El procedimiento se muestra a continuación.

TABLA 4. Diseño de oligos para el análisis de los SNPs evaluados

SNP	Id Oligo	Secuencia 5'→3'	Tm	Longitud del amplicón
-634G/C	P1 Foward	5'GAGCTCCAGAGAGAAGTCGAGG3'	62 °C	190 bp
	P1 Reverse	5'GGTGTCTGTCTGTCTGTCCGTC3'		
-1154G/A	P2 Foward	5'GGCGGATGGGTAATTTTCAGG3'	61 °C	350 bp
	P2 Reverse	5'CGCTGACCGGTCCACCTA3'		
-2578C/A	P3 Foward	5'GAGCGTTTTGGTTAAATTGAGG3'	61 °C	289 bp
	P3 Reverse	5'TTCCTCCAACCTCTCCACATCTT3'		

Tm: temperatura de alineación

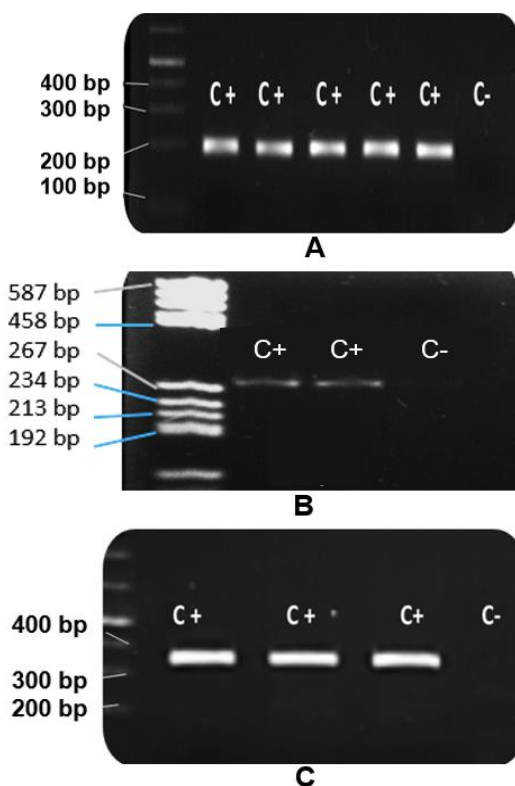


FIGURA 8. Visualización de los productos obtenidos, tras la estandarización de las condiciones de PCR para cada una de los tres SNPs. Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. **A) SNP -634G/C.** Se analizaron 6 muestras de las cuales cinco contenían DNA de pacientes diagnosticados con AR (C+) y 1 muestra cuyo volumen de DNA fue sustituido por agua (C-). En el primer pozo se empleó un marcador de tamaño molecular para determinar el tamaño de los amplicones (190 bp). **B) SNP -2578C/A.** Se emplearon 3 muestras, las dos primeras contenían DNA de pacientes con AR (C+) y la última carecía de material genético (C-); mediante un marcador de tamaño molecular de determinó el tamaño de los amplicones (289 bp). **C) SNP -1154G/A.** En el primer carril se colocó un marcador de peso molecular para determinar el tamaño de las cuatro muestras: tres pacientes (C+) y un control negativo (C-). El tamaño de los amplicones analizados fue de 350 bp.

- Para la reacción de PCR se emplearon 60 ng/μl de DNA genómico, Mg₂Cl 2.5 μl, buffer 2.5 μl, dNTPs 0.4 μl, primer forward 0,2 μl, primer reverse 0.2 μl, DMSO 1.0 μl, agua 15.09 μl, AmpliTaq Gold 0.11 μl). Las condiciones de PCR incluyeron un ciclo de 2 min a 50°C y 10 min a 95 °C;
- 35 ciclos de 35 segundos a 94°C (desnaturalización del DNA), 30 segundos a 58°C (alineación de primers al DNA) y 35 segundos a 72°C (extensión) y un ciclo de 5 minutos a 72°C como extensión final del templado.
- Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Las bandas de DNA fueron visualizadas con un transiluminador de Applied Biosystem. Después, se cuantificó el producto y se registró el nivel de pureza de las muestras.

7.5.1 Purificación de los productos de PCR

- Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit Quiagen bajo las especificaciones del proveedor (QIAquick Spin Handbook):
- Se agregaron 5 volúmenes (200 μl) de buffer PB a un volumen de 40 μl del producto de PCR. Las muestras se transfirieron en una columna de purificación QIAquick, la cual se encontró colocada en un tubo eppendorf de 2 ml. Posteriormente se incubó durante 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 rpm. / 1 min.
- Se decantó el sobrenadante, se volvió a colocar la columna al tubo eppendorf y se agregaron 750 ml de buffer PE. Posteriormente se procedió a centrifugar a 13000 rpm. / 1 min (este procedimiento se realizó 2 veces).

- Se colocó la columna en un tubo nuevo de 2 ml y se agregaron 30 ml de buffer TE1X, se dejó incubar por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó 13000 rpm. / 1 min
- Finalmente, el DNA se cuantificó con el equipo NanoDrop 1000-ND, se realizaron diluciones a 10 ng/ μ l, cantidad requerida para la secuenciación de los amplicones. La secuenciación del ADN se realizó a través de la secuenciación capilar y mediante BigDye Terminator, siguiendo las especificaciones del proveedor (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

7.6 Estimación del tamaño de muestra y poder estadístico del estudio

Para estimar el poder estadístico del estudio se consideró la prevalencia de AR en México (1.6%), así como las frecuencias de los SNPs de interés reportadas en la población mexicana. El programa empleado fue el QUANTO (<http://hydra.usc.edu/gxe>). El tamaño de muestra requerida para alcanzar un poder estadístico del 80% del estudio fue de 320 casos y 320 controles.

7.7 Evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg

El equilibrio de Hardy-Weinberg (E-HW) fue analizado mediante tablas de 3x2 a través del programa Finetti (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Los valores de p menores que 0.05 en los genotipos y alelos de los controles se consideraron estar en desequilibrio de HW.

7.8 Análisis de asociación entre casos y controles

La razón de momios (OR), intervalos de confianza (IC 95 %) y valores de p fueron calculados mediante el programa Epidat V. 3.1 (<http://dxsp.sergas.es>), tomando en cuenta las frecuencias de los genotipos y de los alelos tanto de los casos como controles (tablas de contingencia de 3X2 y 2X2, respectivamente), empleando la prueba de X^2 . El análisis de haplotipos y desequilibrio de ligamento (LD) se analizaron mediante el programa Haploview 4.2.

8. RESULTADOS

8.1 Población analizada

Este estudio incluyó 364 individuos diagnosticados con AR, de los cuales 332 (91%) fueron mujeres y 32 (9%) fueron hombres. Además, se incluyeron 323 controles, de ellos, 277 (86%) fueron mujeres y 46 (14%) hombres. La edad promedio en ambos grupos fue de 52 años, con una desviación estándar de ± 13 para los pacientes y ± 8 en los controles (FIGURA 9).

Con respecto al origen étnico, la población analizada fue muy heterogénea. El grupo de casos estuvo conformado por pacientes provenientes de 21 entidades de la república mexicana; mientras que el grupo control fueron pacientes procedentes de 17 estados. Sin embargo, en ambos grupos, la mayoría de las personas fueron oriundas de la Ciudad de México (59% y 58%, respectivamente) (FIGURA 10).

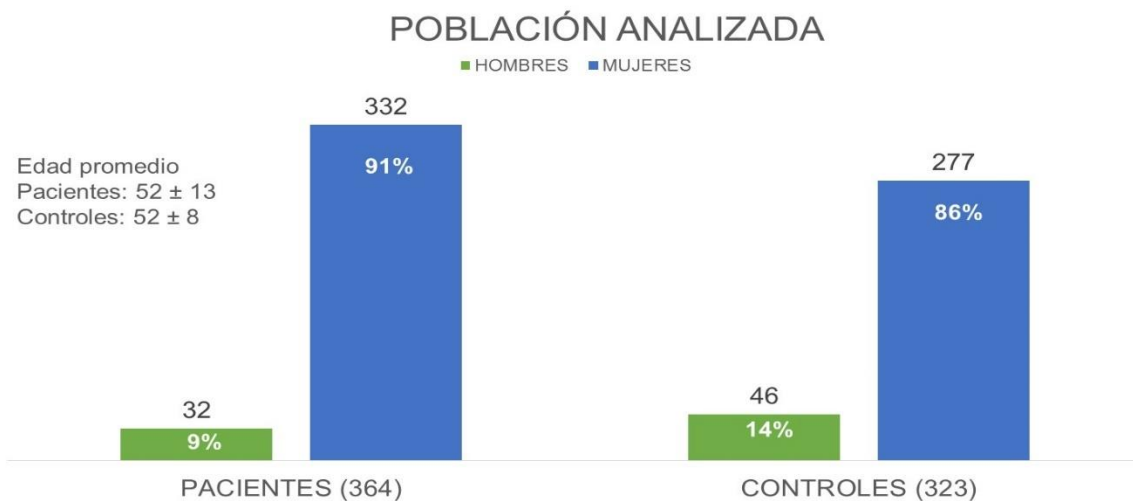


FIGURA 5. Distribución por géneros de la población analizada. Verde: género masculino; azul: género femenino.

DISTRIBUCIÓN GEOGRAFICA

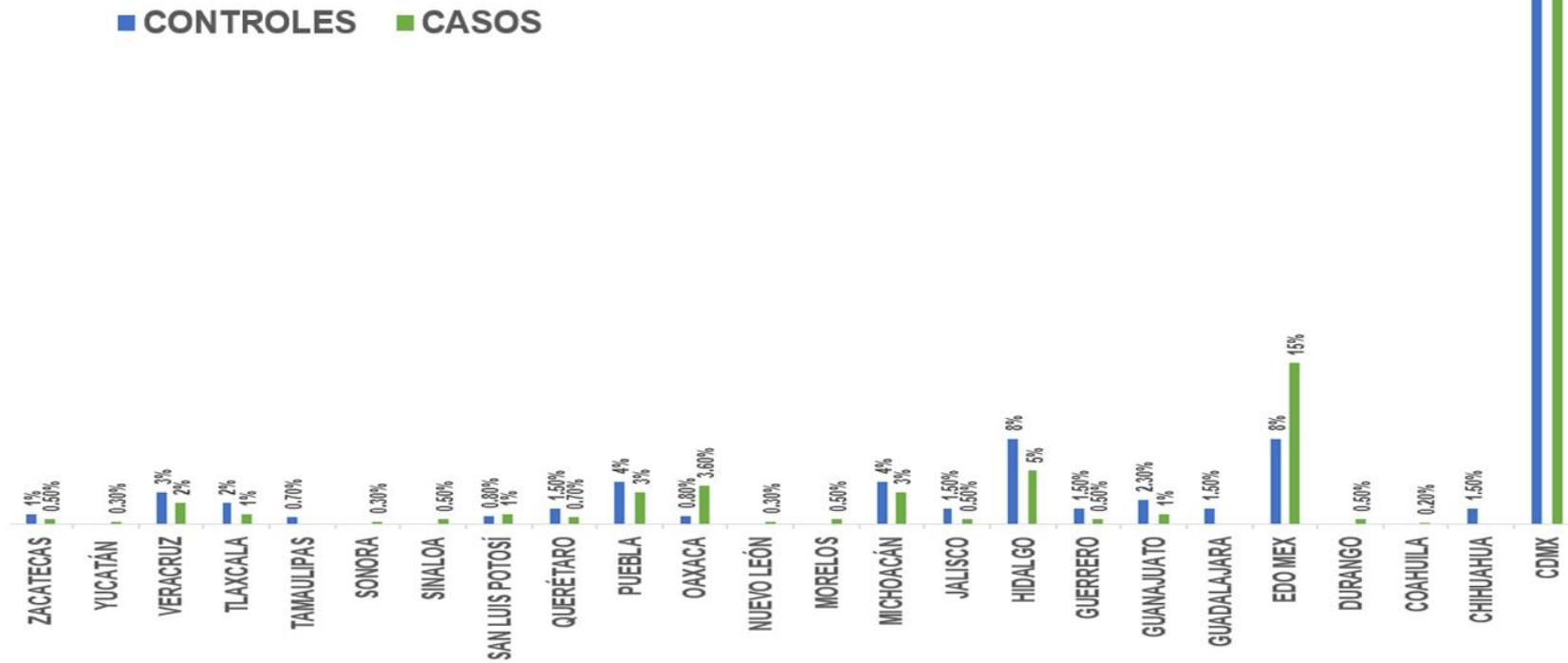


Figura 6. Distribución geográfica de los individuos analizados. La muestra poblacional analizada en su mayoría estuvo constituida por individuos procedentes de la CDMX, el Estado de México (Edo. Mex) y el estado de Hidalgo. En total participaron individuos procedentes de 24 entidades.

8.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Se realizó en análisis para los tres SNPs, tanto en la población general (que incluye mujeres y hombres), como por género. El análisis de EHW reveló que sólo el SNP -634 G/C no cumplió con el E-HW tanto en casos como controles.

8.2.1 SNP -2578 C/A

El análisis del SNP -2578 C/A mostró que el alelo A está presente en el 38% de los casos de AR y en el 39% de los controles, por lo que no se observaron diferencias estadísticamente significativas (OR=0.98; IC 95%= 0.79-1.22, P=0.891), e incluso aún después de estratificar por género (OR=0.99; IC95%=0.78-1.25, P=0.99) (Tablas 5 y 6). El análisis bajo los modelos dominante, recesivo y aditivo no mostró diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles. En casos y controles, los individuos heterocigotos CA fueron los de mayor frecuencia, esto se presentó en la población general y aún después de la estratificación por género femenino (Tabla 6). No se incluyó el análisis de la población masculina debido al bajo número de casos y controles.

TABLA 5. Frecuencias de genotipos y alelos del SNP -2578C/A en casos con AR y controles.

Genotipos / Alelos (rs699947)	Controles (318) n (%)	AR (359) n (%)	OR	95 % IC	Valor P
CC	122 (38%)	136 (38%)	-	-	-
CA	147 (46%)	172 (48%)	-	-	-
AA	49 (16%)	51 (14%)	0.93	0.58-1.48	0.770
C	391 (61%)	444 (62%)	-	-	-
A	245 (39%)	274 (38%)	0.98	0.79-1.22	0.891

TABLA 6. Frecuencias de genotipos y alelos del SNP -2578C/A de VEGF-A en población femenina con AR y controles.

Genotipos / Alelos (rs699947)	Controles (272) n (%)	AR (327) n (%)	OR	95 % IC	Valor P
CC	103 (38%)	121 (37%)	-	-	-
CA	125 (46%)	157 (48%)	1.06	0.75-1.52	0.71
AA	44 (16%)	49 (15%)	-	-	-
C	331 (61%)	399 (61%)	-	-	-
A	213 (39%)	255 (39%)	0.99	0.78-1.25	0.99

8.2.2 SNP -1154 G/A

La distribución de genotipos y alelos de este SNP en casos y controles tanto en la población total como después de la estratificación por género no reveló diferencias estadísticamente significativas (Tabla 7 y 8 respectivamente).

TABLA 7. Frecuencias de genotipos y alelos obtenidos del SNP -1154G/A en VEGF-A en casos con AR y controles.

Genotipos / Alelos (rs1570360)	Controles (300) n (%)	AR (356) n (%)	OR	95 % IC	Valor P
GG	170 (57%)	225 (63%)	-	-	-
GA	103 (34%)	106 (30%)	-	-	-
AA	27 (9%)	25 (7%)	0.778	0.55-1.08	0.142
G	443 (74%)	556 (78%)	-	-	-
A	157 (26%)	156 (22%)	0.792	0.61-1.02	0.071

TABLA 8. Frecuencias de genotipos y alelos del SNP -1154G/A en VEGF-A en población femenina.

Genotipos / Alelos (rs1570360)	Controles (256) n (%)	AR (326) n (%)	OR	95 % IC	Valor P
GG	143 (56%)	201 (62%)	-	-	-
GA	87 (34%)	102 (31%)	-	-	-
AA	26 (10%)	23 (7%)	0.063	0.34-1.14	0.128
G	373 (73%)	504 (77%)	-	-	-
A	139 (27%)	148 (23%)	0.788	0.60-1.03	0.080

8.2.3 SNP -634 G/C

Respecto SNP -634 G/C, la distribución de alelos fue similar entre el grupo de pacientes e individuos sanos ($p=0.733$). Sin embargo, se observaron diferencias en la frecuencia de los genotipos entre ambos grupos ($p=0.003$). Es de hacer notar que la frecuencia del genotipo heterocigoto GC en casos (53%) fue mayor que en los controles (42%) ($OR=1.97$; $IC_{95\%}=1.24-3.12$; $P=0.003$) (Tabla 9). Este resultado se repitió después del análisis de la población femenina ($OR=1.86$; $IC_{95\%}=1.145-3.012$; $P=0.011$) (Tabla 10).

TABLA 9. Frecuencias de genotipos y alelos del SNP -634 G/C de VEGF-A en la población general.

Genotipos / Alelos (rs2010963)	Controles (310) n (%)	AR (353) n (%)	OR	95 % IC	Valor P
GG	125 (40%)	126 (36%)	-	-	-
GC	129 (42%)	186 (53%)	1.97	1.24-3.12	0.003
CC	56 (18%)	41 (11%)	-	-	-
G	379 (61%)	438 (62%)	-	-	-
C	241 (39%)	268 (38%)	0.96	0.77-1.20	0.733

TABLA 10. Frecuencias de genotipos y alelos del SNP -634 G/C de VEGF-A en la población femenina.

Genotipos / Alelos (rs2010963)	Controles (270) n (%)	AR (323) n (%)	OR	95 % IC	Valor P
GG	108 (40%)	117 (36%)	-	-	-
GC	113 (42%)	167 (52%)	1.86	1.14-3.01	0.011
CC	49 (18%)	39 (12%)	-	-	-
G	329 (61%)	401 (62%)	-	-	-
C	211 (39%)	245 (38%)	0.95	0.75-1.20	0.69

8.3 Análisis de secuenciación

Para la validación de los datos de genotipificación con sondas TaqMan se seleccionaron muestras de cada genotipo de los tres SNPs analizados. Se realizó el proceso de PCR, posteriormente se observaron los productos en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (Figura 11) y se cuantificaron (Tabla 11).

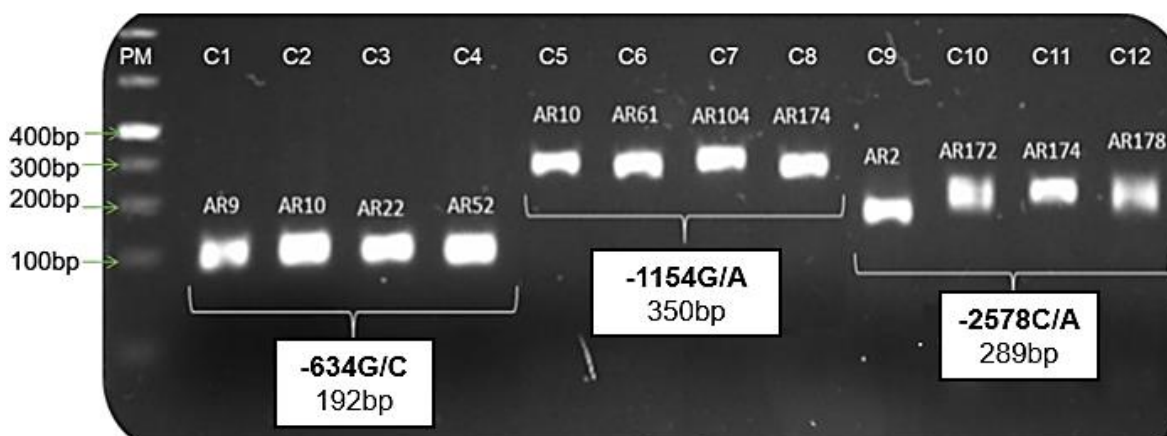


FIGURA 11. Productos de PCR obtenidos para el análisis de los SNPs de VEGF-A. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. PM: Marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Se aprecian 12 amplicones, cuatro por SNPs: -634 G/C (carril 1-4), -1154 G/A (carril 5-8) y -2578 C/A (carril 9-12).

Tabla 11. Cuantificación de las diferentes muestras y valores de pureza obtenidos.

SNP 1: -634 G/C; SNP 2: -1154 G/A; SNP 3: -2578 C/A.

Muestra	[ng/μl]	260/280	260/230	Muestra	[ng/μl]	260/280	260/230
SNP1_9	31.8	1.74	2	SNP2_104	26.1	1.64	1.5
SNP1_10	34.63	1.73	1.8	SNP2_174	44	1.75	1.82
SNP1_22	34.53	1.71	1.63	SNP3_2	43	1.73	1.9
SNP1_52	35.73	1.61	1.73	SNP3_172	23.02	1.67	1.7
SNP2_10	34.63	1.73	1.8	SNP3_174	18.5	1.75	1.7
SNP2_61	42.27	1.73	1.82	SNP3_178	20.62	1.67	1.7

Considerando que el SNP -634 G/C de *VEGF-A* fue el único que presentó asociación con AR, sólo se muestran los electroferogramas derivados de este estudio (Figura 12). Los genotipos obtenidos mediante secuenciación automatizada coincidieron con lo que se habían obtenido previamente mediante Sondas TaqMan.

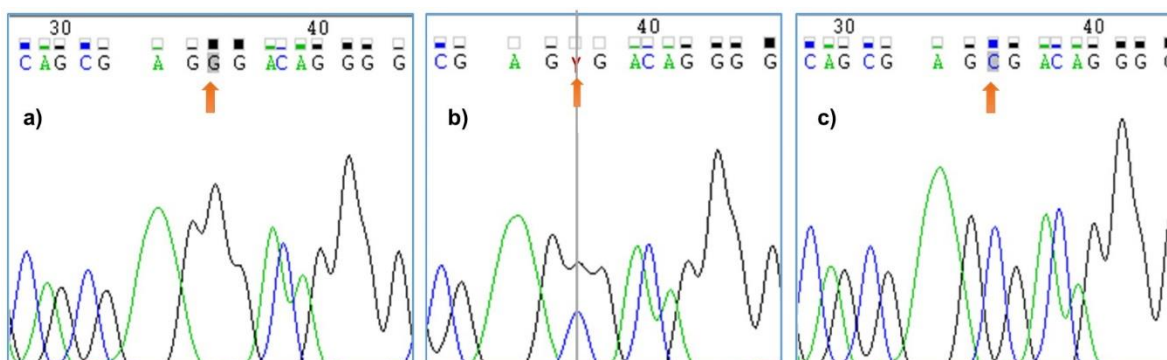


Figura 12. Electroferograma del análisis del SNP -634 G/C. a) homocigoto GG, b) heterocigoto GC, c) homocigoto CC.

8.4 Análisis de haplotipos y LD

El análisis de haplotipos con los tres SNP de *VEGF-A* (-2578 C/A, -1154 G/A, -634 G/C) mostró cuatro haplotipos (Figura 13), pero ninguno de ellos presentó evidencia de asociación genética con AR, obteniendo valores de $P > 0.05$.

Por otra parte, el análisis de LD de los 3 SNP analizados de *VEGF-A*, mostraron un alto LD entre ellos (Figura 14), existiendo un LD=91 (valores mostrados en r^2) entre los SNP -2578 C/A y -634G/C, siendo este último, el SNP que presentó asociación genética con AR en el análisis realizado con la población general (OR=1.96; IC95%=1.242-3.123; $P=0.003$) y por mujeres (OR=1.85; IC95%=1.145-3.012; $P=0.011$). En el análisis de estratificación por género, no existió evidencia de asociación genética con los haplotipos obtenidos; y no hay presencia de LD entre los marcadores (Datos no mostrados).

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
Haplotype Associations				
Block 1				
CGC	0.364	260.2 : 467.8, 240.2 : 405.8	0.303	0.5819
CGG	0.241	179.9 : 548.1, 150.8 : 495.2	0.347	0.5556
AAG	0.218	145.6 : 582.4, 153.9 : 492.1	2.94	0.0864
AGG	0.149	119.5 : 608.5, 85.8 : 560.2	2.651	0.1035

Figura 13. Haplotipos formados por los tres SNPs de VEGFA.

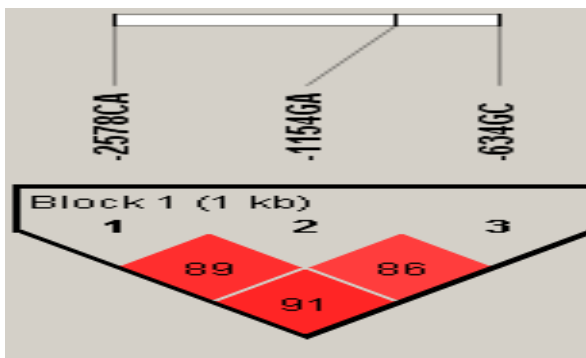


Figura 14. Plot de desequilibrio de ligamiento entre los SNP de VEGF-A. Los valores de LD fueron medidos con r^2 . La intensidad del color correlaciona con el nivel de ligamiento entre los marcadores.

9. DISCUSIÓN

La AR se caracteriza por presentar inflamación de la membrana sinovial de las articulaciones con movimiento, siendo la entidad inflamatoria articular más frecuente en adultos (Mendoza-Vázquez *et al.*, 2013). Diversos SNPs funcionales localizados en genes codificantes y no codificantes de proteínas han sido analizados en diferentes poblaciones con AR en busca de marcadores de susceptibilidad, gravedad o protección (Rodríguez-Elias *et al.*, 2016). En nuestro estudio, se evaluaron 3 SNPs localizados en el promotor de *VEGF-A*, los resultados indican que los polimorfismos -2578 C/A y -1154G/A de *VEGF-A* no están asociados con AR. A su vez, el SNP -634 G/C de *VEGF-A* se asoció con susceptibilidad para AR, tanto en la población general como en mujeres. Nuestros hallazgos son discordantes con las observaciones descritas en la población China, caucásica y polaca pero concuerdan con los estudios realizados en población coreana y española. de 697 controles y 329 de casos de la población China, Zhang y cols. mostraron que el SNP -2578 C/A protege para AR en pacientes de edad avanzada y con anti-PCC negativo (Zhang *et al.*, 2013).

En otro estudio realizado en pacientes caucásicos con AR, se reportó que el genotipo AA del SNP -2578 C/A de *VEGF-A* se asoció con bajos niveles serológicos de *VEGF-A* en pacientes que nunca habían fumado (Chen *et al.*, 2012). Resultados similares a los nuestros fueron obtenidos cuando se analizaron las variantes genéticas -2578 C/A, -1154 G/A y -634 G/C en pacientes Coreanos con AR (Han *et al.*, 2004). Por su parte, el estudio realizado en población Española mostró que al igual que en nuestro estudio, el SNPs -1154 G/A no confirieron

susceptibilidad para desarrollar AR (Rueda *et al.*, 2005). Sin embargo nuestras observaciones respecto al polimorfismo -634 G/C difieren, ya que mientras que ellos no reportan asociación con AR, en el presente trabajo se encontró que esta variante podría ser un factor de riesgo para ésta en la población mexicana.

A diferencia de nuestros resultados, mismos que son similares a los reportados en población española y coreana, el polimorfismo -1154 G/A de *VEGF-A* ha sido asociado con susceptibilidad para desarrollar AR bajo un modelo genético dominante (GG vs AA OR 1.37; 95% CI 1.08 a 1.75, $p = 0.010$) (Paradowska-Gorycka *et al.*, 2016).

Por otro lado, el SNP -634 G/C de *VEGF-A* se asoció con susceptibilidad para desarrollar AR en las mujeres mexicanas (OR=1.86; P=0.011). Este es el primer estudio en vincular este SNP con susceptibilidad de AR, y aunque el resultado debe tomarse con precaución, debido a que las frecuencias genotípicas obtenidas no cumplieron con el E-HW en los controles se ha reportado que el SNP -634 G/C es funcional. Lambrechts y cols., reportaron que el -634G/C afecta la secuencia nucleótidos del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) tipo B, el cual está implicado en la regulación de la traducción (Lambrechts *et al.*, 2003). Estos autores analizaron la estructura secundaria de la región 5'UTR de *VEGF-A* en presencia del SNP -634 G/C, y observaron que este modifica la región río arriba del codón CUG, la cual representa la zona central de la actividad de IRES-B. Además, debido a que el polimorfismo -634 G/C se encuentra cercano del codón de inicio alternativo de la traducción (CUG), éste podría ser influenciado por esta variante. Por lo que se sugiere que el alelo -634G altera la regulación de la

traducción de *VEGF-A* dependiente de IRES (Lambrechts *et al.*, 2003). Si bien la presencia del alelo -634G afecta la traducción de *VEGF-L*, mediante la disminución de la actividad de IRES-B, ésto podría inducir la expresión continua de otras isoformas, como *VEGF-A*^{165aa} bajo condiciones de hipoxia, lo que concuerda con el registro de niveles elevados de *VEGF-A* en pruebas serológicas y de fluido sinovial de pacientes con AR (Cañete, 2004; Seung-Ah *et al.*, 2008; Paradowska-Gorycka *et al.*, 2016).

En la población mexicana, el polimorfismo -634 G/C ha sido analizado en pacientes con preeclamsia y las frecuencias reportadas en dicho estudio difieren para el grupo control (GG: 33 vs 40; GC: 55 vs 42; CC: 12 vs 18) pero son muy similares en pacientes (GG: 33 vs 36; GC: 52 vs 53; CC: 15 vs 12) (Garza-Veloz *et al.*, 2011).

Cabe mencionar que nuestros hallazgos de asociación pueden estar influenciados por el hecho de que el SNP -634G/C no se encontró en E-HW en los grupos evaluados, lo cual posiblemente se deba a un sesgo en la selección de la muestra. Los sesgos de selección son errores sistemáticos que pueden ser originados por el mismo investigador o ser el resultado de relaciones complejas en la población en estudio que pueden no ser evidentes para el investigador y pasar desapercibidas. Es necesario acentuar que la composición ancestral mexicana presenta diferencias genéticas regionales, debido al proceso de mestizaje (Silva-Zolezzi *et al.*, 2009); principalmente entre linajes indígenas y europeos, pero también de origen africano a raíz del intercambio de esclavos. A diferencia de otras regiones del mundo donde el colonialismo europeo dio lugar a una

disminución significativa de la población nativa, en México, la población indígena contribuyó en grandes proporciones al proceso de mestizaje, y actualmente constituye un segmento importante del total de habitantes (Lopez-Beltran y Deister, 2013; Moreno y Sandoval, 2013); incluso esta variabilidad genética, se asocia con una mayor prevalencia de la AR en la región sureste de México. De hecho, la prevalencia de la AR en el estado de Yucatán es mayor y sus habitantes presentan cinco veces más probabilidad de desarrollar la enfermedad, comparado con otras regiones del resto de la República Mexicana. Se ha propuesto que la ancestría Amerindia, en particular el asociado al complejo principal de histocompatibilidad clase II, es un factor de riesgo para AR (Lopez Herrera *et al.*, 2013).

La variabilidad ancestral podría ser la responsable de que nuestro grupo control para la población general y mujeres no cumpla con el parámetro del E-HW, debido a que nuestro grupo está constituido por personas procedentes de distintas regiones de la república mexicana, afectando de esta forma la frecuencias genotípicas esperadas, por lo que sería necesario realizar una selección más estricta de acuerdo a la procedencia regional de los participantes, esto con el fin de asegurar que nuestros grupos de análisis estén constituidos por individuos procedentes de los mismos estados.

Por otro lado, las asociaciones dependientes de género han sido reportadas consistentemente en EA. Se propone al género como una variable “ambiental” entre hombres y mujeres, cuyo factor puede interaccionar con diversos genotipos al igual que otros factores ambientales, sin embargo, dependiendo del genero pueden causar susceptibilidad o protección a enfermedades (Ober *et al.*, 2008).

El análisis de haplotipos y LD de los 3 SNP analizados de *VEGF-A* en la muestra general (la cual incluye mujeres y hombre con AR, así como mujeres y hombres en el grupo control), mostraron tener un alto LD entre ellos; SNP -2578 C/A y -634 G/C (Figura 10), siendo este último, el polimorfismo que presentó asociación genética con AR en el estudio realizado con la población general y por género (mujeres); además de reportarse que afecta la regulación del inicio de la traducción del *VEGF-A* (Lambrechts *et al.*, 2003). Nuestros hallazgos no descartan la posibilidad de que estas variantes estén asociadas con algún rasgo clínico o con la gravedad de la enfermedad. Para determinar si estas variantes son factores modificadores de la AR, se debe hacer un estudio detallado que incluya la recopilación de datos clínicos como tiempo de evolución de la enfermedad, número de articulaciones afectadas, positividad a proteína C reactiva, anticuerpos anticitrulinados, etc. Además, dada la contribución de *VEGF-A* en la angiogénesis, evaluar este fenómeno en los pacientes y determinar su asociación con las variantes estudiadas, podría incrementar nuestro conocimiento sobre el papel de este gen en la enfermedad.

Por otra parte, se observó mayor frecuencia de población femenina afectada (9 mujeres por hombre afectado) esto comparado con datos registrados, 2 a 3 mujeres por cada varón (Kurko *et al.*, 2013; McInnes y Schett, 2011); posiblemente el aumento de población femenina con AR observada en este estudio se origine por la etiología multifactorial de la enfermedad, lo cual, limita su diagnóstico oportuno y que el paciente desconozca su padecimiento, específicamente en el caso de las mujeres cuyo diagnóstico se complica debido a los múltiples cambios hormonales que presentan.

En resumen, se analizaron tres SNPs localizados en el gen *VEGF-A*, los polimorfismos -2578C/A y el -1154 G/A, no mostraron asociación con AR, mientras el polimorfismo -634 G/C se asoció con susceptibilidad para desarrollar AR. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para confirmar estos datos, los cuales deben fortalecer la importancia de las variantes genéticas de *VEGF-A* con susceptibilidad o protección para AR en nuestra población. Es importante mencionar que, aunque la principal función de *VEGF-A* es regular procesos angiogénicos, no fue posible evaluar este rasgo en biopsias de pacientes con AR, para determinar el papel de las tres variantes analizadas y angiogénesis en la membrana sinovial de pacientes con AR. La identificación de los factores genéticos que participan en la etiología de la enfermedad podría contribuir al desarrollo de nuevas dianas terapéuticas y mejoras en la prevención de la enfermedad.

10. CONCLUSIONES

- Encontramos mayor frecuencia de mujeres afectadas con AR en comparación con los varones 91 % vs 9 %, respectivamente.
- Los genotipos de los SNPs -2578 C/A y -1154 G/A se encontraron en E-HW.
- Los SNPs -2578 C/A y -1154 G/A de *VEGF-A* no mostraron asociación con AR en la población mexicana. Sin embargo, ésto no descarta que los alelos/genotipos de este polimorfismo puedan estar asociados con rasgos clínicos no evaluados en este estudio.
- EL SNP -634 G/C se asoció con susceptibilidad en la población general y en mujeres con AR.

11. PERSPECTIVAS

- Aumentar el tamaño de muestra de pacientes con AR y controles (n=600).
- Aumentar el tamaño de muestra de hombres para ambos grupos.
- Considerar la variabilidad genética regional presente en México con el fin de ajustar los criterios de inclusión para el correcto diseño y análisis de estudios de asociación.
- Evaluar el efecto funcional de los alelos de los SNPs -634 G/C y -1154 G/A.
- Analizar si los pacientes portadores del genotipo GC del SNP -634 G/C presentan niveles elevados de la proteína en la membrana sinovial.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Aletaha D., Neogi T., Silman A. J., *et al.* (2010). "2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative." Ann Rheum Dis 69(9): 1580-1588.
- Alunno A., Manetti M., Caterbi S., *et al.* (2015). "Altered immunoregulation in rheumatoid arthritis: the role of regulatory T cells and proinflammatory Th17 cells and therapeutic implications." Mediators Inflamm 2015: 751793.
- Arend W. P. y Firestein G. S. (2012). "Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis." Nat Rev Rheumatol 8(10): 573-586.
- Arleevskaya M. I., Kravtsova O. A., Lemerle J., *et al.* (2016). "How Rheumatoid Arthritis Can Result from Provocation of the Immune System by Microorganisms and Viruses." Front Microbiol 7: 1296.
- Autiero M., Luttun A., Tjwa M., *et al.* (2003). "Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders." J Thromb Haemost 1(7): 1356-1370.
- Awata T., Inoue K., Kurihara S., *et al.* (2002). "A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes." Diabetes 51(5): 1635-1639.
- Ballara S., Taylor P., Reusch P., *et al.* (2001). "Raised serum vascular endothelial growth factor levels are associated with destructive changes in inflammatory arthritis." Arthritis Rheum 44(9): 2055-2064.
- Barbarroja N., Velasco F. y Lopez-Pedreira C. (2008). "[Intracellular mechanisms involved in the angiogenic process in hematological malignancies]." Med Clin (Barc) 130(15): 585-590.
- Bastide A., Karaa Z., Bornes S., *et al.* (2008). "An upstream open reading frame within an IRES controls expression of a specific VEGF-A isoform." Nucleic Acids Res 36(7): 2434-2445.
- Benedetti G. y Miossec P. (2014). "Interleukin 17 contributes to the chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis." Eur J Immunol 44(2): 339-347.
- Brennan F. M., Chantry D., Jackson A., *et al.* (1989). "Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis." Lancet 2(8657): 244-247.
- Burr M., Naseem H., Hinks A., *et al.* (2005). "PADI4 genotype is not associated with rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population." Ann Rheum Dis 69(4): 666-670.

- Bush W. S., Oetjens M. T. y Crawford D. C. (2016). "Unravelling the human genome-phenome relationship using phenome-wide association studies." Nat Rev Genet 17(3): 129-145.
- Cañete J. (2004). "Angiogénesis en la sinovitis reumatoide." Rev Esp Reumatol 31(4): 173-1778
- Carmeliet P. y Jain R. K. (2011). "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis." Nature 473(7347): 298-307.
- Cirulli E. T. (2016). "The Increasing Importance of Gene-Based Analyses." PLoS Genet 12(4): e1005852.
- Cordell H. J. y Clayton D. G. (2005). "Genetic association studies." Lancet 366(9491): 1121-1131.
- Checa M. (2007). "Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones." Rev Inst Nal Enf Resp Mex 20(3): 213-221.
- Chen Y., Dawes P. T. y Matthey D. L. (2012). "Polymorphism in the vascular endothelial growth factor A (VEGFA) gene is associated with serum VEGF-A level and disease activity in rheumatoid arthritis: differential effect of cigarette smoking." Cytokine 58(3): 390-397.
- Davis J. M., 3rd, Matteson E. L., American College of R., *et al.* (2012). "My treatment approach to rheumatoid arthritis." Mayo Clin Proc 87(7): 659-673.
- Ding L., Wiener H., Abebe T., *et al.* (2011). "Comparison of measures of marker informativeness for ancestry and admixture mapping." BMC Genomics 12: 622.
- Fava R. A., Olsen N. J., Spencer-Green G., *et al.* (1994). "Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue." J Exp Med 180(1): 341-346.
- Ferrara N., Gerber H. P. y LeCouter J. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." Nat Med 9(6): 669-676.
- Firestein G., Budd R., Gabriel S., *et al.* (2013). Kelley's Textbook of Rheumatology.
- Florez J. C., Hirschhorn J. y Altshuler D. (2003). "The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits." Annu Rev Genomics Hum Genet 4: 257-291.
- Garza-Veloz I., Castruita-De la Rosa C., Cortes-Flores R., *et al.* (2011). "No association between polymorphisms/haplotypes of the vascular endothelial growth factor gene and preeclampsia." BMC Pregnancy Childbirth 11: 35.
- Genomes Project C., Abecasis G. R., Altshuler D., *et al.* (2010). "A map of human genome variation from population-scale sequencing." Nature 467(7319): 1061-1073.

- Goronzy J. J. y Weyand C. M. (2009). "Developments in the scientific understanding of rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther 11(5): 249.
- Gregersen P. K., Silver J. y Winchester R. J. (1987). "The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum 30(11): 1205-1213.
- Griffin H. G. y Griffin A. M. (1993). "DNA sequencing. Recent innovations and future trends." Appl Biochem Biotechnol 38(1-2): 147-159.
- Han S. W., Kim G. W., Seo J. S., *et al.* (2004). "VEGF gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis." Rheumatology (Oxford) 43(9): 1173-1177.
- Hodge S. E. (1993). "Linkage analysis versus association analysis: distinguishing between two models that explain disease-marker associations." Am J Hum Genet 53(2): 367-384.
- Ikeda M., Hosoda Y., Hirose S., *et al.* (2000). "Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors Flt-1, KDR, and neuropilin-1 in synovial tissues of rheumatoid arthritis." J Pathol 191(4): 426-433.
- Iniestaa R., Guinóa E. y Moreno V. (2005). "Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos." Gac Sanit 9(4): 333-341.
- Jimenez-Morales S. y Sanchez-Brena F. T. (2016). Estrategias para la identificación de *loci* y genes involucrados. Genómica estructural y funcional en las enfermedades multifactoriales J. Ramírez Bello. México, LEEA: 656.
- Karlson E. W. y Deane K. (2012). "Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis." Rheum Dis Clin North Am 38(2): 405-426.
- Karlson E. W., Lee I. M., Cook N. R., *et al.* (1999). "A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals." Arthritis Rheum 42(5): 910-917.
- Keffer J., Probert L., Cazlaris H., *et al.* (1991). "Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis." EMBO J 10(13): 4025-4031.
- Khurana R. y Berney S. M. (2005). "Clinical aspects of rheumatoid arthritis." Pathophysiology 12(3): 153-165.
- Koch A. E., Harlow L. A., Haines G. K., *et al.* (1994). "Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis." J Immunol 152(8): 4149-4156.
- Kononkov V. I., Korolev M. A., Shevchenko A. V., *et al.* (2013). "[Genetic factors of angiogenic dysregulation in women with rheumatoid arthritis]." Ter Arkh 85(5): 16-23.

- Konisti S., Kiriakidis S. y Paleolog E. M. (2012). "Hypoxia--a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis." Nat Rev Rheumatol 8(3): 153-162.
- Kosoy R., Nassir R., Tian C., *et al.* (2009). "Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America." Hum Mutat 30(1): 69-78.
- Kowanetz M. y Ferrara N. (2006). "Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective." Clin Cancer Res 12(17): 5018-5022.
- Kresse S. H., Szuhai K., Barragan-Polania A. H., *et al.* (2010). "Evaluation of high-resolution microarray platforms for genomic profiling of bone tumours." BMC Res Notes 3: 223.
- Kurko J., Besenyei T., Laki J., *et al.* (2013). "Genetics of rheumatoid arthritis - a comprehensive review." Clin Rev Allergy Immunol 45(2): 170-179.
- Kurosaka D., Hirai K., Nishioka M., *et al.* (2010). "Clinical significance of serum levels of vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1, and angiopoietin-2 in patients with rheumatoid arthritis." J Rheumatol 37(6): 1121-1128.
- Lambrechts D., Storkebaum E., Morimoto M., *et al.* (2003). "VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death." Nat Genet 34(4): 383-394.
- Lee T. H., Avraham H., Lee S. H., *et al.* (2002). "Vascular endothelial growth factor modulates neutrophil transendothelial migration via up-regulation of interleukin-8 in human brain microvascular endothelial cells." J Biol Chem 277(12): 10445-10451.
- Lee Y., Woo J., Choi S., *et al.* (2010). "Association between the rs7574865 polymorphism of STAT4 and rheumatoid arthritis: a meta-analysis." Rheumatol Int. 30(5): 661-666.
- Li C., Xia F., Zhang Y., *et al.* (2017). "Molecular Biological Methods in Environmental Engineering." Water Environ Res 89(10): 942-959.
- Liao K. P., Alfredsson L. y Karlson E. W. (2009). "Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis." Curr Opin Rheumatol 21(3): 279-283.
- Lin C. C., Wu H. C., Tsai F. J., *et al.* (2003). "Vascular endothelial growth factor gene-460 C/T polymorphism is a biomarker for prostate cancer." Urology 62(2): 374-377.
- Lohela M., Bry M., Tammela T., *et al.* (2009). "VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis." Curr Opin Cell Biol 21(2): 154-165.
- Lopez-Beltran C. y Deister V. G. (2013). "[Scientific approaches to the Mexican mestizo]." Hist Cienc Saude Manguinhos 20(2): 391-410.
- Lopez Herrera D., Martinez-Bueno M., Riba L., *et al.* (2013). "Rheumatoid arthritis in Latin Americans enriched for Amerindian ancestry is associated with

loci in chromosomes 1, 12, and 13, and the HLA class II region." Arthritis Rheum 65(6): 1457-1467.

- Lossius A., Johansen J. N., Torkildsen O., *et al.* (2012). "Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis-association and causation." Viruses 4(12): 3701-3730.
- Luizon M. R., Palei A. C. y Sandrim V. C. (2012). "Polymorphisms and haplotypes in candidate genes related to angiogenesis and endothelial dysfunction in preeclampsia." J Pregnancy 2012: 914704.
- Luttun A., Tjwa M. y Carmeliet P. (2002). "Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): novel therapeutic targets for angiogenic disorders." Ann N Y Acad Sci 979: 80-93.
- MacGregor A., Snieder H., Rigby A., *et al.* (2000). "Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins." Arthritis Rheum 43(1): 30-37.
- Mahabadi M., Faghihilo E., Alishiri G. H., *et al.* (2016). "Detection of Epstein-Barr virus in synovial fluid of rheumatoid arthritis patients." Electron Physician 8(3): 2181-2186.
- Marrelli A., Cipriani P., Liakouli V., *et al.* (2011). "Angiogenesis in rheumatoid arthritis: a disease specific process or a common response to chronic inflammation?" Autoimmun Rev 10(10): 595-598.
- Martínez-Ezquerro J. y Herrera L. (2006). "ANGIOGÉNESIS: VEGF/VEGFRs como Blancos Terapéuticos en el Tratamiento Contra el Cáncer." Cancerología 1: 83- 96.
- Mathew C. (2001). "Science, medicine, and the future: Postgenomic technologies: hunting the genes for common disorders." BMJ 322(7293): 1031-1034.
- McInnes I. B. y Schett G. (2007). "Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." Nat Rev Immunol 7(6): 429-442.
- McInnes I. B. y Schett G. (2011). "The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis." N Engl J Med 365: 2205-2219.
- Mendoza-Vázquez G., Rocha-Muñoz A., Guerra-Soto A., *et al.* (2013). "Artritis reumatoide y dislipidemias." El Residente 8(1): 12-22.
- Moreno A. y Sandoval K. (2013). "Diversidad genómica en México: Pasado indígena y mestizaje." Cuicuilco 20: 249-275.
- Mould A. W., Tonks I. D., Cahill M. M., *et al.* (2003). "Vegfb gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis." Arthritis Rheum 48(9): 2660-2669.
- Nam E. J., Han S. W., Kim S. U., *et al.* (2005). "Association of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms with behcet disease in a Korean population." Hum Immunol 66(10): 1068-1073.

- Ober C., Loisel D. A. y Gilad Y. (2008). "Sex-specific genetic architecture of human disease." Nat Rev Genet 9(12): 911-922.
- Olivares Martínez E., Hernández Ramírez D. F., Núñez-Álvarez C. A., *et al.* (2011). "Proteínas citrulinadas en artritis reumatoide." Reumatología Clínica 7(1): 68-71.
- Orozco G., Hinks A., Eyre S., *et al.* (2009). "Combined effects of three independent SNPs greatly increase the risk estimate for RA at 6q23." Hum Mol Genet. 18(14): 2693-2699.
- Paleolog E. M. (2009). "The vasculature in rheumatoid arthritis: cause or consequence?" Int J Exp Pathol 90(3): 249-261.
- Paleolog E. M., Young S., Stark A. C., *et al.* (1998). "Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum 41(7): 1258-1265.
- Paradowska-Gorycka A., Pawlik A., Romanowska-Prochnicka K., *et al.* (2016). "Relationship between VEGF Gene Polymorphisms and Serum VEGF Protein Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis." PLoS One 11(8): e0160769.
- Pelaez-Ballestas I., Sanin L. H., Moreno-Montoya J., *et al.* (2011). "Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology." J Rheumatol Suppl 86: 3-8.
- Plenge R., Padyukov L., Remmers E., *et al.* (2005). "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 77(6): 1044–1060.
- Plenge R., Seielstad M., Padyukov L., *et al.* (2007). "TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genome-wide study." N Engl J Med 357(12): 1199-1209.
- Pratt A. G., Isaacs J. D. y Matthey D. L. (2009). "Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis." Best Pract Res Clin Rheumatol 23(1): 37-48.
- Prete M., Racanelli V., Digiglio L., *et al.* (2011). "Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update." Autoimmun Rev 11(2): 123-131.
- Ramírez-Bello J., Pérez-Méndez O., Ramírez-Fuentes S., *et al.* (2011). "Genética y genómica de la hipertensión arterial: una actualización." Arch Cardiol Mex 81(3): 240-250.
- Ramírez-Bello J., Vargas-Alarcón G., Tovilla-Zárate C., *et al.* (2013). "Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas." Gac. Méd. Méx. 149: 220-228.
- Redlich K. y Smolen J. S. (2012). "Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention." Nat Rev Drug Discov 11(3): 234-250.

- Rey S. y Semenza G. L. (2010). "Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling." Cardiovasc Res 86(2): 236-242.
- Rodriguez-Elias A. K., Maldonado-Murillo K., Lopez-Mendoza L. F., *et al.* (2016). "[Genetics and genomics in rheumatoid arthritis (RA): An update]." Gac Med Mex 152(2): 218-227.
- Rodriguez-Rodriguez L., Garcia-Bermudez M., Gonzalez-Juanatey C., *et al.* (2011). "Vascular endothelial growth factor A and cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients." Tissue Antigens 77(4): 291-297.
- Rueda B., Gonzalez-Gay M. A., Lopez-Nevot M. A., *et al.* (2005). "Analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF) functional variants in rheumatoid arthritis." Hum Immunol 66(8): 864-868.
- Sanchez-Ramon S., Lopez-Longo F. J. y Carreno L. (2011). "[Interleukins network in rheumatoid arthritis pathophysiology: beyond proinflammatory cytokines]." Reumatol Clin 6S3: S20-24.
- Sánchez-Rodríguez S, Barajas-Vásquez G, Ramírez-Alvarado E, *et al.* (2004). "El fenómeno de autoinmunidad: enfermedades y antígenos relacionados." Rev Biomed 15: 49-55.
- Semenza G. L. (2009). "Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1." Physiology (Bethesda) 24: 97-106.
- Seung-Ah Y., Seung-Ki K. y Wan-Uk K. (2008). Proinflammatory Role of Vascular Endothelial Growth Factor in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: Prospects for Therapeutic Intervention. Mediators Inflamm. 2008: 6.
- Sevilla S. (2007). "Metodología de los estudios de asociación genética." Insuf. card 2(3): 111-114.
- Silva-Zolezzi I., Hidalgo-Miranda A., Estrada-Gil J., *et al.* (2009). "Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico." Proc Natl Acad Sci U S A 106(21): 8611-8616.
- Smolen J. S. y Steiner G. (2003). "Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis." Nat Rev Drug Discov 2(6): 473-488.
- Stevens A., Soden J., Brenchley P. E., *et al.* (2003). "Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter." Cancer Res 63(4): 812-816.
- Szekanecz Z., Besenyei T., Paragh G., *et al.* (2009). "Angiogenesis in rheumatoid arthritis." Autoimmunity 42(7): 563-573.
- Takata Y., Inoue H., Sato A., *et al.* (2008). "Replication of reported genetic associations of PADI4, FCRL3, SLC22A4 and RUNX1 genes with rheumatoid arthritis: results of an independent Japanese population and evidence from meta-analysis of East Asian studies." J Hum Genet 53(2): 163-173.

- Turesson C., Jacobsson L. T., Sturfelt G., *et al.* (2007). "Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated peptides are associated with severe extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis 66(1): 59-64.
- Viatte S., Plant D. y Raychaudhuri S. (2013). "Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis." Nat Rev Rheumatol 9(3): 141-153.
- Yoo S. A., Kwok S. K. y Kim W. U. (2008). "Proinflammatory role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: prospects for therapeutic intervention." Mediators Inflamm 2008: 129873.
- Zhang Y., Li S., Xiao H. Q., *et al.* (2013). "Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and renal cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis." Oncol Lett 6(4): 1068-1078.
- Zhang Y., Qiu H., Zhang H., *et al.* (2013). "Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) polymorphisms in Chinese patients with rheumatoid arthritis." Scand J Rheumatol 42(5): 344-348.
- Jarvinen, P. and K. Aho (1994). "Twin studies in rheumatic diseases." Semin Arthritis Rheum 24(1): 19-28.
- Karlson, E. W. and K. Deane (2012). "Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis." Rheum Dis Clin North Am 38(2): 405-426.
- Knevel, R., T. W. J. Huizinga and F. Kurreeman (2017). "Genomic Influences on Susceptibility and Severity of Rheumatoid Arthritis." Rheum Dis Clin North Am 43(3): 347-361.
- Kurko, J., T. Besenyei, J. Laki, T. T. Glant, K. Mikecz and Z. Szekanecz (2013). "Genetics of rheumatoid arthritis - a comprehensive review." Clin Rev Allergy Immunol 45(2): 170-179.
- McInnes, I. B. and G. Schett (2007). "Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." Nat Rev Immunol 7(6): 429-442.
- Okada, Y., T. Kishikawa, S. Sakaue and J. Hirata (2017). "Future Directions of Genomics Research in Rheumatic Diseases." Rheum Dis Clin North Am 43(3): 481-487.
- Rodriguez-Elias, A. K., K. Maldonado-Murillo, L. F. Lopez-Mendoza and J. Ramirez-Bello (2016). "[Genetics and genomics in rheumatoid arthritis (RA): An update]." Gac Med Mex 152(2): 218-227.
- Santangelo, R., F. Gonzalez-Andrade, C. Borsting, A. Torroni, V. Pereira and N. Morling (2017). "Analysis of ancestry informative markers in three main ethnic groups from Ecuador supports a trihybrid origin of Ecuadorians." Forensic Sci Int Genet 31: 29-33.
- Smolen, J. S., D. Aletaha, A. Barton, G. R. Burmester, P. Emery, G. S. Firestein, A. Kavanaugh, I. B. McInnes, D. H. Solomon, V. Strand and K. Yamamoto (2018). "Rheumatoid arthritis." Nat Rev Dis Primers 4: 18001.

Genética y genómica en artritis reumatoide (AR): una actualización

Ana Karen Rodríguez-Ellias^{1,3}, Karina Maldonado-Murillo^{2,3}, Luis Fernando López-Mendoza^{2,3} y Julián Ramírez-Bello^{3*}

¹Posgrado en Biología Experimental, UAM-I; ²Licenciatura en Biología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM; ³Laboratorio de Medicina Genómica, Unidad de Investigación, Hospital Juárez de México, SSA, Ciudad de México, México

Resumen

La AR, una enfermedad inflamatoria, crónica y autoinmune, afecta aproximadamente al 1% de la población general. Se caracteriza por presentar inflamación, dolor, destrucción del cartilago y erosión del hueso. La AR pertenece al grupo de enfermedades multifactoriales, en cuyo desarrollo influyen diversos factores de riesgo ambientales y genéticos. Los estudios en familias indican que el desarrollo de la AR está fuertemente influenciado por el componente genético. Actualmente, conocemos aproximadamente 100 loci asociados no sólo con la susceptibilidad, sino también con la gravedad, la actividad y la respuesta al tratamiento de la AR; entre ellos se encuentran genes que codifican para el antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II, PTPN22, STAT4, CTLA4, TRAF1, PADI4, FCRL3, TNFIP3, TNF- α y miARN, entre otros. Esta revisión tiene como objetivo describir el papel de diversos genes involucrados en la regulación del sistema inmunológico innata y adaptativa que han mostrado asociación con la susceptibilidad a la AR, en diversas poblaciones, incluida la mexicana.

PALABRAS CLAVE: Gen. Genética. Genómica. Susceptibilidad.

Abstract

Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory autoimmune disease that affects approximately 0.5-1% of the general population and leads to chronic synovial inflammation, destruction of cartilage and bone, and disability. The heritability of rheumatoid arthritis has been estimated to be about 60%, while the contribution of HLA to heritability has been estimated to be 11-37%. Other genes, such as PTPN22, STAT4, CTLA4, TRAF1, PADI4, IRF5, FCRL3, TNFIP3, TNF- α , miRNAs, CD28, CD40, TYK2, etc., have been associated with susceptibility, severity, activity, and treatment response of rheumatoid arthritis. The aim of this review is to describe the role of gene variants located in immune system genes associated with susceptibility to rheumatoid arthritis. (Gac Med Mex. 2016;152:218-27)

Corresponding author: Julián Ramírez Bello, dr.julian.ramirez.hjm@gmail.com

KEY WORDS: Gene. Genetics. Genomics. Rheumatoid arthritis. Susceptibility.

Correspondencia:

*Julián Ramírez-Bello
Laboratorio de Medicina Genómica
Unidad de Investigación
Hospital Juárez de México
Av. Politécnico Nacional, 5160
Del. Gustavo A. Madero México,
C.P. 07760, Ciudad de México, México
E-mail: dr.julian.ramirez.hjm@gmail.com

Fecha de recepción en versión modificada: 26-06-2015
Fecha de aceptación: 06-07-2015

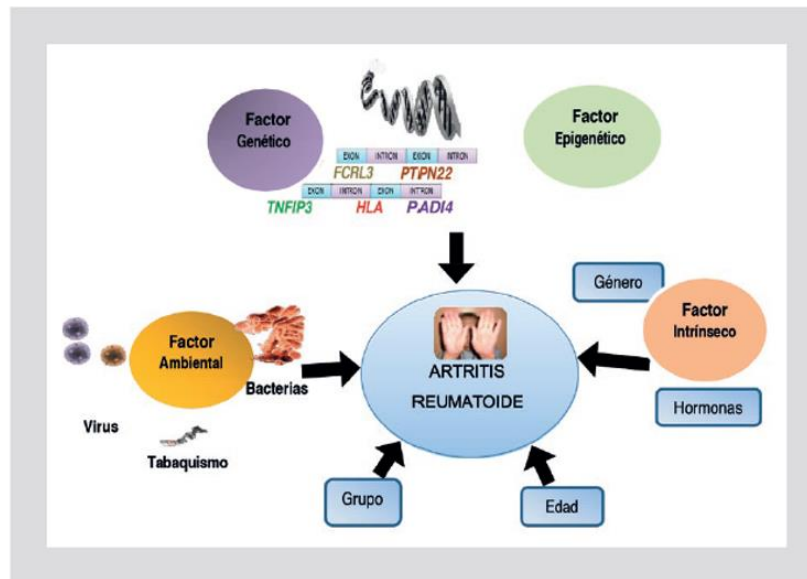


Figura 1. La AR, una enfermedad multifactorial.

Introducción

La AR representa el prototipo de las enfermedades crónicas inflamatorias; se caracteriza por presentar inflamación en la membrana sinovial, destrucción del cartilago, erosión del hueso, deformidad articular e incapacidad funcional del individuo afectado^{1,2}. Está bien documentado que la AR no trata a tiempo causa pérdida del trabajo, disminuye la calidad de vida y se asocia con una muerte prematura debido a la enfermedad cardiovascular^{2,3}. Diferentes células del sistema inmunológico innato y adaptativo presentan alteraciones en la expresión de diversos genes que codifican para proteínas, como citocinas, quimiocinas, receptores, moléculas de adhesión y genes que sintetizan ARN no codificantes, específicamente micro-ARN (miARN), los cuales tienen una expresión diferencial en esta enfermedad^{4,5}. Aunque la etiología de la AR no se conoce completamente, se ha documentado que la interacción entre diferentes factores genéticos de baja penetrancia y diversos factores ambientales,

como hormonas sexuales y agentes que disparan la respuesta inmunológica, como virus y bacterias, influye en su patogénesis⁶. Diversas evidencias han mostrado que las alteraciones genéticas, principalmente del tipo polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) localizados en genes que producen proteínas y ARN no codificantes (específicamente miARN), y que regulan la respuesta inmunológica innata y adaptativa, son el principal factor de riesgo genético involucrado en la AR⁷. Los estudios de asociación de gen candidato o los del genoma completo (GWAS) han identificado diversos loci de riesgo asociados con la etiología de la AR^{7,8}. Actualmente, en AR, se han descrito unos 100 genes asociados con susceptibilidad, protección, gravedad, actividad y respuesta a tratamiento⁹; entre ellos, se encuentran genes que codifican para el HLA de clase II y varios genes no HLA, como STAT4, CTLA4, TRAF1, PADI4, FCRL3, TNFIP3 y TNF- α , y mi-ARN, principalmente miR-146a y miR-499⁹⁻¹⁰. Estos genes influyen importantemente en la patogénesis de la AR; en esta revisión se darán detalles de esas asociaciones genéticas con esta enfermedad autoinmune (EA).

Epidemiología

La AR afecta aproximadamente al 1% de la población general¹. Se han reportado diferencias en la prevalencia en los países industrializados: llega a afectar al 0.5-2%, con una incidencia de 12-200 casos por cada 100,000 habitantes. La relación mujer: hombre es de 2-3:1 y la edad pico de aparición, entre los 30 y los 55 años, aunque puede presentarse a cualquier edad¹¹. En México, esta entidad afecta al 1.6% de la población¹².

Etiología

La etiología de la AR no se conoce completamente, pero se sabe que, como en todas las enfermedades multifactoriales, su desarrollo está fuertemente influenciado por factores genéticos (de baja penetrancia), ambientales e intrínsecos, como la edad, el género y el grupo étnico (Fig. 1)¹³. Diferentes factores ambientales han sido involucrados en su patogénesis: virus (Epstein-Barr, parvovirus B19), bacterias (*Streptococcus*, *Mycoplasma*, *Proteus* y *E. coli*), cigarro, sílice y hormonas, entre otros^{13,14}. Está bien documentado que tanto el cigarro como el sílice contribuyen fuertemente al desarrollo de esta EA¹⁴.

Por otro lado, entre los principales factores genéticos de riesgo para AR se encuentran diversos alelos de *HLA II*, *PTPN22*, *STAT4*, *CTLA4*, *TRAF1*, *PADI4*, *FCRL3*, *TNFAIP3*, *TNF-α* y miARN, entre otros^{5,7,10}.

Fisiopatología

La AR involucra varias cascadas de inflamación que conducen a un daño persistente del tejido sinovial, a la destrucción del cartilago articular y a la erosión del hueso¹⁵. Diversas células, como los linfocitos B y T y los macrófagos, desempeñan un papel regulador del sistema inmunológico innato y adaptativo; también varias citocinas, quimiocinas, receptores de citocinas y quimiocinas, moléculas de adhesión y adaptadoras, entre otros, han sido involucrados en la fisiopatología de la AR¹⁶⁻²⁰. Una de las principales citocinas proinflamatorias involucradas en la patogénesis de la AR es el factor de necrosis tumoral α ($TNF-\alpha$)²¹. En un modelo murino se demostró que la sobreexpresión de $TNF-\alpha$ es suficiente para inducir AR²². Otro estudio mostró que el $TNF-\alpha$ puede inducir la expresión de otras citocinas proinflamatorias, tales como interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), las cuales tienen un papel fundamental en la gravedad y actividad de la AR. Por otro

lado, se ha demostrado que tanto el $TNF-\alpha$ como la IL-1B y la IL-6 pueden inducir el desarrollo de AR^{23,24}. El $TNF-\alpha$ además puede inducir la expresión de genes que codifican para moléculas de adhesión intracelular y vascular (ICAM y VCAM, respectivamente), importantes en la comunicación entre células, y metaloproteasas de matriz, fundamentales en la destrucción del cartilago y la erosión del hueso, además de inducir la síntesis de autoanticuerpos, los cuales son un factor de gravedad y mal pronóstico en la AR²¹⁻²⁵. Dada la importancia del $TNF-\alpha$ en la AR, se ha desarrollado un set de anticuerpos dirigidos contra esta $TNF-\alpha$ (terapia biológica)^{20,21,25}. Por otro lado, la interleucina proinflamatoria 17, producida primariamente por las células Th17, ha sido involucrada en todos los estados de desarrollo de la enfermedad; se ha demostrado que es un factor de riesgo importante que contribuye a la cronicidad de la AR, ya que induce la producción de diversas citocinas inflamatorias en el sinovio de los pacientes con AR, tiene una función sinérgica con otras citocinas, las cuales dañan el tejido sinovial, promueve la sobrevida de los sinoviocitos y células inflamatorias, y está involucrada en su maduración; de esta manera, esta citocina conlleva un incremento del número de sinoviocitos y células inflamatorias, hiperplasia y la inflamación exacerbada observada en las articulaciones de los pacientes con AR²⁶.

Genética en la AR

Estudios realizados en familias y gemelos han mostrado la importancia que juegan los genes en la AR. La prevalencia de esta enfermedad en familiares de primer grado (donde hay un afectado con AR) es considerablemente mayor que en la población general, aun cuando la AR no se transmite en las familias con alta frecuencia^{27,28}. Aunque la concordancia es relativamente baja en comparación con otras EA (30%), no deja de tener una concordancia de aproximadamente el 12-15%^{27,28}. Los estudios de riesgo relativo para hermanos de individuos afectados (λ) comparado con la población general (individuos no relacionados) es de 2-10 veces mayor²⁷. Se ha estimado que la heredabilidad en la AR es del 60-70%^{26,28,29}.

Se han asociado diversos genes que codifican proteínas, así como ARN no codificantes (específicamente miARN) y que participan en la respuesta inmunológica innata y adaptativa, en la patogénesis de la AR. Entre estos genes se encuentran diversos alelos del HLA de clase I, II y III, citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y adaptadoras, metaloproteasas,

Tabla 1. Genes que han mostrado asociación con susceptibilidad y protección en AR

Gen	Localización	SNP	OR	Valor de p	Referencias
<i>HLA-DRB1</i>	6p21.3	rs6910071	2.88	1.0×10^{-299}	Stahl EA, et al. ³⁴
<i>PTPN22</i>	1p13.3-13.1	R620W	1.91	9.1×10^{-74}	Stahl EA, et al. ³⁴
<i>PADI4</i>	1p36	rs2240340	1.14	7.5×10^{-5}	Hou S, et al. ⁴⁷ ; Too CL, et al. ⁴⁸ ; Iwamoto T, et al. ⁴⁹
<i>TRAF1-C5</i>	9q33-34	rs10818488	1.28	1.40×10^{-8}	Kurreaman FA, et al. ⁵¹
		rs3761847	1.13	0.001	Plenge RM, et al. ⁵² Zhang X, et al. ⁵⁴
<i>CTLA4</i>	2q33	rs3087243	0.44	1×10^{-9}	Stahl EA, et al. ³⁴
		rs231775	1.16	0.002	Li X, et al. ⁵⁷ ; Lee YH, et al. ⁵⁸
<i>STAT4</i>	2q32.2	rs7574865	1.32	2.81×10^{-7}	Remmers EF, et al. ⁶¹
		rs13426947	1.15	7.2×10^{-10}	Eyre S, et al. ⁶² ; Gu E, et al. ⁶³ ; Zheng J, et al. ⁶⁴ ; Liang YL, et al. ⁶⁵
		rs2004640	1.14	0.003	Lien C, et al. ⁶⁶
<i>IRF5</i>	7q32	rs10488631	1.19	1.2×10^{-6}	Stahl EA, et al. ³⁴
		rs2004640	1.14	0.003	Jia X, et al. ⁷⁰
<i>FCRL3</i>	1q21-23	rs7528684	1.10	0.002	Song GG, et al. ⁷⁵
<i>TNFAIP3</i>	6q32	rs6920220	1.22	1×10^{-9}	Lee YH, et al. ⁸⁰
		rs10499194	1.25	6.7×10^{-4}	
<i>TNF-α</i>	6p21	-308G/A	1.62	3.6×10^{-5}	Song GG, et al. ⁸⁶
<i>miR-499</i>	20q11.22	rs3746444	1.62	0.001	Li K, et al. ⁹⁰
<i>CD28</i>	2q33	rs1980422	1.11	1.3×10^{-9}	Raychaudhuri S, et al. ¹⁰³
<i>CD40</i>	20q12-q13.2	rs4810485	0.87	8.2×10^{-9}	Raychaudhuri S, et al. ¹⁰⁴
<i>FCGR3A</i>	1q23	158V/F	1.25	0.01	Eyre S, et al. ³³
<i>TYK2</i>	19p13.2	rs34536443	0.62	2.3×10^{-14}	Eyre S, et al. ³³
<i>IRAK1</i>	Xq28	rs13397	1.27	1.2×10^{-12}	Eyre S, et al. ³³

receptores de citocinas, quimiocinas, receptores de tipo Fc, integrinas, transductores de señales (cinasas, entre otros), *miR-146a* y *miR-499*, entre otros, de los cuales se darán mayores detalles más adelante (Tabla 1)^{5,7-10,21,28,29}.

Genes asociados a AR

HLA de clase II

El principal factor de riesgo genético asociado a AR se localiza en la citobanda 6p21. Esta región comprende 3.6 Mb y se divide en diversos genes del HLA de clase I, II y III (los genes del HLA de clase III no codifican moléculas presentadoras de antígenos)^{29,30}. Se

ha documentado que el HLA-II contribuye hasta en una tercera parte de componente genético asociado con la susceptibilidad a AR. Los estudios recientes indican que este porcentaje está sobreestimado. Los datos indican que el *HLA-DRB1* contribuye sólo en un 11%²⁸⁻³⁰. Los genes de HLA-I y II son altamente polimórficos, codifican para proteínas de superficie celular heterodiméricas y tienen como función primaria unirse a péptidos propios o extraños cortos y presentarlos a los linfocitos T CD8+ y CD4+, respectivamente³¹. En ambos casos, la unión de los péptidos y su presentación en la superficie celular por medio del HLA son un requerimiento indispensable para la formación del complejo trimolecular péptido-HLA-receptor de células

T (TCR), el cual lleva a la activación de las células T³¹. En 1978, Stastny P. identificó, a través de un estudio de gen candidato, que el 78% de los pacientes con AR fueron positivos al HLA-DRw4 en comparación con el 28% de los controles sanos; posteriormente, se identificaron múltiples alelos dentro del *HLA-DRB1* compartidos en pacientes con AR; a nivel de secuencia de aminoácidos, tuvo como resultado un epítopo compartido³². Esta secuencia de aminoácidos localizada en las posiciones 70-74 de los aminoácidos QKRAA, QRRAA o RRRRAA de la tercera región hipervariable de la cadena DR- β 1 se asocia con alto riesgo a AR³². La *odds ratio* (OR) para el este epítopo es de 4.37³². Por otro lado, varios GWAS y metaanálisis han identificado y confirmado, respectivamente, la asociación de varios SNP del *HLA-DRB1* con AR; uno de ellos, el rs6910071A/G confiere un riesgo de 2.88, y una asociación genética de 1×10^{-299} , mientras que el rs17878703, localizado en la posición 11 de la secuencia peptídica del *HLA-DRB1*, muestra una asociación de $p < 10^{-677}$ ^{33,34}.

PTPN22

El gen *PTPN22*, localizado en la citobanda 1p13.3-13.1, representa el segundo *loci* de susceptibilidad de mayor importancia que se asocia con la AR (sólo después del *HLA-II*)³⁵. El *PTPN22* (conocida también como proteína LYP), o proteína tirosina fosfatasa no receptor 22, pertenece a la familia de proteínas tirosinas fosfatasa (PTP), implicadas en la regulación negativa de la señalización mediada por el TCR^{35,36}. Las tirosinas cinasas y las PTP regulan la transducción de señales de un amplio grupo de procesos fisiológicos, incluida la respuesta inmunológica³⁷. Las alteraciones en las PTP provocan anomalías inmunológicas y diversas enfermedades humanas³⁵⁻³⁷.

Un estudio de gen candidato y un GWAS realizados en 2004 identificaron un SNP no sinónimo C1858T en el codón R620W (cambia el aminoácido arginina por triptófano y se localiza en el exón 14) de *PTPN22* que se asociaba con diabetes *mellitus* tipo 1, AR y lupus eritematoso sistémico (LES)³⁸. Estudios posteriores mostraron una asociación entre este SNP y otras EA³⁷. La sustitución de este aminoácido se localiza en el dominio de poliprolina; se localiza en el dominio de poliprolina (involucrado en la unión de Pep-Csk) de LYP, como consecuencia, la variante 620W muestra una reducida interacción con Csk³⁷. Un estudio reciente muestra que el alelo T del SNP 1858 genera una pérdida de función y lleva a una expansión de células T de memoria, efectoras, y a una predisposición a desarrollar autoinmunidad³⁹.

Múltiples estudios en diferentes grupos étnicos han reportado la asociación de esta variante con la AR; los valores de OR van desde 1.3 hasta 2.13. El alelo T se presenta con mayor frecuencia en pacientes con factor reumatoide (RF) positivo que en pacientes con RF negativo. En población europea este alelo presenta valores de OR de 1.423 y un valor de $p = 1.0 \times 10^{-9}$, y los no europeos tienen una OR de 1.902 y un valor de $p = 2.8 \times 10^{-8}$ ^{37,40,41}. Un metaanálisis confirmó rotundamente la asociación del alelo T con susceptibilidad a AR (OR: 1.94; $p = 91 \times 10^{-74}$)³⁴. En la población mexicana, el alelo T se asoció con susceptibilidad a AR: OR: 2.83 y $p = 0.001$; asimismo, se observó que los pacientes cero positivos para anticuerpos antipeptidos cíclicos citrulinados (anti-CCP) tenían un mayor riesgo para AR: OR: 2.5 y $p = 0.008$ ⁴².

PADI4

El gen *PADI4*, localizado en la región 1p36 (región previamente ligada a AR), codifica para la enzima peptidil arginina deaminasa 4, que cataliza la conversión proteica de residuos de arginina a citrulina, generando proteínas citrulinadas⁴³. Este fenómeno puede causar la pérdida de tolerancia inmunológica y originar la síntesis de anti-CCP. La identificación de anti-CCP ha servido para proporcionar un diagnóstico y pronóstico certero en la AR^{44,45}. Esta enzima se ha observado sobreexpresada en el líquido sinovial y el tejido sinovial de pacientes con AR⁴⁴. Un estudio de gen candidato identificó varios SNP (*PADI4_89*, *PADI4_90*, *PADI4_92* y *PADI4_104*) de *PADI4* involucrados con riesgo de AR. Además, se identificó un haplotipo de *PADI4* (se asoció con susceptibilidad) que afectaba a la estabilidad del transcrito y se asoció con altos niveles de anticuerpos contra péptidos citrulinados en el suero de individuos con AR⁴⁶. El SNP de *PADI4* que mostró una fuerte asociación con AR en japoneses fue el rs2240340A/G ($p = 0.000008$). Otros GWAS o metaanálisis han identificado y confirmado la asociación de este gen con AR en asiáticos, pero no en europeos (OR: 1.14; $p = 0.000075$)^{28,33,47-49}. Un estudio en México no mostró asociación entre este gen y AR⁵⁰. De esta manera, este gen confiere riesgo a AR, de una manera dependiente del grupo étnico, y sólo las poblaciones asiáticas muestran una asociación entre este gen y la AR.

TRAF1-C5

Un estudio de gen candidato realizado en 2007 identificó la región genómica donde se encuentra

TRAF1 (factor asociado 1 al receptor del factor de necrosis tumoral)-*C5* (componente del complemento 5) asociado con AR⁵¹. *TRAF1* codifica una proteína intracelular que media la transducción de señal del TNF- α y que está involucrada en la proliferación y activación de células T^{51,52}. *C5* es un miembro clave de la vía del complemento; algunos estudios han mostrado que la inflamación sostenida se correlaciona con niveles aumentados de *C5* en el fluido sinovial de los pacientes con AR⁵¹⁻⁵³.

El primer SNP de la región donde se localiza *TRAF1-C5* en asociación con AR fue el rs10818488G/A. El estudio mostró que el alelo A confería susceptibilidad y se asociaba con la gravedad de la enfermedad (OR: 1.28; $p = 1.40 \times 10^{-9}$). El alelo A crea un sitio de unión para EP300, una proteína que regula la transcripción a través de la remodelación de la cromatina⁵¹. Posteriormente, un GWAS identificó otros SNP localizados en esta región que se asociaban con la AR. El SNP principalmente asociado con la AR fue el rs3761847A/G ($p = 1 \times 10^{-14}$)⁵². La asociación de varios polimorfismos de esta región con la AR ha sido inmensamente replicada en las poblaciones europeas, asiáticas, norteamericanas y africanas. Un metaanálisis reciente, que incluye datos de asiáticos, caucásicos, africanos y suramericanos, ha arrojado una OR de 1.13 y un valor de $p < 0.001$ ⁵⁴.

CTLA4

Otro gen que ha mostrado asociación con AR es *CTLA4*; este *locus* se localiza en la región 2q33 y codifica para el antígeno 4 del linfocito T citotóxico. La función de la proteína CTLA4 es regular negativamente la activación de células T mediante dos mecanismos: la señalización negativa y el antagonismo competitivo de la vía de la coestimulación mediada por CD28/B7; incluso se ha desarrollado una terapia anti-CTLA4 cuyo objetivo es unirse a la B7 (molécula coestimuladora) y evitar la señal de activación de las células T⁵⁵.

Mediante estudios de gen candidato y posteriormente GWAS, se identificaron diferentes SNP asociados con la AR, principalmente en caucásicos^{52,56}. Un metaanálisis de GWAS identificó rotundamente la asociación del SNP rs3087243 (CT60) de *CTLA4* con la AR (OR: 0.44; $p = 1 \times 10^{-9}$)³⁴. Otro SNP de *CTLA4* que ha sido analizado constantemente en diferentes poblaciones es el 49A/G (rs231775). Los datos indican que el SNP 49A/G se asocia con riesgo de AR en asiáticos (OR: 1.16; $p = 0.002$), pero no en europeos^{57,58}. Dos

estudios realizados en pacientes con AR del Occidente de México identificaron que el alelo A del SNP +49A/G confiere riesgo de desarrollar AR (OR: 1.45; $p = 0.01$), mientras que el SNP CT60 se ha asociado con protección (OR: 0.61; $p = 0.024$)^{59,60}.

STAT4

STAT4, localizado en la citobanda genética 2q32.2, codifica para el factor de transcripción denominado transductor de señales y activador de la transcripción 4, el cual transmite señales inducidas por varias citocinas, incluidas la interleucina 12, la interleucina 23 y el interferón 1. *STAT4* está implicado en la diferenciación y proliferación de células Th1 y Th7, cruciales en el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes⁶¹. Un estudio de gen candidato identificó cuatro SNP (todos con un alto desequilibrio de ligamiento) localizados en el intrón 3 de *STAT4* que se asociaban con AR y LES⁶¹. El SNP que mostró mayor evidencia de asociación con AR fue el rs7574865G/T (OR: 1.32; $p = 2.81 \times 10^{-7}$)⁶¹. Éste y otros SNP (por ejemplo, el SNP rs134269947A/G confiere un OR de 1.15, $p = 7.2 \times 10^{-10}$) de *STAT4* se han asociado con AR, LES, esclerosis sistémica y síndrome de Sjögren; y, mediante GWAS y metaanálisis, se ha confirmado su asociación con la AR en diversas poblaciones⁶²⁻⁶⁵. Un metaanálisis realizado en 2013 identificó que el SNP rs7574865G/T se asociaba con AR en latinoamericanos (OR: 1.36; $p = 0.008$)⁶⁶.

IRF5

Este gen, localizado en la citobanda genómica 7q32, codifica para el factor regulador del interferón 5 (IRF-5), el cual pertenece a la familia de factores de regulación de interferón. Entre sus funciones se encuentran regular el ciclo celular, la apoptosis y la respuesta inmunológica e inflamatoria mediante la inducción de diferentes citocinas proinflamatorias, que son fundamentales en la fisiopatología de la AR⁶⁷⁻⁶⁹.

IRF5 contiene varios polimorfismos; algunos de ellos son el rs2004640T/G, el rs729302A/C y el rs752637A/G (todos son funcionales). Varios de ellos han sido identificados y asociados, mediante estudios de gen candidato o GWAS, con AR y otras EA, principalmente LES y EM^{28,70,71}.

El genotipo G/G del SNP rs2004640T/G se correlaciona con una isoforma de IRF-5 que incluye los exones 1A y 1C, mientras que los que llevan el alelo T se correlacionan con un transcrito que lleva los exones

1A, 1B y 1C; los transcritos constitutivos son los que llevan los exones 1A y 1B, y se expresan en las células dendríticas plasmacitoides y las células B, mientras que los transcritos que llevan el exón 1C son inducibles por el interferón de tipo 1. Se ha propuesto que las anomalías en los transcritos de *IRF5* debido a estas variantes pueden conferir riesgo de desarrollar AR⁷⁰. Este SNP se ha analizado mediante un metaanálisis cuyos resultados muestran a esta variante con riesgo de AR (OR: 1.14; $p = 0.003$)⁷⁰. Un segundo metaanálisis en AR, donde se evaluaron los SNP rs-2004640T/G, rs729302A/C y rs752637A/G de *IRF5*, mostró una asociación con susceptibilidad de cada uno de ellos en diferentes grupos étnicos, especialmente en europeos y asiáticos⁶⁹. Otro SNP de *IRF5* identificado a través de un metaanálisis de GWAS reportó una asociación entre el rs10488631T/C y la AR (OR: 1.19; $p = 1.2 \times 10^{-6}$)³⁴.

FCRL3

FCRL3 está localizada en la citobanda genómica 1q21-23 y codifica para la proteína 3 parecida al receptor γ de la fracción cristalizante de inmunoglobulinas; su función es regular la activación de las células B a través de dos motivos: la activación o la inhibición basada en tirosinas⁷². Kochi, et al., en 2005, realizaron un mapeo fino de la región 1q21-23, por medio de marcadores genéticos de tipo SNP, en pacientes japoneses con AR, LES y tiroiditis autoinmune. Los resultados mostraron que el SNP -169T/C (rs7528684) se asociaba con susceptibilidad a desarrollar estas tres EA; en AR mostró una OR de 2.15 y un valor de $p = 0.0000085$ ⁷³. A pesar del resultado robusto de la asociación genética en esta población, otras poblaciones no replicaron la asociación entre este SNP funcional que altera la afinidad de unión al factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) y se asocia con mayores niveles de expresión de *FCRL3* y AR, excepto las poblaciones asiáticas. Dos metaanálisis recientemente publicados muestran que el SNP -169T/C se asocia de manera específica en las poblaciones asiáticas (OR: 1.101; $p = 0.002$)^{74,75}. Un estudio publicado en 2013, en nuestra población, mostró que el alelo C del SNP -169T/C se asociaba con la protección a desarrollar artritis reumatoide juvenil (ARJ), y tal asociación fue dependiente del género (en varones, OR: 0.57; $p = 0.003$)⁷⁶. Es necesario evaluar el papel del alelo C del SNP -169T/C de *FCRL3* en nuestra población, para determinar si está asociado con AR, ya sea con susceptibilidad o protección.

TNFAIP3

El gen *TNFAIP3*, que se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6, en la banda citogenética q23, codifica para la proteína 3 inducida por el TNF- α (TNFAIP3, también conocida como A20); y su función es regular negativamente la señalización de NF- κ B en respuesta a múltiples estímulos, e inhibe la inflamación y apoptosis inducida por TNF- α ⁷⁷. Un estudio mostró la expresión de TNFAIP3 en la membrana sinovial de humanos y en varios tipos celulares que desempeñan papeles importantes en la fisiopatología de la AR, como los sinoviocitos, los linfocitos y los fibroblastos⁷⁸.

Diversos estudios genéticos han identificado que el gen *TNFAIP3* se asocia con AR y otras EA⁷⁹⁻⁸². Un metaanálisis realizado en pacientes con AR muestra que el SNP rs6920220A/G se asocia con susceptibilidad (OR: 1.22; $p = 1 \times 10^{-9}$). Los datos en población europea muestran a este mismo SNP asociado con susceptibilidad (OR: 1.23; $p = 1 \times 10^{-9}$). Este mismo metaanálisis muestra que el SNP rs10499194C/T se asocia con AR, específicamente en población asiática (OR: 1.25; $p = 6.7 \times 10^{-4}$)⁸⁰.

TNF- α

El TNF- α es probablemente la citocina multifuncional más importante en la AR²¹. Esta proteína es producida por el gen *TNF- α* , el cual se localiza en la banda citogenética 6p21, región ligada a diversas EA²¹. Esta citocina regula diversos efectos biológicos, entre los que se incluyen los siguientes: expresión de diversos genes, como IL-1, IL-6, metaloproteasas y moléculas de adhesión, proliferación, regulación de la apoptosis, activación celular e inducción de anticuerpos, que se asocian con la inflamación, la destrucción del cartilago y la erosión del hueso de los individuos con AR²¹. Los pacientes con AR presentan niveles elevados de esta citocina en las células mononucleares, el líquido sinovial, la membrana sinovial, el plasma y el suero, entre otros fluidos, cuando se comparan con individuos sanos²¹.

Los estudios de gen candidato han identificado que hay variantes genéticas localizadas en la región promotora de este gen que se asocian con la susceptibilidad, la gravedad y la respuesta al tratamiento en pacientes con AR, como el SNP funcional -308G/A^{21,83}. En nuestra población este SNP no se ha asociado con la susceptibilidad a AR, pero sí con la gravedad⁸⁴. Por otro lado, esta variante se asocia con la susceptibilidad a ARJ; la estratificación por género mostró en mujeres una OR mayor a 4 y un valor de $p = 0.0002$ ⁸⁵. Un metaanálisis publicado este año mostró que el

alelo A del rSNP -308G/A de *TNF- α* no se asocia con la susceptibilidad en europeos y asiáticos, pero sí en latinoamericanos (OR: 1.62; $p = 3.6 \times 10^{-5}$)⁸⁶.

miARN

Actualmente, los microARN (miARN) han sido blanco de estudio en diversas enfermedades, como diferentes tipos de cánceres, enfermedades cardiovasculares y EA, incluida la AR⁸⁷⁻⁹². Los miARN se producen del ADN, como ARN no codificantes largos, y se denominan primarios (pri-miARN); posteriormente, diversas ARNsas en el núcleo producen miARN precursores de aproximadamente 70 nucleótidos, y, finalmente, otras ARNsas localizadas en el citoplasma producen las formas maduras de los miARN, de 18-22 nucleótidos de longitud, entre cuyas funciones principales se encuentra regular la represión de la traducción y la degradación de diversos miARN; de esta manera, los miARN regulan importantemente procesos inflamatorios, apoptóticos, de activación del sistema inmunológico y otros eventos biológicos⁸⁷⁻⁸⁹. Se han reportado alteraciones de tipo SNP en estos genes; dichas variantes pueden afectar a su estructura y al procesamiento de pri-miARN a miARN, alterando, en última instancia, la unión con sus miARN blanco y su función biológica⁹⁴⁻⁹⁶. Algunos SNP localizados en *miR-146a* y *miR-499* se han asociado con AR en diferentes poblaciones⁹⁷⁻⁹⁹. Dos metaanálisis evaluaron la importancia de dos SNP en los miR-146a (rs2910164G/C) y miR-499 (rs3746444G/A) en AR. El primer metaanálisis reportó que el SNP rs2910164G/C no mostró asociación con AR, mientras que el SNP rs3746444G/A del *miR-499* se asoció con susceptibilidad (G vs. A; OR: 1.62; $p = 0.01$). El segundo metaanálisis mostró una asociación entre el SNP rs3746444G/A de *miR-499* y la AR, sobre todo en poblaciones asiáticas^{100,101}. Un estudio realizado en población mexicana con ARJ reportó que el SNP rs2910164G/C del *miR-146a* no se asoció con esta enfermedad, pero sí con asma pediátrico. Es necesario evaluar esta variante genética en pacientes con AR de nuestra población para determinar si es un factor de susceptibilidad importante en la patogénesis de esta EA¹⁰².

Otros genes que han mostrado asociación genética con AR

Otros GWAS han identificado la asociación de diferentes *loci* que regulan el sistema inmunológico innato y adaptativo con AR, pero aún no hay muchos estudios

que evalúen la asociación y la repliquen en otras poblaciones. Entre estos genes se incluyen los siguientes: *CD28* (rs1980422C/T; OR: 1.11; $p = 1.3 \times 10^{-9}$)¹⁰³, *CD40* (rs4810485G/T; OR: 0.87; $p = 8.2 \times 10^{-9}$)¹⁰⁴, *FCGR3A* (el SNP funcional del codón 158V/F, valina por fenilalanina; OR: 1.25; $p = 0.01$)¹⁰⁵, *TYK2* (rs34536443C/G; OR: 0.62; $p = 2.3 \times 10^{-14}$) e *IRAK1* (rs13397A/G; OR: 1.27; $p = 1.2 \times 10^{-12}$), entre otros³³.

Conclusiones

El desarrollo de la AR está fuertemente influenciado por múltiples factores ambientales y genéticos de riesgo. Los avances en genética y genómica de la última década han sido impresionantes; los estudios de gen candidato o GWAS han ayudado a identificar diversos *loci* de susceptibilidad implicados en la patogénesis de esta EA. Diversas variantes genéticas, principalmente de tipo SNP, localizadas en diferentes genes que producen proteínas o ARN no codificantes y que regulan el sistema inmunológico innato y adaptativo, se han asociado con la susceptibilidad de la AR. Entre los genes identificados que causan susceptibilidad a AR se encuentran el *HLA* de clase II, *PTPN22*, *STAT4*, *PADI4*, *FCRL3*, *TNFAIP3*, *CTLA4*, *TRAF1-C5*, *TNF- α* y *miARN*, entre otros. Por otro lado, los estudios genéticos/genómicos nos han ayudado a comprender mejor la distribución de ciertos alelos, genotipos y haplotipos, y cómo éstos se asocian con la susceptibilidad y/o protección a AR en diversas poblaciones. Finalmente, los estudios funcionales en genes que producen proteínas y ARN no codificantes y que regulan la respuesta inmunológica innata y adaptativa nos han ayudado a comprender mejor el efecto de dichos alelos de diversos SNP en la expresión génica, la traducción, el *splicing* alternativo y la estabilidad y degradación de los miARN o la unión de éstos con sus blancos. Es importante evaluar la distribución alélica y genotípica de los diferentes SNP en los genes que aún no han sido analizados en nuestra población, para determinar su papel en la susceptibilidad de la AR.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Hospital Juárez de México las facilidades proporcionadas para realizar este trabajo.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses respecto a esta revisión.

Bibliografía

- Holmdahl R, Malmström V, Burkhardt H. Autoimmune priming, tissue attack and chronic inflammation – the three stages of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 2014;44(6):1593-9.
- De Hair MJ, Landewe RB, van de Sande MG, et al. Smoking and overweight determine the likelihood of developing rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(10):1654-8.
- Bischoff-Delgado S, Stross ES, Tak PP. Critical determinants of cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des*. 2011;17(1):21-6.
- Gorman CL, Cope AP. Immune-mediated pathways in chronic inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2008;22(2):221-38.
- Corbelli A, Nahid MA, Satoh M, Chan EK. MicroRNAs in rheumatoid arthritis. *FEBS Lett*. 2011;585(23):3667-74.
- Cope A. Rheumatoid arthritis. En: Rich R, et al., eds. *Clinical Immunology*. Nueva York: Elsevier; 2007. p. 52.1-52.21.
- Barton A, Worthington J. Genetic susceptibility to rheumatoid arthritis: an emerging picture. *Arthritis Rheum*. 2009;61(10):1441-6.
- Gregersen PK. Susceptibility genes for rheumatoid arthritis: a rapid expanding harvest. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2010;68(3):179-82.
- Okada Y, Wu D, Trynka G, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature*. 2014;506(7488):376-81.
- Hashemi M, Eskandari-Nasab E, Zakeri Z, et al. Association of pre-miRNA-146a rs2910164 and pre-miRNA-499 rs3746444 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Mol Med Rep*. 2013;7(1):287-91.
- Gabriel SE. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2001;27(2):269-81.
- Poláček-Balkešová I, Sanin LH, Moreno-Montoya J, et al. Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *J Rheumatol Suppl*. 2011;36:3-8.
- Karlfson EW, Deane K. Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2012;38(2):405-26.
- Colebatch AN, Edwards CJ. The influence of early life factors on the risk of developing rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2011;163(1):11-6.
- Scott DE, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010;376(9745):1094-103.
- Marston B, Palanichamy A, Anolik JH. B cells in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2010;22(3):307-15.
- Wang Q, Ma Y, Liu D, Zhang L, Wei W. The roles of B cells and their interactions with fibroblast-like synoviocytes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2011;155(3):205-11.
- Lowin T, Straub RH. Integrins and their ligands in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(5):244.
- Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51 Suppl 5:v3-11.
- Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients. *FEBS J*. 2008;275(18):4448-55.
- Fragoso JM, Vargas Alarcón G, Jiménez Morales S, Reyes Hernández OD, Ramírez Bello J. [Tumor necrosis factor alpha (TNF-α) in autoimmune diseases (AIDs): molecular biology and genetics]. *Gac Med Mex*. 2014;150(4):334-44.
- Keller J, Probert L, Cazarán H, et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J*. 1991;10(13):4025-31.
- Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet*. 1989;2(8567):244-7.
- Ferraccioli G, Bracci-Laudiero L, Alivernini S, Gremese E, Toluoso B, De Benedetti G. Interleukin-1β and interleukin-6 in arthritis animal models: role in the early phase of transition from acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis. *Mol Med*. 2010;16(11-12):562-7.
- Müller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2005;1(2):102-10.
- Benedetti G, Miossec P. Interleukin 17 contributes to the chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 2014;44(2):339-47.
- Jänvnen P, Aho K. Twin studies in rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum*. 1994;24(1):19-28.
- Kurko J, Beesmyer T, Lask J, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z. Genetics of rheumatoid arthritis – a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;45(2):170-9.
- Balsa A, Cabezon A, Orozco G, et al. Influence of HLA DRB1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid factor. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(2):R62.
- Bowes J, Barton A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(4):399-402.
- Taylor M, Hussain A, Urayama K, et al. The human major histocompatibility complex and childhood leukemia: an etiological hypothesis based on molecular mimicry. *Blood Cells Mol Dis*. 2009;42(2):129-35.
- Bax M, van Heerst J, Huizinga TW, Toes RE. Genetics of rheumatoid arthritis: what's here we're hearing? *Immunogenetics*. 2011;63(8):459-66.
- Eyre S, Bowes J, Diogo D, et al. High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2012;44(12):1336-40.
- Saiki EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet*. 2010;42(6):508-14.
- Foster G, Liossis SN, Battaglia M. Roles of the protein tyrosine phosphatase PTPN22 in immunity and autoimmunity. *Clin Immunol*. 2013;149(3):566-65.
- Alonso A, Sasin J, Bottini N, et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. 2004;117(6):699-711.
- Burn GL, Swenson L, Sánchez-Blanco C, Saini M, Cope AP. Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? *FEBS Lett*. 2011;585(23):3699-98.
- Stanford SM, Mustelin TM, Bottini N. Lymphoid tyrosine phosphatase and autoimmunity: human genetics rediscovers tyrosine phosphatases. *Semin Immunopathol*. 2010;32(2):127-36.
- Salmond RJ, Browlie RJ, Morrison VL, Zamovska R. The tyrosine phosphatase PTPN22 discriminates weak self peptides from strong agonist TCR signals. *Nat Immunol*. 2014;15(9):875-83.
- Song GG, Bae SC, Kim JH, Lee YH. The PTPN22 C1858T polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2013;33(8):1991-9.
- Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. The association between the PTPN22 C1858T polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis update. *Mol Biol Rep*. 2012;39(4):3453-60.
- Torres-Carrillo NM, Ruiz-Noa Y, Martínez-Bonilla GE, et al. The +1858C/T PTPN22 gene polymorphism confers genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in Mexican population from the Western Mexico. *Immunol Lett*. 2012;147(1-2):41-6.
- Vossenaar ER, Zandman AJ, van Venrooij, Pruijn GJ. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays*. 2003;25(11):1106-18.
- Quirke AM, Fisher BA, Kinloch AJ, Venables PJ. Citrullination of autoantigens: upstream of TNFα in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *FEBS Lett*. 2011;585(23):3681-8.
- Harney SM, Meisel C, Sims AM, Woon PY, Wordsworth BP, Brown MA. Genetic and genomic studies of PAD14 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44(7):869-72.
- Suzuki A, Yamada R, Chang X, et al. Functional haplotypes of PAD14, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2003;34(4):395-402.
- Hou S, Gao GP, Zhang XJ, et al. PAD14 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mod Rheumatol*. 2013;23(1):50-60.
- Too CL, Murad S, Dhaliwal JS, et al. Polymorphisms in peptidylarginine deiminase associate with rheumatoid arthritis in diverse Asian populations: evidence from MyEIRA study and meta-analysis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(6):R250.
- Iwamoto T, Ikan K, Nakamura M, et al. Association between PAD14 and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45(7):804-7.
- Zavala-Cerna MG, Gonzalez-Montoya NG, Nava A, et al. PAD14 haplotypes in association with RA Mexican patients, a new prospect for antigen modulation. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:383681.
- Kurreeman FA, Padyukov L, Marques RB, et al. A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Med*. 2007;4(9):e278.
- Pfenge RM, Seielstad M, Padyukov L, et al. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis – a genome wide study. *N Engl J Med*. 2007;357(12):1199-209.
- Aron JR, Pevzner Jung Y, Walsh MC, Kobayashi T, Choi Y. Regulation of the subcellular localization of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF2) by TRAF1 reveals mechanisms of TRAF2 signaling. *J Exp Med*. 2002;196(7):923-34.
- Zhang X, Li W, Zhang X, et al. Association between polymorphism in TRAF1/C5 gene and risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2014;41(1):317-24.
- Watanabe N, Nakajima H. Coinhibitory molecules in autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:269756.
- Viatte S, Plant D, Raychaudhuri S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2013;9(3):141-53.
- Li X, Zhang C, Zhang J, et al. Polymorphisms in the CTLA-4 gene and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis. *J Clin Immunol*. 2012;32(3):530-9.
- Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Association between the CTLA-4 +49A/G polymorphism and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2012;39(5):5599-605.
- Muñoz-Valle JF, Valle Y, Padilla-Gutiérrez JR, et al. The +49A/G CTLA-4 polymorphism is associated with rheumatoid arthritis in Mexican population. *Clin Chim Acta*. 2010;411(9-10):725-8.
- Torres-Carrillo N, Ontiveros-Mercado H, Torres-Carrillo NM, et al. The -319C/+49G/CT60G haplotype of CTLA-4 gene confers susceptibility to rheumatoid arthritis in Mexican population. *Cell Biochem Biophys*. 2013;67(3):1217-28.
- Remmers EF, Pfenge RM, Lee AT, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2007;357(10):977-86.
- Eyre S, Bowes J, Diogo D, et al. High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2012;44(12):1336-40.
- Gu E, Lu J, Xing D, et al. Rs7574865 polymorphism in signal transducers and activators of transcription 4 gene and rheumatoid arthritis: an update meta-analysis of 28 case-control comparisons. *Int J Rheum Dis*. 2015;18(1):3-16.
- Zheng J, Yin J, Huang R, Petersen F, Yu X. Meta-analysis reveals an association of STAT4 polymorphisms with systemic autoimmune disorders and anti-dsDNA antibody. *Hum Immunol*. 2013;74(8):986-92.
- Liang YL, Wu H, Shen X, et al. Association of STAT4 rs7574865 polymorphism with autoimmune disease: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2012;39(9):8873-82.
- Lien C, Fang CM, Huso D, Livak F, Lu R, Pitha PM. Critical role of IRF5 in regulation of B-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(10):4664-8.
- Krausgruber T, Blazek K, Smallic T, et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1/TH17 responses. *Nat Immunol*. 2011;12(3):231-8.
- Barnes BJ, Kallum MJ, Pinder KE, Frisanchi JA, Pitha PM. Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death. *Cancer Res*. 2003;63(19):6424-31.
- Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Association between interferon regulatory factor 5 polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2013;40(2):1791-9.
- Jia X, Hu M, Lin Q, Ren H. Association of the IRF5 rs2004640 polymorphism with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2013;33(11):2757-61.
- Carmona FD, Martín JE, Beretta L, et al. The systemic lupus erythematosus IRF5 risk haplotype is associated with general sclerosis. *PLoS One*. 2013;8(1):e54419.
- Chistiakov DA, Chistiakov AP, Is FCRL3 a new genetic autoimmunity gene? *Hum Immunol*. 2007;68(5):375-83.
- Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, et al. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nat Genet*. 2005;37(5):478-85.
- Lee YH, Woo JH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Fc receptor-like 3-169C/T polymorphism and RA susceptibility: a meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2010;30(7):947-53.
- Song GG, Bae SC, Kim JH, et al. Association between functional Fc receptor-like 3 (FCRL3)-169C/T polymorphism and susceptibility to seropositive rheumatoid arthritis in Asian: a meta-analysis. *Hum Immunol*. 2013;74(9):1208-13.
- Ramírez Bello J, Jiménez Morales S, Espinosa Rosales F, et al. Juvenile rheumatoid arthritis and asthma, but not childhood-onset systemic lupus erythematosus are associated with FCRL3 polymorphisms in Mexicans. *Mol Immunol*. 2013;53(4):374-8.
- Verecke L, Beyaert R, van Loo G. The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends Immunol*. 2009;30(6):383-91.
- Elshly LM, Orozco G, Denton J, Worthington J, Ray DW, Donn RP. Functional evaluation of TNFAIP3 (A20) in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2010;28(5):708-14.
- Zhang X, Li W, Zhang X, et al. Single nucleotide polymorphisms in TNFAIP3 were associated with the risks of rheumatoid arthritis in northern Chinese Han population. *BMC Med Genet*. 2014;15:56.
- Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between TNFAIP3 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Inflamm Res*. 2012;61(6):635-41.
- Lee YH, Song GG. Associations between TNFAIP3 gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012;16(9):1105-10.
- Musone SL, Taylor KE, Nitham J, et al. Sequencing of TNFAIP3 and association of variants with multiple autoimmune diseases. *Genes Immun*. 2011;12(3):176-82.
- Ramírez Bello J, Vargas Alarcón G, Tovilla Zárate C, Fragoso JM. [Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rsNP) and structural RNA (rsSNPs) in complex diseases]. *Gac Med Mex*. 2013;149(2):220-8.
- Rodríguez Carreón AA, Zúñiga J, Hernández Pacheco G, et al. Tumor necrosis factor-α -308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans. *J Autoimmun*. 2005;24(1):63-8.
- Jiménez Morales S, Velázquez Cruz R, Ramírez Bello J, et al. Tumor necrosis factor-α is a common genetic risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population. *Hum Immunol*. 2009;70(4):251-6.
- Song GG, Bae SC, Kim JH, Lee YH. Association between TNF-α promoter -308G polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2014;34(4):465-71.
- Velu VK, Ramesh R, Srinivasan AR. Circulating microRNAs as biomarkers in health and disease. *J Clin Diagn Res*. 2012;6(10):1791-5.
- Chen LL, Lim SH, Yeh YT, Lien SC, Chiu JJ. Roles of microRNAs in atherosclerosis and restenosis. *J Biomed Sci*. 2012;19(1):79.
- Zare-Shahabadi A, Renaudineau J, Rezaei N. MicroRNAs and multiple sclerosis: from physiopathology toward therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2013;17(12):1497-507.
- Igaz I, Szómy M, Varga P, Topa L. [Potential relevance of microRNAs in the diagnosis of inflammatory bowel diseases]. *Orv Hetil*. 2014;155(13):487-91.
- Yan S, Yin LY, Lu L, Lau CS, Chan VS. MicroRNA regulation in systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Immunu New*. 2014;14(3):138-48.
- Filková M, Jüngel A, Gay RE, Gay S. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: potential role in diagnosis and therapy. *Bio Drugs*. 2012;26(3):131-41.
- Ul-Hussain M. MicroRNAs (miRNAs): genomic organization, biogenesis and mode of action. *Clin Tissue Res*. 2012;349(2):405-13.
- Slaby O, Benetova-Vasou J, Svoboda M, Vyzula R. Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer. *J Cell Mol Med*. 2012;16(1):81-21.
- Song FJ, Chen KX. Single-nucleotide polymorphisms among microRNA: big effects on cancer. *Chin J Cancer*. 2011;30(6):381-91.
- Georges M, Coppeters W, Charlier C. Polymorphic miRNA mediates gene regulation: contribution to phenotypic variation and disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2007;17(3):166-76.
- El-Shal AS, Aly NM, Galil SM, Mostafa MA, Kandil WA. Association of microRNAs genes polymorphisms with rheumatoid arthritis in Egyptian female patients. *Joint Bone Spine*. 2013;80(6):626-31.
- Hashemi M, Eskandari-Nasab E, Zakeri Z, et al. Association of pre-miRNA-146a rs2910164 and pre-miRNA-499 rs3746444 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Mol Med Rep*. 2013;7(1):287-91.
- Chatzilyniakidou A, Voulgari PV, Georgiou I, Drosos AA. miRNAs and related polymorphisms in rheumatoid arthritis susceptibility. *Autoimmun Rev*. 2012;11(9):636-41.
- Li K, Tie H, Hu N, et al. Association of two polymorphisms rs2910164 in miRNA-146a and rs3746444 in miRNA-499 with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Hum Immunol*. 2014;75(7):602-8.
- Fu L, Jin L, Yan L, et al. Comprehensive review of genetic association studies and meta-analysis on miRNA polymorphisms and rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus susceptibility. *Hum Immunol*. 2016;77(1):1-6.
- Jiménez-Morales S, Gamboa-Becerra R, Baca V, et al. miR-146a polymorphism is associated with asthma but not with systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis in Mexican patients. *Tissue Antigens*. 2012;80(4):317-21.
- Raychaudhuri S, Thompson BP, Remmers EF, et al. Genetic variants at C22B3, PADI1 and C22D3D28 are associated with rheumatoid arthritis risk. *Nat Genet*. 2009;41(12):1313-8.
- Raychaudhuri S, Remmers EF, Lee AT, et al. Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2008;40(10):1216-23.
- Lee YH, Ji JD, Song GG. Associations between FCGR3A polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *J Rheumatol*. 2008;35(11):2129-35.



Evaluación de los polimorfismos -2578C/A, -154G/A y -634G/C del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) y su relación con la susceptibilidad a desarrollar artritis reumatoide en la población mestiza mexicana.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:00 horas del día 3 del mes de diciembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ
- DRA. MARIA DE LOS ANGELES AGUILAR SANTAMARIA
- DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO
- DR. HECTOR FERNANDO SERRANO

ANA KAREN RODRIGUEZ ELIAS
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ANA KAREN RODRIGUEZ ELIAS

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REV 100

DR. JOSE ANTONIO DE LOS REYES HEREDIA
SECRETARIO GENERAL

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

VOCAL

DRA. MARIA DE LOS ANGELES AGUILAR SANTAMARIA

VOCAL

DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO

SECRETARIO

DR. HECTOR FERNANDO SERRANO



Posgrado en
Biología Experimental