ASOCIACIÓN ENTRE MANIFESTACIONES CLINICAS DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES CON LOS POLIMORFISMOS DE PTPN22, STAT4, CTLA-4 EN POBLACIÓN COLOMBIANA

MARTHA RAMIREZ DE OLANO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA
BOGOTA DC. 2009

ASOCIACIÓN ENTRE MANIFESTACIONES CLINICAS DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES CON LOS POLIMORFISMOS DE PTPN22, STAT4, CTLA 4 EN POBLACION COLOMBIANA

MARTHA RAMIREZ DE OLANO
Codigo597803

Trabajo de grado para optar al título de
Magíster en Genética Humana

Directores
ANTONIO IGLESIAS GAMARRA MD. Reumatólogo
GERARDO QUINTANA MD. Reumatólogo MSc.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
MAESTRÍA GENETICA HUMANA
Bogotá D.C.2009

A mí madre Bertha
A mí, esposo Oscar
A mis hijos María Fernanda y Oscar Andrés

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a:

A mi familia especialmente a mi hermana Lilia, mis sobrinos Andy y Santiago por su gran colaboración.

A mi esposo, mis hijos y mi madre por su comprensión y aliento en los momentos difíciles.

A mi amiga Gloria Suarez por su apoyo incondicional.

Al director de tesis doctor Antonio Iglesias, por su confianza y su gran colaboración lo cual hizo posible este trabajo.

Al doctor Gerardo Quintana también director de esta tesis por sus consejos, asesoría y activa participación en el trabajo.

A los doctores Eduardo Egea y Gloria Garavito de la Universidad del Norte de Barranquilla por su gran colaboración al permitirme estudiar sus pacientes.

Al Comité del Instituto de Genética, por darme la gran oportunidad de ingresar a la maestría, y a todo el personal que de una u otra manera me ayudaron durante el éste arduo y maravilloso periodo.

A mis compañeras: Claudia, Jacqueline, María Eugenia, Carolina, Shirley y Diana, así como a Islena Bonilla por su gran ayuda, quienes hicieron de mi travesía por esta universidad un tiempo inolvidable.

Al doctor Javier Martin director del Laboratorio de Investigación en Autoinmunidad del Instituto de Parasitología López Neyra, Granada - España, por su ayuda económica como por la dirección del trabajo práctico de esta tesis. También a sus colaboradores Sofía,

Elena, Blanca, Ezequiel, Rogelio y especialmente a Gemma quien me enseñó y colaboro durante la ejecución de la parte técnica.

A los doctores Francisco Ruiz Cabello y José María Romero del Hospital Virgen de las Nieves, Granada- España por transmitirme sus conocimientos y permitirme trabajar con su grupo.

Al grupo de Reumatología de la Facultad de Medicina por sus enseñanzas.

Al doctor Fabio Aristizabal a Ivonne García y Claudia Cordero del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional.

Finalmente a la Universidad Nacional de Colombia por financiar esta tesis.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION **4**
1 MARCO TEORICO **6**
1.1 TOLERANCIA CENTRAL 7
1.2 TOLERANCIA PERIFÉRICA 10
1.3 ARTRITIS REUMATOIDE 13
1.3.1 Etiología 13
1.3.2 Características de la Enfermedad 13
1.3.3 Síntomas Clínicos 15
1.3.4 Aspectos Epidemiológicos 15
1.3.5 Diagnostico de la AR 16
1.3.6 Evolución 16
1.3.7 Tratamiento 17
1.3.8 Patogénesis y alteración de la respuesta inmune 18
1.4 Lupus eritematoso sistémico 26
1.4.1 Etiología 26
1.4.2 Características de la enfermedad 27
1.4.3 Síntomas Clínicos 28
1.4.4 Manifestaciones clínicas 29
1.4.5 Aspectos epidemiológicos 32
1.4.6 Criterios de Clasificación de LES 33
1.4.7 Tratamiento del LES 34
1.4.8 Bases Inmunológicas del LES 36
1.5 ESCLERODERMA 44
1.5.1 Etiología 44
1.5.2 Características de la enfermedad 44
1.5.3 Síntomas clínicos 46
1.5.4 Diagnóstico 47
1.5.5 Aspectos epidemiológicos 47
1.5.6 Evolución 48
1.5.7 Tratamiento 48

1.5.8 Patogenia y bases moleculares de Escleroderma 49
1.6 GENETICA DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES 58
1.6.1 Estudios de ligamiento 58
1.6.2 Estudios de asociación 60
1.6.3 Estudios de asociación del genoma completo 61
1.6.4 Polimorfismos de nucleótido solo (SNPs) 61
1.6.5 Selección de genes candidatos 62
1.7 GENES IMPLICADOS EN LA VIA DE SEÑALIZACION DEL RECEPTOR DE CELULAS T 63
1.7.1 *PTPN22* (Proteína Tirosina Fosfatasa No Receptor proteína 22) 63
1.7.2 Antígeno 4 asociado al Linfocito T Citotóxico (*CTLA-4*) 65
1.7.3 Transductor de señal y activador de transcripción (STAT 4) 68
2 OBJETIVOS 70
2.1 Objetivo General 70
2.2 Objetivos Específicos 70
3 METODOLOGÍA 71
3.1 Diseño del estudio 71
3.2 Definición de sujetos de estudio 71
3.3 Procedimientos 74
3.3.1 Extracción de muestras de sangre y aislamiento de linfocitos a partir de sangre periférica del paciente. 74
3.3.2 Extracción de ADN a partir de linfocitos de pacientes. 74
3.3.3 Genotipificación. 75
4 ANALISIS ESTADISTICO 79
5 RESULTADOS 80
5.1 Población estudiada 80
5.2 Genotipificación 80
5.3 Controles 81
5.4 Secuenciación 82
5.5 GENES ESTUDIADOS 82
5.5.1 PTPN22 82
5.5.2 CTLA 4 89
5.5.3 STAT 4 92

6 DISCUSION 97
6.1 PTPN22 97
6.2 CTLA 4 103
6.3 STAT4 105
7 CONCLUSIONES 109
8 PERSPECTIVAS 110
9 REFERENCIAS 112

LISTA DE FIGURAS

Figura *1. Establecimiento de la tolerancia Inmunológica y su falla* *6*
Figura 2. Un modelo unificado de tolerancia central en el timo.. ..... *9*
Figura 3. Articulaciones que pueden estar comprometidas. *13*
Figura 4. Radiografía de manos con Artritis Reumatoide *14*
Figura 5. Patogénesis de la artritis reumatoide. *18*
Figura 6. Vías que conducen a la activación de células T sinoviales en AR. *20*
Figura 7. Estimulación de las células B *21*
Figura 8. Formación de complejos inmunes *22*
Figura 9. Descripción de la regulación de interacciones sinoviales mediadas por citoquinas, en el contexto de la respuesta inmune. *23*
Figura 10. Órganos que se pueden afectar en LES *28*
Figura 11. Interacción entre célula T y célula B *38*
Figura 12. Presentación de autoantígenos: Señales, coestimulatoria (CD28/B7) y señal inhibitoria (CTLA4/B7) *39*
Figura 13. Resumen del perfil anormal de citoquinas en piel, riñón y sistema neurológico en el LES. *41*
Figura 14. Paciente con escleroderma, presenta fenómeno de Raynaud *45*
Figura 15. Patogénesis de autoinmunidad en ES *51*
Figura 16. Participación de las células T en la fibrosis de ES. MMP; mataloproteinasas de la matriz *55*
Figura 17. Imbalance de citoquinas: Se observa en pacientes con escleroderma *57*
Figura 18. Producción de anticuerpos; las células T deben interactuar con las células B para la producción de auto anticuerpos. Parece que la IL-1 se produce después que los anticuerpos se pegan a la célula. *57*
Figura 19. Principio de ligamiento. *59*
Figura 20. SNP. Transición de un solo nucleótido *62*
Figura 21. Estructura de PTPN22. ..... *63*
Figura 22. PTPN22: Regulación de la actividad de la tirosina quinasa LCK por PTPN22 ..... *65*
Figura 23. Vía de señalización de CTLA4. ..... *67*
Figura 24. Ubicación genómica del gen CTLA-4 ..... *68*
Figura 25. Señalización de IL-12 e IL-23: STAT4 transductor de señal *69*
Figura 26. AR Barranquilla: Edad actual, Edad de Inicio *72*
Figura 27. AR Barranquilla: Edad actual, Edad de inicio *72*
Figura 28. LES Barranquilla: Edad actual, Edad de inicio *73*
Figura 29. LES Barranquilla: Edad actual, Edad de inicio *73*
Figura 30. Controles Genotipificación Sondas de hibridación PTPN22 ..... *81*
Figura 31. Controles Genotipificación sondas Taqman (hidrolisis) *81*
Figura 32. Secuenciación (Resultados) *82*
Figura 33. Distribución Genotipica pacientes AR, LES y controles PTPN22 ..... *83*
Figura 34. Distribución genotípica pacientes AR, LES y controles CTLA4 ..... *89*
Figura 35. Distribución genotípica pacientes AR, LES y controles STAT4 ..... *92*

Figura 36. PTPN22: Ganancia de función 99
Figura 37. Mapa de Europa: Variación de la frecuencia demográfica para el alelo 1858T de PTPN22..... 100
Figura 38. A. Posible región de ligamiento, haplotipo y SNP de riesgo. B. isoformas de la molécula CTLA 4..... 104
Figura 39. Panel A: Pico de ligamiento identificado anteriormente en el cromosoma 2 para la presencia de los genes que podrían influir en la artritis reumatoidea. Panel B: Asociación para los 82 SNPs dentro de los genes candidatos seleccionados. 106
Figura 40. Región STAT1- STAT4..... 107

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Manifestaciones extra-articulares de AR..... 15
Tabla 2 Criterios del ACR para clasificación de AR 16
Tabla 3 Factores ambientales en la patogénesis de LES 27
Tabla 4.Criterios de clasificación de LES según el Colegio Americano de Reumatología 33
Tabla 5.Criterios de clasificación de la Escleroderma..... 47
Tabla 6. Evidencias de la participación de las células T en ES 52
Tabla 7. Genotipificaciones realizadas para cada gen, población y enfermedad. 80
Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C1858T de PTPN22 en controles y pacientes con AR 84
Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP C1858T en controles y pacientes con AR 85
Tabla 10. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP C1858T de PTPN22 en controles sanos 85
Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP c1858T en controles y pacientes con LES..... 86
Tabla 12. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP C1858T de PTPN22 en controles sanos 86
Tabla 13. Relación del polimorfismo C1858T de PTPN22 con manifestaciones de AR Barranquilla. 86
Tabla 14. Relación del polimorfismo C1858T de PTPN22 con manifestaciones de AR Bogotá. 87
Tabla 15. Relación del polimorfismo C1858T de PTPN22 con manifestaciones de AR Bogotá + AR Barranquilla..... 87
Tabla 16. Relación del polimorfismo C1858T de PTPN22 con manifestaciones de LES..... 88
Tabla 17. Relación del polimorfismo C1858T de PTPN22 con manifestaciones de LES..... 88
Tabla 18. Frecuencias alélicas y genotípicas de CTLA4 en pacientes con AR y controles sanos 90
Tabla 19. Frecuencias alélicas y genotípicas de CTLA4 en pacientes con AR y controles sanos 90
Tabla 20. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs3087243 de CTLA4 en pacientes ... 90
Tabla 21. Relación del polimorfismo rs3087243 de CTLA4 con manifestaciones de AR 91
Tabla 22. Relación polimorfismo rs3087243 de CTLA 4 con manifestaciones de LES. 91
Tabla 23. Relación polimorfismo rs3087243 de CTLA 4 con status de anticuerpos de LES. 91
Tabla 24. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs7574865 de STAT4 en controles 93
Tabla 25. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs7574865 de STAT4 en controles 93
Tabla 26. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs7574865 de STAT4 en controles sanos y 94
Tabla 27. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs7574865 de STAT4 en controles sanos y pacientes con LES por región. 95

Tabla 28. Relación del polimorfismo rs7574865 de STAT 4 con manifestaciones y status de anticuerpos en AR *95*
Tabla 29. Relación del polimorfismo rs7574865 de STAT 4 con manifestaciones de LES ... *95*
Tabla 30. Relación del polimorfismo rs7574865 de STAT 4 con status de anticuerpos en LES *96*
Tabla 31. Características de los estudios del Polimorfismo 1858T de PTPN22 y Enfermedades autoinmunes. *102*

FORMATO ÚNICO PARA ENTREGA DE LOS TRABAJOS DE GRADO

TÍTULO:
ASOCIACIÓN ENTRE MANIFESTACIONES CLINICAS DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES CON LOS POLIMORFISMOS DE PTPN22, STAT4, CTLA-4 EN POBLACIÓN COLOMBIANA

TITLE:
ASSOCIATION BETWEEN CLINICAL MANIFESTATIONS OF AUTOIMMUNE DISEASES WITH THE POLIMORFISMOS OF PTPN22, STAT4, CTLA-4 IN COLOMBIAN POPULATION

RESUMEN

Las enfermedades autoinmunes (EAI) afectan al 5% de los seres humanos y constituyen uno de los problemas de salud más frecuentes y menos entendidos en la actualidad. Son enfermedades multifactoriales en las cuales están involucrados factores genéticos y ambientales aun no esclarecidos. Estudiamos el gen *PTPN22* importante en EAI, que codifica para la proteína intracelular LYP, la cual inhibe la señalización del TCR después de que este se une al complejo péptido-CMH. Después de esta primera señal el TCR necesita una segunda señal de activación que es producida por la molécula coestimuladora CD28; esta señal es inhibida por la molécula *CTLA4 (*Antígeno 4 asociado al LT citotóxico) gen que también estudiamos. El tercer gen que estudiamos es el *STAT4* un factor de trascripción que transmite señales inducidas por varias Interleuquinas claves como IL 12 que promueve la diferenciación de células T a Th1 e IL 23 la cual facilita la proliferación de las células Th17. Ambos tipos de células son pros inflamatorias y están involucradas en la patogénesis de estas enfermedades. El objetivo general de esta tesis fue contribuir al estudio de las bases genéticas de algunas enfermedades autoinmunes como AR, LES y Escleroderma (Es) mediante un estudio de casos-controles y genes cuya función está involucrada en la etiopatología de estas enfermedades. Los pacientes y controles sanos que estudiamos eran procedentes de la costa Atlántica (Barranquilla) y de la región central de Colombia (Bogotá). Se utilizó una cohorte con suficiente tamaño muestral para realizar un estudio de asociación con buen poder estadístico. Para la genotipificación se uso PCR-en tiempo real con sondas de hibridación e hidrólisis. Luego de estudiar éstos genes,

encontramos una asociación entre el Polimorfismo R620W del gen PTPN22 con AR y LES, no obstante el Polimorfismo no se asocia con ES. Esta asociación es de especial relevancia ya que el estudio de LM Gómez y col, en población colombiana no mostró asociación con AR; nosotros replicamos la asociación con LES y AR en nuestra población y en Caucásicos. También se encontró que el SNP rs7574865 de STAT4 está asociado a la población de AR Bogotá y Barranquilla. Este SNP también está asociado a LES. Finalmente nosotros no encontramos evidencia de asociación con el polimorfismo CT60A/G de CTLA4 y autoinmunidad, por lo tanto sugerimos que este gen no juega un papel crítico en la predisposición genética para desarrollar AR o LES en nuestra población.

Palabras Claves: EAI, PTPN22, CTLA4, STAT4, SNP.

SUMMARY

Autoimmune diseases (AD) are present in 5% of the human population and they are currently one of the most common and less understood health problems. The pathological process in these entities is due to a combination of genetic and environmental factors which are not yet completely clear. We studied the PTPN22 gene; which inhibits TCR signaling. After this first signal, the TCR needs a second activation signal which is produced by the costimulatory molecule CD28, this signal is inhibited by the CTLA4 (*Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen* 4) molecule, another gen we studied. The Third studied gene was STAT4, which codifies a transcription factor that transmits signals induced by various key interleukins, such as IL 12, which promotes differentiation of T-cells to Th1, and IL 23 which facilitates proliferation of Th17 cells. Both types of cells are pro inflammatory and are involved in the pathogenesis of these diseases. The general objective of this thesis is to contribute to the study of the genetic basis for some AD such as RA, SLE and SCL by performing a case-control study and genes involved in the pathogenesis of these diseases. The patients and healthy control in the study came from the Atlantic coast of Colombia (Barranquilla) and the central region of the country

(Bogota). We used a cohort of enough sampling size to perform an association study with good statistical power. After studying these genes, we found an association between the R620W polymorphism of the PTPN22 gene with RA and SLE; however the polymorphism is not associated with Scl. This association is of special relevance since a study from LM Gomez et al, showed no association with RA in the Colombian population. We also replicated the association with SLE and RA in our population and in Caucasians. In addition, we found that the SNP rs7574865 from STAT4 is associated to the RA population of Bogota, and Barranquilla. This SNP is also associated with SLE. Finally we did not find evidence of association with the CT60A/G polymorphism of CTLA4 and autoimmunity; therefore, we suggest that this gene does not play a critical role in the genetic predisposition to develop RA, SLE or Scl in our population.

Key Words: AD, PTPN22, CTLA4, STAT4, SNP.

INTRODUCCION

La autoinmunidad es una condición en la cual el huésped organiza una respuesta inmune contra lo propio. Es la perdida de la tolerancia, pudiéndose definir tolerancia como el reconocimiento por parte del sistema inmune de antígenos propios sin generar enfermedad. La enfermedad autoinmune (EAI) es un síndrome clínico causado por la pérdida de la tolerancia inmune caracterizada por la activación de las células T o de las células B, o ambas, que conducen a daño tisular en ausencia de una causa evidente. Estas enfermedades afectan al 5 % de los seres humanos siendo incapacitan tés graves y aun mortales algunas de ellas. En la última década los investigadores se han dedicado al esclarecimiento de los mecanismos responsables de estas enfermedades para buscar así mejores enfoques terapéuticos. Dichas enfermedades son multifactoriales donde se ven involucrados factores genéticos y ambientales, es evidente que tienen un componente genético fuerte ya que se ve con frecuencia en familias donde se encuentra agregación familiar. El patrón de herencia de las EAI es complejo, indicando que múltiples genes se encuentran involucrados en su etiología. No se puede desconocer el hecho que genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), en particular del sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA), han sido consistentemente implicados como importantes factores de riesgo genético asociados a las EAI. Este hecho data de los años 70 con el descubrimiento de la asociación entre el HLA-B27 y la espondilitis anquilosante y el HLA-DR4 con la Artritis Reumatoide (AR). Los alelos del Locus HLA-DRB*1 llamados epitopo compartido son los que muestran una asociación más fuerte con AR. Sin embargo, para ninguna de estas entidades la predisposición genética conferida por el HLA es suficiente para el desarrollo de las mismas, dado que son enfermedades complejas, en las cuales se requiere el concurso de varios genes y de factores medioambientales. Los factores que han sido implicados en el desarrollo de las EAI, incluyen agentes infecciosos, medicamentos, sustancias químicas, toxinas y luz ultravioleta. La luz ultravioleta es conocida como factor inductor del lupus eritematoso sistémico (LES), las lesiones cutáneas de esta enfermedad se limitan a las aéreas expuestas a luz solar. El tabaquismo y la

obesidad pueden incrementar el riesgo de desarrollar artritis reumatoide (AR). Las temperaturas bajas están relacionadas con la inducción de la diabetes mellitus insulino dependiente (DMID). Los fármacos pueden inducir Lupus y vasculitis de hipersensibilidad.

Hasta hace poco no se habían identificado otros genes que influyeran en la predisposición a desarrollar AR a pesar de que la región HLA solo tuviera el 30% del componente genético. Gracias a estudios de asociación, de ligamiento, de desequilibrio de transmisión y estudios de asociación a través de todo el genoma se han podido identificar nuevos polimorfismos de genes involucrados con susceptibilidad a desarrollar AR. Estos genes contribuyen cada uno en una forma modesta al desarrollo de la enfermedad.

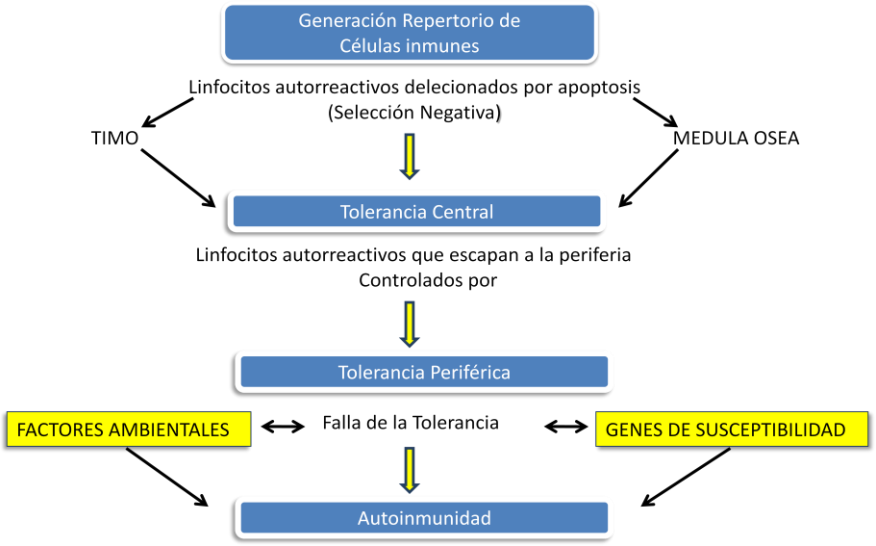
Son varios los genes que recientemente se han asociado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes, entre ellos: *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type* 22 (*PTPN22*), *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein* 4 (*CTLA4*) y el *signal transducer and activator of transcription* 4 (*STAT4*) entre otros. En el presente estudio se estudian los polimorfismos de los genes *PTPN22, CTLA4, STAT4* que se escogieron de acuerdo a su funcionalidad. *PTPN22* es un gen importante en autoinmunidad ya que codifica para la proteína intracelular específica de linfocitos Lyp, la cual inhibe la vía de señalización del TCR después que este se une al complejo péptido-CMH. Después de esta señal de activación la célula T necesita una segunda señal dada por moléculas coestimuladoras como CD28, señal que es inhibida por CTLA 4. STAT 4 el tercer gen en estudio es un factor transductor de señal del TCR y factor de transcripción, también involucrado en la diferenciación de las células TH17 a través de la IL 23. Las células TH17 están involucradas en procesos inflamatorios. Para este estudio trabajamos con pacientes de AR, LES y escleroderma (Sc).

1 MARCO TEORICO

El sistema inmune normal está encargado de reconocer y responder para eliminar antígenos no propios como patógenos, mientras que es capaz de tolerar y no reaccionar adversamente contra las moléculas o sustancias propias potencialmente antigénicas (autoantígenos). La discriminación entre propio y no propio es el fenómeno de *tolerancia inmunológica.* La pérdida o anormalidad del proceso de tolerancia genera una respuesta inmune contra autoantígenos, lo cual generalmente conlleva a un proceso patológico denominado *autoinmunidad.* [1]

La autoinmunidad es un síndrome clínico causado por la activación de las células T o de las células B, o ambas, que conducen a respuestas celulares o producción de autoanticuerpos que causan daño tisular en ausencia de una causa evidente [2]. (Figura 1).

Figura 1. Establecimiento de la tolerancia Inmunológica y su falla: La generación de un repertorio de células inmunes en los órganos centrales Timo y Medula Ósea, es acompañada de una deleción de LT autorreactivos por apoptosis. Algunos LT autorreactivos escapan a esta selección y son controlados por la tolerancia periférica. La tolerancia puede fallar por la interacción de genes de susceptibilidad y factores ambientales produciendo enfermedades autoinmunes. Modificada de BMJ Volume 321



Las respuestas específicas inmunes y autoinmunes involucran los mismos elementos: a) Un antígeno o auto-antígeno; b) Una respuesta donde interactúan familias o repertorios de células que incluyen células presentadoras de antígenos, LT y LB; c) moléculas mensajeras, Citoquinas, Quimoquinas y sus receptores; d) señalización y moléculas coestimulatorias en la superficie de la célula.

La Tolerancia Inmune es mantenida por varios mecanismos incluyendo eliminación de linfocitos autorreactivos, que han adquirido receptores para moléculas propias mediante el proceso de maduración en los órganos generativos como el timo y la medula ósea. El mecanismo identificado hasta el momento para la eliminación de células B autorreactivas, productoras de autoanticuerpos, corresponde a una deleción clonal de células B inmaduras, a nivel de la médula ósea, en el bazo y en los nódulos linfáticos. El control en estas células también puede generarse por inactivación funcional del linfocito (anergia) y reedición del BCR, mecanismo por el cual se cambia la especificidad de este receptor al encuentro con un auto-antígeno [1, 2].

Los mecanismos de control de los LT se generan en dos niveles; el nivel superior es la "tolerancia central" que se desarrolla en la vida fetal, y el nivel inferior de la "tolerancia periférica" que se desarrolla postnatalmente como un proceso de reserva[3].

1.1 TOLERANCIA CENTRAL

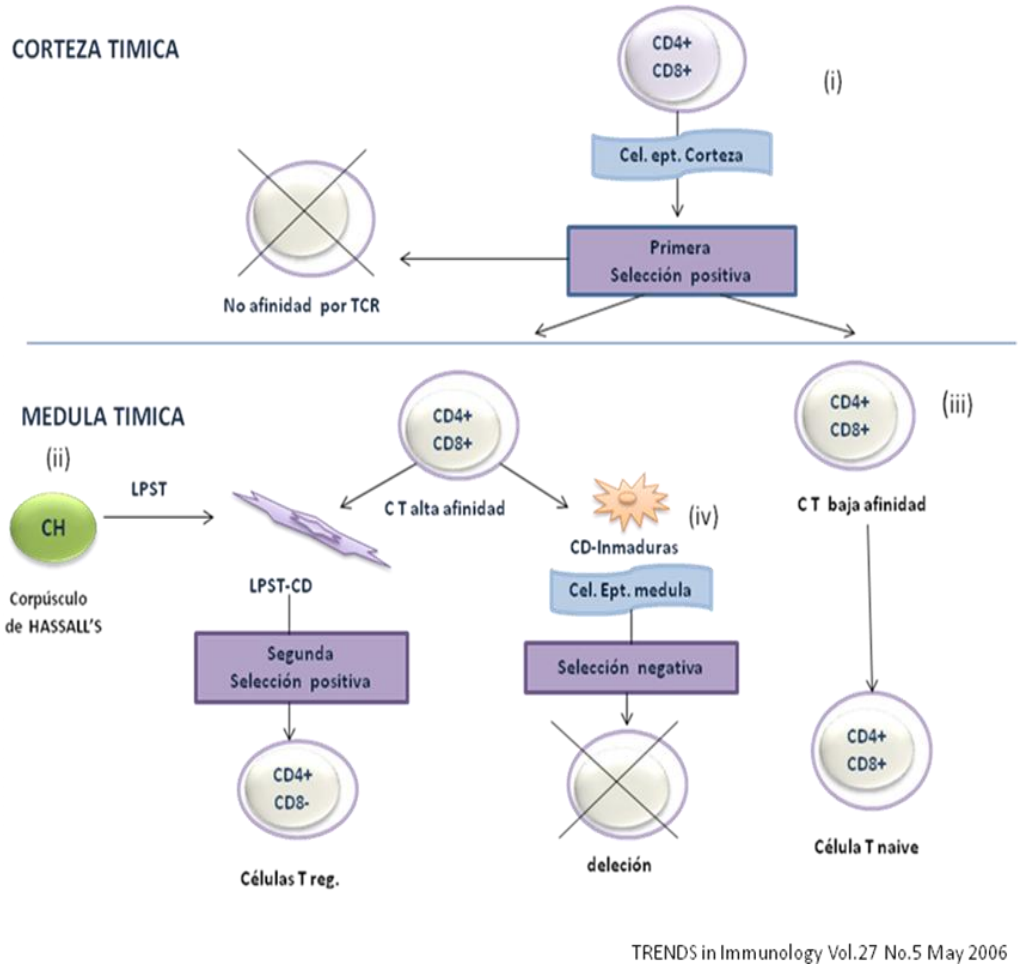
La tolerancia central se refiere a aquellos eventos que ocurren en la vida temprana de los linfocitos, donde aprenden a reaccionar con los antígenos durante la linfopoyesis en los órganos linfoides centrales como la médula ósea (linfocitos B) y el timo (linfocitos T).

El Timo es un órgano linfoide central, vital donde la mayoría de linfocitos T son generados de células linfoides progenitoras[3, 4]. Las células T que se desarrollan en el timo primero expresan el receptor antigénico de célula T (TCR). Luego sufren dos tipos diferentes de

selección basada en el enlace del TCR a complejos autopéptido-Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CHM) y son presentados por células epiteliales del timo o células dendríticas. Las células T que se enlazan al complejo autopéptido-CMH clase I o clase II son seleccionadas, proceso conocido como *Selección Positiva, m*ientras las células T que se desarrollan y fallan en enlazar los complejos autopéptido-CMH mueren por apoptosis[5]. Las células T positivamente seleccionadas sobreviven y migran a la unión cortico-medular y luego al área medular del timo, donde sufren un proceso de *Selección Negativa* por el cual las células T, cuyo receptor lleva alta afinidad para enlazar complejos autopéptido-CMH son delecionadas por células dendríticas (CDs) o células epiteliales en la médula tímica. Sólo las células T que llevan TCR de baja afinidad para enlazar dichos complejos, con mayor probabilidad maduran y emigran al tejido linfoide periférico[4, 5]. No todos los mecanismos de tolerancia central delecionan todas las células T autorreactivas, algunas escapan a la periferia. También se seleccionan positivamente poblaciones de Células T reguladoras (T reg.) CD4+ de mediana a alta afinidad en el timo, que migran a la periferia y permiten a células T activas frenar respuestas inmunes contra antígenos que son reconocidos como propios [4]. (Figura 2).

En condiciones fisiológicas normales el desarrollo de células T_{Reg} en el timo y su exportación fuera del timo parece ser ligeramente retrasado comparado con el de las células T convencionales [5]. Resultados de varios experimentos evidencian que las CDs inmaduras inducen la generación de células T_{Reg} [6]. Estudios recientes demuestran que las CDs mieloides son las responsables de la selección negativa en el timo y establecen la tolerancia a autoantígenos [7]. También están involucradas en la selección de células T de mediana a alta afinidad y en su conversión a células T_{Reg} [8]. Adicionalmente el microambiente tímico determina si las DCs toman un papel negativo o positivo en la selección de un timocito [9].

Figura 2. Un modelo unificado de tolerancia central en el timo. (i) Las células T que se desarrollan en el timo experimentan la selección positiva primaria en la corteza por las células epiteliales corticales (CEC); (ii) las células T seleccionadas positivamente migran a la médula; (iii) las células T autorreactivas de baja afinidad pueden escapar a la selección negativa por células epiteliales medulares (CEM) o CDs inmaduras. Las células T seleccionadas podrían requerir una segunda selección positiva por LPST-CDs, que proporcionaría una señalización sostenida del TCR y una coestimulación, permitiendo su maduración y luego su exportación a la periferia como células T naive convencionales; (iv) Las células T autorreactivas de alta afinidad sufren selección negativa después de enlazar antígenos presentados por células epiteliales de la medula o CDs inmaduras del timo; (v) y las células T autorreactivas de alta afinidad sufren una selección positiva secundaria cuando enlazan antígenos presentados por CDs tímicas activadas por linfopoyetina estromal tímica (LPST).



TRENDS in Immunology Vol.27 No.5 May 2006

La linfopoyetina estromal tímica (LPST) determina este microambiente. La LPST es expresada por las células epiteliales de los corpúsculos de Hassall´s (HCs) que se encuentran en la medula del timo humano. Se encontró que esa LPST activa fuertemente a CDs aisladas del timo humano y la expresión de esta por los HCs se asoció a una subpoblación de DCs en la medula tímica [9].

Las CDs activadas por LPST inducen una proliferación homeostática robusta de células Tnaive CD4+, debido a su capacidad de formar un conjugado fuerte y prolongado con células T autólogas CD4+. Usando el mismo mecanismo de inducción homeostática de proliferación de células T periféricas, las CDs activadas por la LPST podrían proporcionar señales fuertes de supervivencia a las células T autorreactivas de media a alta afinidad, y por lo tanto podrían cambiar de selección negativa a selección positiva secundaria [5, 9].

1.2 TOLERANCIA PERIFÉRICA

El sistema inmune posee varios mecanismos para prevenir la activación de los linfocitos autorreactivos que escapan de la selección negativa estos incluyen: Ignorancia inmunológica, anergia, apoptosis y regulación por células T_{Reg} [1, 3].

Ignorancia Inmunológica: Los linfocitos autoinmunes son secuestrados por antígenos detrás de barreras celulares o vasculares. Esto ocurre porque las células muertas por apoptosis evitan la salida de componentes autoantigénicos intracelulares y por la presencia de moléculas de señalización en la superficie de linfocitos T autoinmunes (pero no activados) que no permiten la entrada de células en el tejido parenquimatoso [10].

Anergia: Esta representa un estado inestable de detención metabólica que afecta a linfocitos que pueden conducir a apoptosis [11]. Esto puede ocurrir cuando el linfocito recibe una señal antigénica pero no recibe la segunda coestimulatoria que es necesaria para la activación. La anergia es un estado tolerogénico protector, después de la

interacción entre célula T autoinmune y un autopéptido en una célula parenquimatosa que no es competente para entregar una señal coestimulatoria [12, 13].

Apoptosis: Es un mecanismo fisiológico diferente de la muerte celular patológica y es importante para mantener la autolerancia. Actualmente se sabe que Linfocitos T maduros van a apoptosis al ponerse en contacto con un antígeno cognado. Dicho mecanismo parece ser importante no solo para mantener la autotolerancia sino para limitar la clona de linfocitos reactivos hacia cualquier antígeno. Dos familias de proteínas median la apoptosis: las cisteína-aspartato-proteasas (caspasas) que son activadas cuando en la superficie celular se une una molécula Fas CD95 a su ligando fas L, o cuando el factor de necrosis tumoral (TNF) se une a su receptor (TNFR). La otra familia es Bcl2 que contiene aproximadamente 20 proteínas, entre las cuales Bcl2 protege de apoptosis lo propio, mientras que las otras proteínas promueven la apoptosis. La apoptosis normalmente elimina linfocitos auto-reactivos y las mutaciones génicas que interrumpen la apoptosis conducen a autoinmunidad [1, 14, 15].

Linfocitos T reguladores: Las células T autorreactivas que escapan de la selección negativa son reguladas en los órganos linfoides periféricos por las células $T_{Reg.}$ Se ha demostrado que aparte de la deleción clonal y anergia, el control de células autorreactivas mediado por células T, contribuye al mantenimiento de autotolerancia inmunológica natural[16]. Objetivo de estudios recientes, han sido las células $T_{Reg.}$ CD4+ naturales, que coexpresan la cadena α del receptor de interleucina-2 (CD25). La deleción de células T CD4+ CD25+ conduce al desarrollo espontáneo de varias enfermedades autoinmunes en animales genéticamente susceptibles después de timectomia en el día 3 de vida, y la transferencia de CD4+ y CD25+ previene el desarrollo de autoinmunidad órgano-específica. En otros modelos se ha visto el control de rechazo al trasplante. Las células T CD4+ CD25+ son células anérgicas, no proliferan ni producen citoquinas incluyendo la citoquina 2 al estimulo del TCR [16]. La manera más característica de diferenciar las $T_{Reg,}$ es precisamente por la expresión constitutiva de CD25, aunque pueden expresar otros marcadores de

superficie como: CD134 (OX 40), *GITR* (receptor del *TNF* inducido por glucocorticoides o TNFRSF18), CD103, galectina y *CTLA-4.* El factor de transcripción *FOXP3*, es una molécula específica de $T_{Reg,}$ la cual inhibe la producción de IL-2 en células CD4+ activadas y más recientemente la neurofilina-1, entre otras [17-19]. La neurofilina-1 es una molécula que ha despertado curiosidad entre diversos investigadores porque hasta el momento parece ser específica de T_{Reg} [1, 19].

Los mecanismos por los cuales actúan las células $T_{Reg,}$ son a través de moléculas como CTLA-4, que tiene la capacidad de inhibir la coestimulación y frenar la respuesta de los linfocitos T. del sistema inmune. No obstante, se han definido claramente dos tipos de células $T_{res:}$ naturales e inducidas [1, 20].

Las "T_{Reg} naturales" son CD4+CD25+ y son producidas en el timo como una subpoblación de linfocitos T [5]. Este subgrupo también está presente en la periferia en estado virgen, denominándose "T_{Reg} Intrínsecas". Las "T_{Reg} Inducidas" son de varios tipos: Las que se originan de las células CD4+ vírgenes inducidas en la periferia, llamadas Th3 o Tr1. La proliferación de ellas es el resultado de la exposición al antígeno en presencia de IL-10 y/o TGF-β. - Algunos clones de células T generados en presencia de IL-10, o por el contacto con células dendríticas inmaduras o células tumorales. Estas producen un perfil de citoquinas diferente a los clásicos Th1/Th2, como IL-5, IL-10, TGF-β e IFNγ, pero nunca producen IL-2 o IL-4 [21, 22].

Los mecanismos de acción de las $T_{Reg.}$ Intrínsecas CD4+ CD25+ se desconocen en su mayoría. Estudios *in vitro*, han mostrado inhibición de respuestas proliferativas de linfocitos T CD4+ y CD8+, por mecanismos diferentes que son independientes del TGF-β y de IL-10 [23] Posteriormente se demostró que el bloqueo de CTLA-4 o de CD25 no inhibe la actividad supresora de estas células. Varios estudios han sugerido que la supresión ocurre por un mecanismo dependiente del contacto célula-célula y que es independiente de la producción de moléculas solubles [23-26].

1.3 ARTRITIS REUMATOIDE

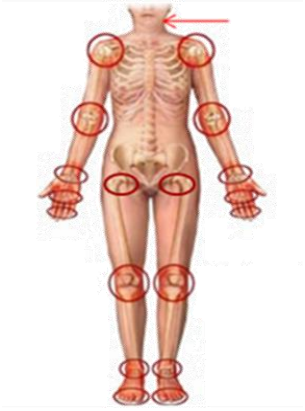
1.3.1 Etiología

La etiología aún no está totalmente esclarecida. Se considerada como una enfermedad multifactorial donde el 60% se atribuye a factores genéticos y el 40% a factores ambientales. La agregación familiar confirma su origen genético y susceptibilidad heredada. La prevalencia de la AR en familiares de pacientes puede llegar hasta un 12% mientras que en la población mundial es del 1%. Se ha sugerido que la enfermedad aparece por una reacción autoinmune desencadenada por un agente infeccioso u otros factores ambientales como cigarrillo o embarazo en personas genéticamente predispuestas.

1.3.2 Características de la Enfermedad

La artritis reumatoide (AR) es la enfermedad inflamatoria más común y la más frecuentes de la enfermedades autoinmunes sistémicas. Afecta todas las articulaciones del organismo de manera simétrica, principalmente las que están en movimiento, inflamando el tejido sinovial.

Figura 3. **Articulaciones que pueden estar comprometidas.**



Es una enfermedad heterogénea con una expresión clínica variable, que puede ir desde una artritis suave auto-limitante hasta una enfermedad sistémica de progresión rápida [27]. Las manifestaciones articulares pueden ser catalogadas como reversibles relacionadas con la inflamación sinovial y las irreversibles con daños estructurales causados por la sinovitis crónica y aparecen con la progresión de la enfermedad. La membrana sinovial que es fina, está engrosada por edema e infiltrado inflamatorio, aumento del número y tamaño de las células sinoviales y formación de tejido hiperplásico (pannus), que acaba erosionando el cartílago, el hueso, la cápsula y los ligamentos.

Figura 4. Radiografía de manos con Artritis Reumatoide: Destrucción de las articulaciones, erosiones del Hueso y osteoporosis asociada**.**

En el 80% de los pacientes con artritis reumatoide se encuentra FR+ [30]. También se encuentran los anticuerpos anti-citrulina con un potencial mayor para AR. Estos anticuerpos ayudan al diagnóstico temprano de la enfermedad con alta especificidad casi el 100%, también son pronostico de severidad de la enfermedad.[28] Otros factores pronóstico de severidad son: Presencia de alelos del epitopo compartido del HLA,[29] desarrollo temprano de erosiones articulares, presencia de anticuerpos anti-factor reumatoide (FR), número elevado de articulaciones afectadas y manifestaciones extra-articulares. (Tabla 1).

Tabla 1

Manifestaciones extra-articulares de AR	
Órgano	**Manifestación**
Piel	Nódulos reumáticos, vasculitis
Oral	Resequedad (síntomas de Sica)
Ojos	Querato-conjuntivitis, Uveítis, Episcleritis, (síntomas de Sica)
Respiratorio	Fibrosis pulmonar, derrame pleural
Cardiaco	Pericarditis, miocarditis, formación de nódulos valvulares
Neurológico	Mononeuritis, compresión medular, neuropatías
Hepático	Niveles elevados de aminotransferasa
Hematológico	Anemia, trombocitosis, leucocitosis, linfoadenopatía
Vasculares	Vasculitis, ulceras en las piernas

1.3.3 Síntomas Clínicos

Inflamación de las articulaciones, dolor, rigidez matinal, debilidad, deformidad, cansancio, malestar, rubor, fiebre, pérdida de peso, depresión, articulaciones blandas al tacto, engrosamiento sinovial, efusión (al principio), eritema (al principio), dificultad de movimientos, anquilosis y subluxación. La distribución es simétrica, distal más comúnmente que proximal, PIF, MCF/MPT, muñeca/tobillo más comúnmente que tobillo/rodilla, hombro/cadera

PIF= Proximal interfalángica, **MFC=** Metacarpofalángica**, MTP=** Metatarsofalángica.

1.3.4 Aspectos Epidemiológicos

La AR es una enfermedad frecuente con una prevalencia en la población mundial del 1%. La enfermedad afecta más a las mujeres que a los hombres en una proporción 3:1. La prevalencia varía según la región, en los países del norte de Europa la incidencia es más alta que en los países del sur, mientras que en el sur de África en el área rural es bastante baja. En Latinoamérica es del 0.5%. La AR puede aparecer a cualquier edad pero es más frecuente entre los 50 y los 70 años, la incidencia aumenta con la edad [30, 31].

1.3.5 Diagnostico de la AR

El diagnostico se hace en base a los criterios definidos por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) en 1987. (Tabla 2). La AR es definida por la presencia de 4 o más criterios. Los criterios 1 a 4 deben haber estado presentes durante al menos 6 semanas. Los nuevos criterios demostraron una sensibilidad del 91-94 % y especificidad del 89 % para AR cuando fueron comparados con sujetos sanos como control.

Tabla 2

Criterios del ACR para clasificación de AR	
Criterio	**Definición**
1. Rigidez matutina.	En y alrededor de las articulaciones durante al menos 1 hora antes de la mejoría
2. Artritis en 3 o más Articulaciones.	Al menos 3 articulaciones con tejido blando o fluido detectado por un médico, las 14 posibles aéreas son PIF,MCF,MPT , muñeca codo, rodilla y tobillo izquierdo o derecho
3. Artritis de manos.	Inflamación en al menos un área en articulaciones de muñeca, PIF o MCF
4. Artritis simétrica.	Implicación simultanea de las mismas áreas (como se ha definido en 2.) en ambos lados del cuerpo (se acepta implicación bilateral de PIF, MCF o MPT sin simetría absoluta)
5. Nódulos reumáticos	Nódulos subcutáneos sobre prominencias óseas en zona de los extensores o en regiones yuxta-articulares
6. Cambios radiológicos.	Cambios radiológicos en radiografías antero-posteriores de manos y muñecas que deben incluir erosiones óseas o descalcificaciones óseas inequívocas localizadas en las articulaciones afectadas
7. Factor reumatoide positivo.	Niveles altos de factor reumatoide en suero

1.3.6 Evolución

Es muy variable. Los pacientes presentan funcionalidad mantenida y hay síntomas fluctuantes (mejorías y exacerbaciones). El pronóstico a largo tiempo es malo, pueden

llegar a edad avanzada, pero con un gran costo personal, social y económico ya que llegan a sufrir distintos grados de discapacidad. La productividad es bastante baja pues el 80% de los pacientes son incapacitados después de los 20 años, con una expectativa de vida reducida entre 3 y 18 años. Los costos médicos de la AR en Estados Unidos por paciente tienen un promedio de US $5.920 por año y en el Reino Unido el costo por año es de £2500 por paciente. [32]

1.3.7 Tratamiento

Medidas generales y rehabilitación: El reposo articular disminuye la inflamación, pero el reposo prolongado favorece la rigidez. Lo ideal es la alternancia reposo-ejercicio. Hay férulas que ayudan a aliviar el dolor y previenen la deformidad. La cinesiterapia mantiene el recorrido articular y la fuerza muscular. La termoterapia e hidroterapia disminuyen la contractura muscular y benefician las actividades de la vida diaria.

Fármacos: Los más empleados son los antiinflamatorios no esteroides AINEs y los fármacos reumáticos o modificadores de la enfermedad DMARDs. Estos fármacos controlan la manifestación clínica, disminuyen la progresión del daño articular y modulan la inflamación. No se sabe el mecanismo íntimo de acción en la respuesta inmune. Entre los DMARDs sintéticos está el metotrexate, recientemente se usan agentes biológicos que bloquean la acción de las citoquinas inflamatorias como leflunamida; inhibidores del factor de necrosis tumoral α (TNFα) como etanercept, infliximab y adalimumab [33, 34] También se emplean corticoides por vía sistémica (oral, intravenosa). Infiltraciones intra-articulares de corticoides alivian a corto plazo, pero no se deben aplicar mucho porque dañan el cartílago articular. Se usan principalmente en fase aguda.

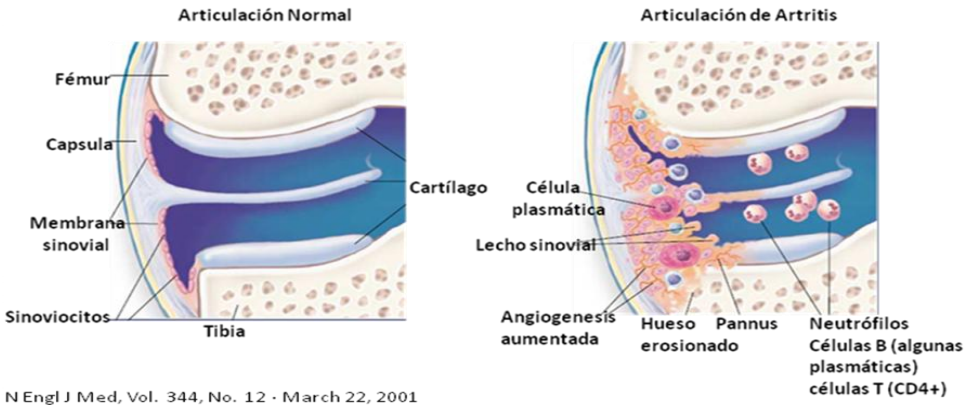
1.3.8 Patogénesis y alteración de la respuesta inmune

1.3.8.1 Formación del pannus

La artritis reumatoide es una enfermedad crónica Inflamatoria cuyos objetivos principales son la membrana sinovial, el cartílago y el hueso de las articulaciones. Después del inicio de la enfermedad la membrana sinovial, que normalmente es hipocelular, comienza a volverse hiperplasica y consta de una capa de revestimiento superficial de macrófagos y fibroblastos sinoviales, cubriendo una zona intersticial que contiene un infiltrado de marcadores celulares los cuales incluyen además células T CD4+ y CD8+, natural Killers (NK), células B y células plasmáticas. El sinovio inflamado (pannus) invade el cartílago adyacente y produce la erosión del hueso y la destrucción articular mediada por la actividad de los osteoclastos, condrocitos y fibroblastos sinoviales. La interface entre el pannus y el cartílago es ocupada por macrófagos activados y fibroblastos sinoviales que expresan mataloproteinasas en la matrix [35, 36]. (Figura 5).

Este tejido invade y destruye el cartílago y el hueso adyacente. El pannus consiste de sinoviocitos tipo A, tipo B y células .plasmáticas. Las células de la capa sinovial se designan como: tipo A (macrófagos sinoviales), tipo B (fibroblastos sinoviales). Los monocitos, macrófagos, fibroblastos, y células T liberan numerosas citoquinas cuando son estimuladas, la mayor parte de estas citoquinas, incluyendo el TNFα y la interleuquina-1, pueden encontrarse en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide.

Figura 5. Patogénesis de la artritis reumatoide: En la articulación de la rodilla normal, el sinovio consiste de una membrana sinovial (una o dos capas celulares) y subyacente el tejido conectivo laxo. En AR temprana, la membrana sinovial se engrosa debido a la hiperplasia y la hipertrofia de las células de la capa sinovial. Una red extensa de nuevos vasos sanguíneos se forma en el sinovio. Las células T (CD4+) y las células B infiltran la membrana sinovial. Estas células también se encuentran en el líquido sinovial, junto con gran número de neutrófilos. En AR temprana, la membrana sinovial comienza a invadir el cartílago. En AR establecida, la membrana sinovial se transforma en tejido inflamatorio, el pannus.



1.3.8.2 Células T sinoviales función y producción de Citoquinas

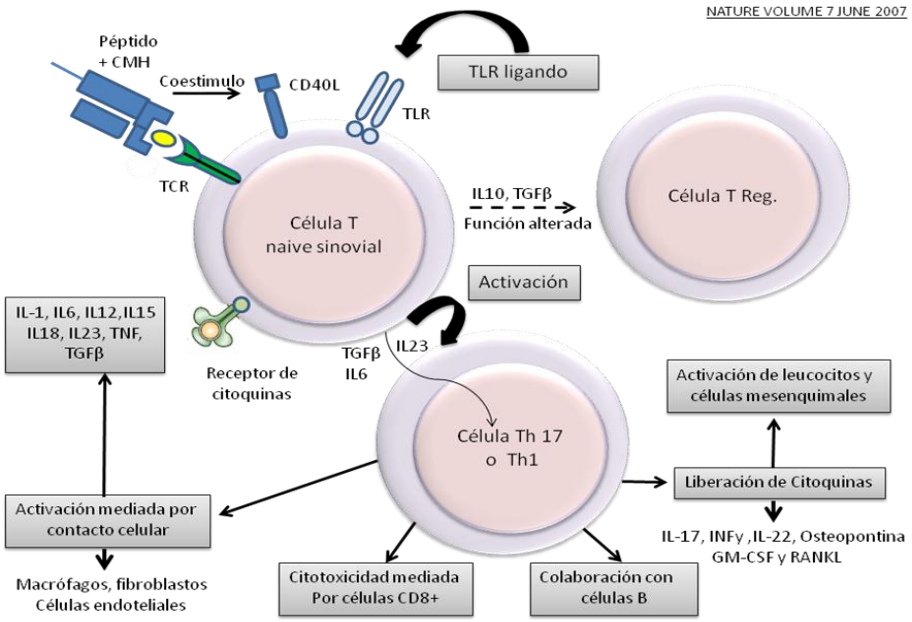
Estas células se han implicado en la patogenia de la artritis reumatoide en virtud de la asociación genética de esta con el CMH y la fosfatasa intracelular *PTPN22*, también al hallazgo de células T en el sinovio inflamado, evidencias encontradas en varios modelos animales de AR [(36).]

Amplios estudios basados en modelos murinos de AR han considerado que la enfermedad está mediada por células T helper tipo 1 (Th1). Por lo tanto una población de células T que producen citoquinas proinflamatorias y quimoquinas como el Interferon-y (IFNy) ,y el Factor de Necrosis Tumoral-α (TNFα) y la linfotoxina-β (LTβ) median la inflamación y el daño articular [(37).] Estudios más recientes en modelos animales han evidenciado una nueva citoquina IL17 producida por una subpoblación de células T, recientemente caracterizadas como Th17, que tienen un efecto inflamatorio crucial en AR [(38).] IL-23 induce la diferenciación de las células T naive CD4+ en células Th 17/ ThIL-17 por un mecanismo diferente de las vías de diferenciación de células Th1 y Th2. Para la diferenciación a células Th1, intervienen los factores de transcripción STAT1, STAT4, Tbet (en ratones) y para Th2 interviene STAT6. Estos transductores de señales no son requeridos para la diferenciación de Th17. El factor de señalización esencial aún no se conoce [(39).] También existe la hipótesis que el TGFβ y la IL6 inducen la diferenciación de estas células Th17 además de la IL 23 [(35, 36).] (Figura 6).

Las células T sinoviales pueden ser activadas por el TCR (al ser este activado por el complejo péptido-CMH), vías de coestimulo y por estímulos dirigidos por receptores de Citoquinas o receptores Toll-Like (TLR) (Figura 6). El entorno sinovial contiene IL-12, IL-23, IL-6 y el factor de crecimiento transformante (*transforming growth* factor-TGFβ). Como tal promueven la diferenciación a células Th1 1 y células TH17. Estas células cumplen funciones efectoras a través de la liberación de citoquinas que promueven corriente abajo la activación de leucocitos y células mesenquimales, también colaboran con las células B y con las células T efectoras CD8+ para producir citotoxicidad.

Se han encontrado células T_{Reg} en el sinovio de pacientes con AR y en líquido sinovial, pero su función reguladora está alterada. No está claro qué citoquinas están involucradas en la diferenciación de las células T_{Reg}, pero se cree que la IL10 y el TGFβ (en ausencia de la IL6, cuando se usa terapia de bloqueo del receptor de la IL6) colaboran en la diferenciación de estas células. También activan por contacto célula –célula a macrófagos, células endoteliales y fibroblastos [36].

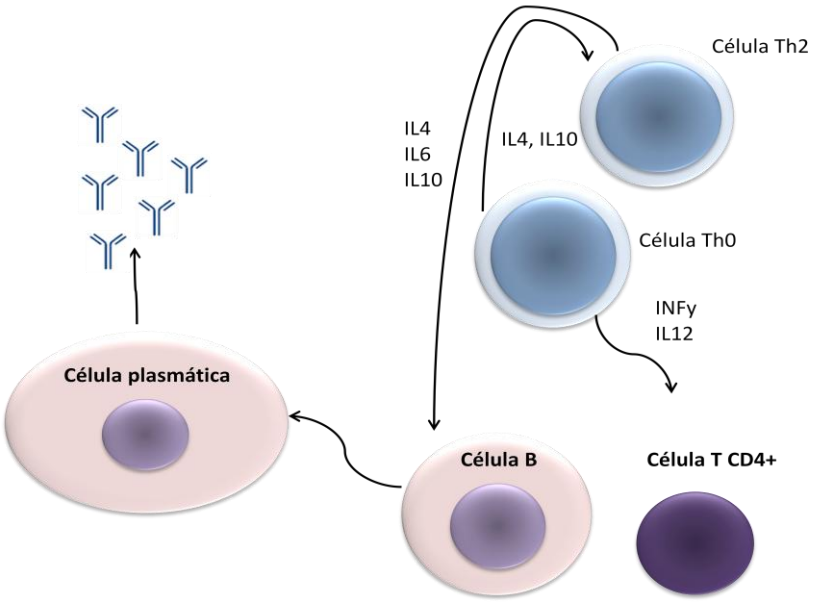
Figura 6. Vías que conducen a la activación de células T sinoviales en AR y su vía efectora. CD40L: CD40ligando, GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, RANKL: Receptor activador del factor nuclear k-β (RANK) ligando.



1.3.8.3 Células B su función en AR

Las células T CD4+ estimulan las células B por contacto con la superficie celular y por la unión a la integrina $\alpha_1\beta_2$ de CD40L y CD28, para producir anticuerpos incluyendo el factor reumatoide (FR) y los anticuerpos contra el péptido cíclico citrulinado[35]. (Figura 7).

Figura 7. Estimulación de las células B: Producción de anticuerpos en el sinovio de articulaciones afectadas por AR. Modificada de N Engl J Med, Vol. 344, No. 12 March 22, 2001

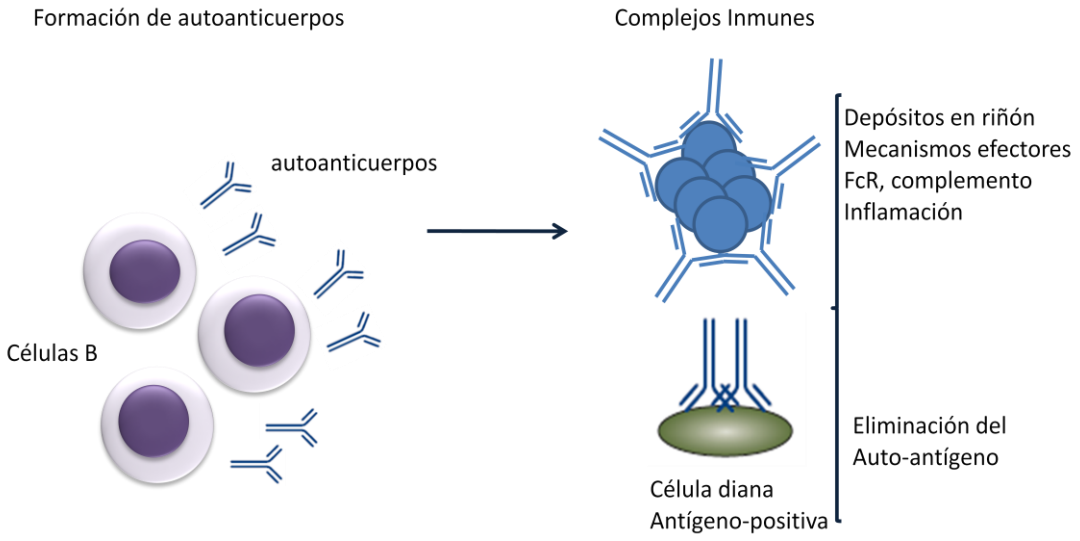


El factor reumatoide es anticuerpo generalmente IgM dirigido contra la fracción FC de la IgG anormal producida por los linfocitos de la membrana sinovial. Se encuentra en el 80% de personas con AR, sin embargo el FR no es muy específico y también se encuentra en otras enfermedades reumáticas, infecciones e incluso en personas sanas. Últimamente se han descrito los anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinado (anti-CCP), como potentes marcadores serológicos para el diagnostico de AR con una especificidad casi del 100%, y son pronóstico de destrucción del tejido sinovial. Esto se debe a la citrulinización intra-articular que induce a la producción de anticuerpos. La citrulinización se debe a la enzima

Peptidil Amina Transferasa [40]. que deamina péptidos conteniendo arginina y los convierte en péptidos cíclicos citrulinados [41].

Tanto el FR como los anti-CCP, se pueden hallar antes del inicio de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, por lo tanto se considera como una etapa pre-articular.
Los anticuerpos pueden formar complejos inmunes con las células diana y ser reconocidos por células que expresan receptores FC y activan el complemento. Pueden causar daño al órgano donde se depositan. (Figura 8) [42].

Figura 8. **Formación de complejos inmunes.** Las células B producen anticuerpos que forman complejos con antígenos blanco y el resultado es la formación de complejos inmunes que pueden encajar a las células B con el receptor Fc. que portan las células efectoras y al sistema de complemento. Por consiguiente, las células B pueden ser coestimuladas e inducir procesos inflamatorios. En el caso de complejos inmunes de la superficie celular, las células o el complemento pueden matar la célula blanco. Modificada de NATURE REVIEWS VOLUME 5 | JULY 2006 |



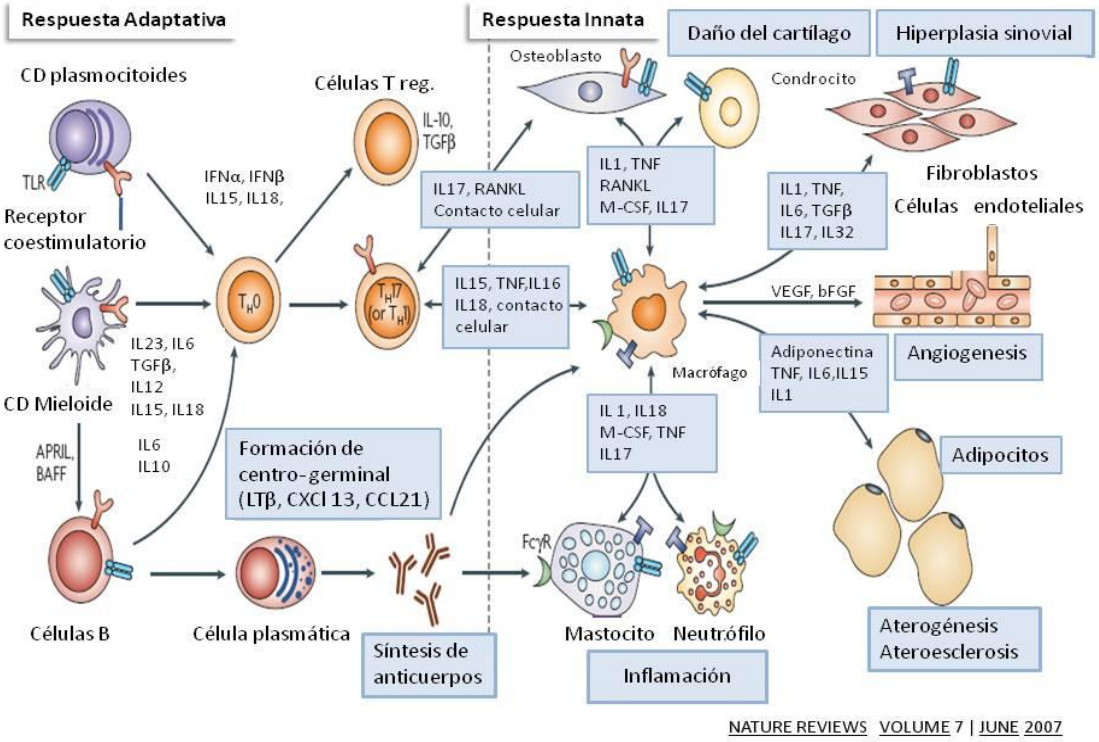
Las células de B pueden internalizar los complejos inmunes, presentar antígenos en el contexto del CMH clase II y exhibir moléculas coestimulatorias, por lo tanto pueden activar las células T cognadas [42].

La identificación del antígeno de superficie CD20 que se expresa exclusivamente y ampliamente en las células B es esencial, si se van a utilizar células B como un blanco terapéutico. [43].

1.3.8.4 Alteración de la respuesta Inmune en AR

Las células componentes de la membrana sinovial reumatoide están descritas en la respuesta innata y adaptativa de la respuesta inflamatoria (Figura 9).

Figura 9. Descripción de la regulación de interacciones sinoviales mediadas por citoquinas, en el contexto de la respuesta inmune. Vías importantes de las citoquinas son representadas, en las cuales la activación de células dendríticas, células T, células B y macrófagos sostiene la expresión disregulada de citoquinas que a su turno conduce la activación de células efectoras, incluyendo neutrófilos, mastocitos, células endoteliales y fibroblastos sinoviales. Las manifestaciones clínicas de tales efectos son destacadas.



1.3.8.4.1 Respuesta inmune innata

El macrófago es considerado la principal fuente de citoquinas proinflamatorias, como IL1, TNF, IL6, TGFβ, IL17, IL32 que inducen a los fibroblastos sinoviales para que liberen citoquinas, quemoquinas, metaloproteinasas, prostaglandinas; activan los macrófagos e inducen la liberación de moléculas de adhesión, que producen daño a la articulación.

Hiperplasia sinovial y daño del cartílago: El factor de necrosis tumoral (TNF) juega un papel importante en la patogénesis de la AR[44, 45]. Se encuentra en la mayoría de las biopsias sinoviales, induce la activación de leucocitos, células endoteliales, y fibroblastos sinoviales para que produzcan enzima de degradación, induciendo una hiperplasia sinovial e invasión del cartílago[36]. La degradación del cartílago ocurre por la liberación de enzimas de degradación de la matriz como metaloproteinasas (MMPs). Citoquinas como IL1 e IL17 inducen un cambio en el patrón de síntesis de los condrocitos, y de moléculas de la matriz (proteoglicanos y colágeno) a enzimas de degradación (MMPs).

Erosión ósea: La inflamación y erosión ósea están estrechamente ligadas. La reabsorción ósea depende de los osteoclastos [46]. El TNF es un potente inductor de la diferenciación de osteoclastos actuando de una forma aditiva con el ligando del receptor, activador del factor nuclear-kβ (RANKL) para activar la capacidad de los osteoclastos de reabsorber el hueso[47]. La IL1 activa también los osteoclastos, así como el factor estimulador de colonias de macrófago (M-CSF), que es producido por las células del fluido sinovial al ser estimuladas por el TNF o también lo producen las células Th1 cuando las estimula la IL7.

Angiogenesis: El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) son citokinas proangiogénicas secretadas por fibroblasto sinoviales y macrófagos activados, las cuales inducen el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. El VEGF regula múltiples pasos de la angiogenesis como la vasodilatación inicial, la permeabilidad de las células endoteliales, el remodelado de la matriz

perivascular por la inducción de metaloproteinasa1 de la matriz, la inducción de proliferación y migración de células endoteliales [48]. Por lo tanto la angiogenesis prepara la membrana sinovial para la destrucción articular [36].

Aterogenesis y Ateroesclerosis: La aterosclerosis es un proceso patológico que afecta las paredes arteriales, es caracterizado por la acumulación de partículas lipídicas y células del sistema inmunológico, en la región subendotelial, conduciendo al estrechamiento del lumen arterial y después a la ruptura de la placa y a la trombosis [49]. Muchos componentes del sistema inmunológico están implicados en los procesos patológicos que son la base del desarrollo de aterosclerosis: los macrófagos, células T, autoanticuerpos, autoantígenos, son componentes de las paredes de los vasos. Además de partículas de colesterol y citoquinas secretadas por células dentro de placas ateroscleróticas, incluyendo IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-10, el TNF y el INFy. En AR los macrófagos inducen la expresión de adiponectina que ayuda a la proliferación de adipocitos y así se aumenta la aterosclerosis [36].

Inflamación: los neutrófilos y mastocitos se encuentran implicados donde se solapan la inmunidad natural y la inmunidad adaptativa sinovial. Los neutrófilos están presentes en altos número en el fluido sinovial y atraviesan la membrana sinovial. Aunque su papel primario en la patología de esta enfermedad es discutido, ellos sintetizan una amplia variedad de citoquinas, incluyendo TNF, IL-1, IL-18, IL-15, IL-6, y por lo tanto podrían apoyar una gama de acontecimientos patológicos. Los neutrófilos son activados por complejos inmunes, componentes del complemento y citoquinas para liberar quemoquinas, prostaglandinas, intermediarios de especies reactivas de oxigeno y nitrógeno, por lo tanto contribuyen a un ambiente hipoxico y a la inflamación de la articulación [50]. Los mastocitos son distribuidos extensamente en el tejido sinovial de AR y expresan varias proteasas y citoquinas que favorecen la inflamación [51].

1.3.8.4.2 Respuesta inmune adaptativa

Los linfocitos B además de producir anticuerpos y ser células presentadoras de antígenos, contribuyen a la patogénesis de la AR por la liberación de citoquinas y quemoquinas como IL6, IL10 y LTβ. Las citoquinas inducidas por las células B regulan la activación de las DCs foliculares, la neogénesis linfoide, y contribuyen con los mecanismos de retroalimentación reguladores para las interacciones de células T-macrófago y de células T-células B [(52).] Las señales de activación y supervivencia de las células B principalmente son proporcionadas por miembros de la familia del TNF. Las células dendríticas (CDs) maduras de la membrana sinovial contienen centros germinales ectópicos que producen altos niveles del factor de supervivencia de Células B, [ABRIL] (*a proliferation-inducing ligand,* también conocido como TNFSF13). Además, los macrófagos y fibroblastos sinoviales en la mayoría de tejidos pueden producir el factor activador de células B, BAFF (B-cell- activating factor o también conocido como BLYS y TNFSF13b) [(53).]

1.4 Lupus eritematoso sistémico

1.4.1 Etiología

La causa exacta por la que se produce el LES es desconocida, pero se sabe que es una enfermedad multifactorial compleja donde intervienen factores genéticos y ambientales. (Tabla 3). Múltiples genes contribuyen a la susceptibilidad de la enfermedad, incluyendo genes que codifican el complemento y otros componentes de la respuesta inmune, además de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II [(54).] Parece ser que las hormonas juegan un papel importante ya que la mayoría de los pacientes son mujeres y en los hombres las hormonas podría ser un factor de protección aunque se han hecho varios estudios hormonales en pacientes con LES no es claro como estas hormonas pueden inducir la enfermedad [(55).] Mecanismos inmunes reguladores defectuosos, como el de eliminación de células apoptóticas complejos inmunes, contribuyen

significativamente al desarrollo de LES. Diferentes fármacos son capaces de desencadenar una variante de LES conocido como lupus inducido por fármacos [56]. Otro factor externo que parece influir en la aparición del LES es tener antecedentes de alguna enfermedad viral. Actualmente se cree que el virus Epstein-Barr (EBV) es importante, ya que se ha encontrado una asociación entre el comienzo del LES y haber presentado una infección por EBV [57]. La radiación ultravioleta (UV) es uno de los factores ambientales más evidentes asociados al LES, ya que produce una exacerbación tanto del lupus cutáneo como del sistémico[58]. El uso habitual de tintes para el cabello se sugirió como factor ambiental asociado, pero no ha sido confirmado. Un estudio reciente reportó una asociación débil del tabaquismo y LES [59]. La ingestión de alfalfa ha sido asociada con el desarrollo de LES en varios reportes de casos [60].

Tabla 3

Tabla 3. Factores ambientales que pueden ser relevantes en la patogénesis de LES

Factores Fisicoquímicos
- Aminas aromáticas
- Hidracinas
- Drogas (procainamidas, clorpromazina, isoniazida, fenitoina, penicilamina, hidralazina)
- Tabaco, fumadores
- Tintes para el pelo
- Luz ultravioleta

Factores de la dieta
- L-canavanina, (granos de la alfalfa)
- Alta ingesta de grasas saturadas

Agentes infecciosos
- ADN bacterial/endotoxinas
- Virus, retrovirus

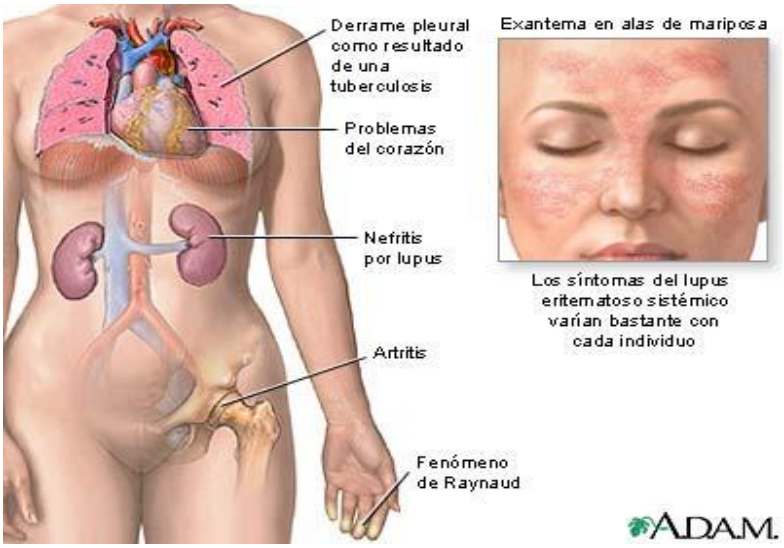
Hormonas y estrógenos medioambientales
- Terapia de reemplazo hormonal, anticonceptivos orales
- Exposición prenatal a estrógeno

1.4.2 Características de la enfermedad

El lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad prototípica autoinmune caracterizada por la producción de anticuerpos contra los componentes del núcleo de la célula en asociación con una serie diversa de manifestaciones clínicas. Los

autoanticuerpos producidos ocasionan la formación de complejos inmunes que, al acumularse en tejidos y órganos conducen a las lesiones sintomáticas más o menos extensas, volviéndose una enfermedad sistémica. Los órganos más afectados por estos depósitos son los glomérulos, la piel, los pulmones, el líquido sinovial entre otros. (Figura 10).

Figura 10. Órganos que se pueden afectar en LES



1.4.3 Síntomas Clínicos

Aproximadamente el 90% de los pacientes con lupus sistémico eritematoso experimentan fatiga. La artralgia y la mialgia son también muy frecuentes y suelen ir acompañadas de malestar general. La pérdida de peso y la fiebre persistentes son síntomas menos frecuentes pero más graves del lupus, también se presentan linfoadenopatias y esplenomegalia.

1.4.4 Manifestaciones clínicas

El LES es una enfermedad multisistémica por excelencia, caracterizada por un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que varían en frecuencia de aparición y severidad entre pacientes. El compromiso puede ir desde condiciones menos severas que comprometen la piel o las articulaciones hasta trastornos más severos que ponen en riesgo la vida como la nefritis o el compromiso neurológico. Dentro de las manifestaciones clínicas tenemos:

1.4.4.1 Cutáneas

Se pueden encontrar hasta en el 70% de los pacientes presentándose de manera heterogénea. Dentro de estas manifestaciones tenemos el eritema malar, ulceras orales, fotosensibilidad y el lupus discoide, las cuales se encuentran incluidas dentro de los criterios de clasificación de la enfermedad. El eritema malar y las ulceras orales son especificas de lupus y son lesiones agudas, en las ares expuestas al sol puede presentarse eritema maculopapular, estas lesiones agudas no dejan cicatriz. La alopecia no es especifica de lupus y junto con el lupus discoide son más frecuentes en raza afroamericana, mientras que el eritema malar y las ulceras orales son más comunes en población caucásica. El 60% de los pacientes presentan eritema malar en forma de alas de mariposa (Fig. 10). Se puede presenta en mejillas, mentón, puente de la nariz y pabellones de la oreja. Las lesiones son fotosensibles, pueden ser planas o elevadas y no dejan cicatriz. El lupus discoide, corresponde a lesiones hiperqueratósicas, acompañadas de taponamiento folicular, presentes en el cuero cabelludo y piel de la cara, son crónicas y dejan cicatriz. Se encuentran en el 20%de los pacientes y menos del 5% desarrollan LES [(1).]

1.4.4.2 Musculoesqueléticas

Mas o menos el 80% de los pacientes sufren compromiso músculo esquelético. La artritis lúpica se manifiesta sin erosiones óseas, generalmente se afectan las articulaciones

proximales, interfalángicas, metacarpofalángicas, carpos y rodillas. La mayoría de los pacientes presentan artralgias y mialgias, el 20% puede desarrollar fibromialgias. En los periodos de actividad de la enfermedad debido a la inflamación puede haber miopatía como la que tienen los pacientes con polimiositis o a veces se puede presentar debido a los medicamentos esteroides [(1).]

1.4.4.3 Cardiopulmonares

En el 80 % de los casos de lupus eritematoso sistémico, se detectan manifestaciones cardiovasculares, pudiendo ser afectada cualquiera de las estructuras cardiacas. La lesión más frecuente es la pericarditis (40%) de los enfermos, de intensidad leve o moderada, siendo por lo general, la primera manifestación de la enfermedad. Se pueden observar miocarditis, endocarditis, enfermedad valvular, arritmias, lesiones ateromatosas. Las manifestaciones pulmonares incluyen pleuritis y derrame pleural, que ocurren hasta en un 40% de los pacientes; compromiso pulmonar agudo secundario a infecciones, falla cardíaca , neumonitis y hemorragia pulmonar [(61).]

1.4.4.4 Hematológicas

La anemia hemolítica y la trombocitopenia autoinmune son frecuentes y, en ocasiones, pueden preceder en varios años al resto de manifestaciones del lupus. La anemia más frecuente es la de tipo normocitico-normocromico. Otras manifestaciones hematológicas frecuentes son: la presencia de linfopenia (<1000 /mm3), asociada a la actividad de la enfermedad, y neutropenia (<2500/mm3) [(1).]

1.4.4.5 Gastrointestinales

Se puede afectar el tracto gastrointestinal. Las lesiones orales son principalmente de tres tipos: lesiones eritematosas, indoloras y planas que se localizan en el paladar duro;

lesiones discoides, que pueden ser dolorosas y duras a la palpación, úlceras, poco profundas, de presentación dolorosa. Los síntomas gastrointestinales pueden incluir náuseas, vómitos, disfagia, reflujo gastroesofágico y dolor abdominal. La complicación más grave es la vasculitis intestinal.

1.4.4.6 Renales

La mayor parte de los enfermos de lupus sistémico muestran depósitos de inmunoglobulinas en los glomérulos, pero sólo un 50% muestran nefritis, con hematuria proteinuria y cilindruria. Sin embargo, la nefropatía lúpica puede presentarse en cualquiera de los componentes anatómicos del riñón (glomérulos, vasos, túbulos, intersticio), si bien las más importantes son las lesiones glomerulares [(62).]

1.4.4.7 Neuropsiquiatrícas

La incidencia de las manifestaciones neurológicas en el lupus eritematoso sistémico varia de forma significativa (46-91%) debido a su gran diversidad y a la variabilidad de su gravedad y duración. Entre las manifestaciones neurológicas centrales destacan la enfermedad cerebrovascular (isquémica o hemorrágica), el síndrome desmielinizante, la cefalea (migraña), crisis de epilepsia, maculopatía, trastornos del movimiento (corea), meningitis aséptica y estado confusional agudo (asociada al uso de medicamentos como azatioprina y algunos AINES). Se pueden presentar trastornos de ansiedad (20%), del estado de ánimo (50%) y psicosis (5%) [(63).]

1.4.4.8 Vasculares

La complicación más importante a nivel vascular es la trombosis. Esta manifestación se relaciona con los anticuerpos antifosfolipídicos (AAF), ya sea anticoagulante lúpico (AL) o

anticuerpos anticardiolipina (aCL). Otras manifestaciones vasculares son: el síndrome de Raynaud, hipertensión arterial secundaria y la coagulación arterial diseminada.

1.4.4.9 Oculares

Las manifestaciones oculares revisten gran importancia puesto que pueden constituir los primeros signos clínicos de la enfermedad a partir de los cuales se puede llegar al diagnóstico especifico o pueden servir como barómetro de la actividad y del pronóstico de la enfermedad sistémica. Pueden presentar conjuntivitis, epiescleritis, síndrome de Sjogren, uveítis y neuritis óptica. La complicación ocular más grave es la vasculitis retiniana, que puede producir ceguera.

1.4.5 Aspectos epidemiológicos

El LES afecta, sobre todo, el género femenino, con una relación mujer: hombre de 9 a 1. Su mayor incidencia se presenta entre la segunda y la quinta décadas de la vida, aunque se puede manifestar en edades extremas, con características clínicas e inmunológicas particulares [(64).] Cuando la enfermedad se desarrolla durante la infancia o en edad adulta (después de la menopausia), difiere de la forma clásica, con menos predominancia femenina y diferente presentación clínica [(65).] La incidencia del LES se ha triplicado desde los años setenta, de 1.51 por cada 100.000 habitantes (1950-1979) a 5.56 por cada 100.000 habitantes (1980-1992). Este incremento parece ser debido a un más temprano diagnostico de la enfermedad y a la inclusión de casos leves [(66).] Su incidencia y prevalencia varían según las poblaciones estudiadas, es más común en afroamericanos (200 por cada 100.000 habitantes) y en poblaciones asiáticas que en caucásicas (aproximadamente 40 casos por cada 100.000 habitantes) [(67, 68).]

La prevalencia del LES se incrementa desde África hacia Europa, un fenómeno conocido como la hipótesis de “gradiente de prevalencia” [(69, 70).] Los iniciadores potenciales de este

gradiente incluyen tanto factores genéticos y ambientales como diferencias nutricionales o de exposición a patógenos. La clínica de la enfermedad también varía entre las poblaciones. Se ha demostrado que la nefritis lúpica (71) es más frecuente y produce un daño orgánico más rápido en población hispana y afroamericana que en caucásicos [72, 73]. Se ha demostrado que en pacientes Latinoamericanos y Afroamericanos hay mayor prevalencia de enfermedad renal, pericarditis y LES discoide que en población Caucásica.[74].

1.4.6 Criterios de Clasificación de LES

Tabla 4.	Criterios de clasificación de LES según el Colegio Americano de Reumatología
1. Eritema facial	Eritema fijo, plano o elevado sobre eminencias malares
2. Lupus discoide	Lesiones cutáneas eritematosas, con cambios en la pigmentación y cicatrices residuales
3. Fotosensibilidad	Eritema malar causado por exposición a luz UV.
4. Úlceras orales	En la cavidad oral o nasofaríngea, usualmente con poco dolor, observadas por un facultativo
5. Artritis	No erosiva, que afecte a dos o más articulaciones periféricas con dolor inflamación o derrame articular
6. Serositis	Pleuritis o pericarditis, roce o evidencia de derrame pericárdico
7. Alteración renal	Proteinuria > 0.5 g/dl, > 3+ o cilindros celulares o hemáticos
8. Alteración neurológica	Convulsiones o psicosis, sin causa
9. Alteración hematológica	Anemia hemolítica; leucopenia (<4000/mm3) o linfopenia (<1500/mm3) en dos o más ocasiones, trombocitopenia (10000/mm3) en ausencia de fármacos que la produzcan
10. Alteración inmunológica	Anticuerpos anti-ADN (anticuerpos contra el ADN nativo) anti-Sm (anticuerpos contra el antígeno nuclear Sm) y/o anticuerpos Antifosfolipido
11. Anticuerpos antinucleares	Titulo elevado de ANAs (anticuerpos anti nucleares) detectados por inmunofluorescencia o ensayo equivalente, en algún momento de la evolución, en ausencia de fármacos que lo induzcan

Desde 1972 se han establecido criterios para la clasificación de la enfermedad para definir parámetros de inclusión de pacientes para estudios clínicos. Una primera modificación de

estos criterios fue realizada en 1982 y la última fue hecha en 1997. La presencia de cuatro o más criterios, en forma sucesiva o simultanea durante cualquier periodo de observación, permite clasificar a un paciente con LES [75]. (Tabla 4). Se han establecido diversos índices para medir la actividad de la enfermedad: índice de actividad de la enfermedad del LES (SLEDAI), medida de la actividad del lupus sistémico (SLAM) y el índice de la actividad lúpica (LAI). Estos diversos índices indican el número de órganos y sistemas afectados, así como la inclusión/exclusión de datos serológicos.

1.4.7 Tratamiento del LES

Dado que él LES es un desorden inmune complejo en el cual la pérdida de tolerancia a los antígenos del ADN y a otros antígenos, se asocia al desarrollo de autoanticuerpos que dañan órganos blanco, su objetivo es el control del proceso autoinmune. Muchas de estas nuevas terapias globales no suprimen el sistema inmunológico, pero el objetivo especifico son las vías de activación relevantes para la patogénesis del LES [76]. La terapia debe realizarse de acuerdo al compromiso que tenga el paciente.

Manejo no farmacológico: En cualquier brote clínico son medidas imprescindibles el reposo, guardar suficientes horas de sueño y evitar las situaciones de estrés. Una vez superado el brote, el paciente debe reanudar de forma progresiva su vida normal e incluso puede practicar ejercicio moderado con regularidad. En algunos pacientes, los síntomas empeoran con la exposición a los rayos ultravioletas del sol, mientras que a otros no les influye, o bien solo les afecta ocasionalmente. En cualquier caso, es aconsejable evitar la exposición al sol y, en caso de hacerlo, utilizar una crema con un alto factor de protección. El uso de píldoras anticonceptivas en altas dosis y la terapia de reemplazo hormonal están contraindicadas en estas pacientes.

Manejo con Fármacos: Los fármacos más utilizados en el lupus eritematoso sistémico son los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), los antipalúdicos, los corticoides y diversos citostáticos, como la ciclofosfamida, el micofenolato mofetilo, el metotrexate y la azatioprina.

AINEs: Se usan ampliamente por sus efectos antitérmicos, antiinflamatorios y analgésicos. Las manifestaciones articulares (artralgias y artritis) y las serositis (pleuritis y/o pericarditis) responden con frecuencia a estos fármacos.

Antipalúdicos: La cloroquina y la hidroxicloroquina son útiles en el tratamiento de las manifestaciones cutáneas y articulares, aunque hay que tener en cuenta que los efectos de estos fármacos solo se observan pasadas 3 o 4 semanas. Ambos fármacos pueden ocasionar retinopatías y miocardiopatías si se sobrepasan las dosis recomendadas.

Glucocorticoides: Los glucocorticoides más usados la prednisona, prednisolona y deflazacort. Están indicados en los pacientes con enfermedad cutaneoarticular activa que no han respondido a los AINEs y antipalúdicos, en casos de intensa alteración del estado general, y en las manifestaciones sistémicas graves (nefropatía, anemia hemolítica, trombocitopenia importante, miocarditis y vasculitis).

La ciclofosfamida se considera el tratamiento de elección en la nefropatía lúpica tipo IV. La azatioprina se administra por vía oral. Su efecto inmunodepresor es menor y se manifiesta mas tardíamente, pero por el contrario posee mejor tolerancia y menor toxicidad, y además puede utilizarse durante el embarazo.

Inmunodepresores: Están indicados en la nefropatía proliferativa difusa (tipo IV de la clasificación de la OMS) o en la focal con proliferación extracapilar, así como en casos de afectación del SNC, hemorragia pulmonar, citopenias graves y en aquellos pacientes que requieran dosis altas de corticoides para controlar la actividad de la enfermedad [76, 77].

1.4.8 Bases Inmunológicas del LES

Las características patológicas básicas de LES son la inflamación y las anormalidades de los vasos sanguíneos, que incluyen vasculopatía oclusiva, vasculitis, y el depósito de complejos inmunes. La patología mejor caracterizada está en el riñón, las biopsias renales en pacientes con LES muestran la proliferación de células mesangiales, inflamación, anormalidades de la membrana basal y deposito de complejos inmunes, incluyendo las inmunoglobulinas y los componentes del complemento[(54).] En él LES han sido descritos fallas en la eliminación de células apoptóticas y esos defectos pueden dar lugar a una elevada producción de macrófagos, los cuales van a presentar los antígenos intracelulares a las células T y B, dando lugar al proceso autoinmune [(78).] Las citoquinas expresadas en pacientes con LES juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, también hay una respuesta exagerada de las células B que dan lugar a la producción de un amplio espectro de autoanticuerpos y una elevada activación de células T.

1.4.8.1 Autoanticuerpos

El principal desorden inmunológico en pacientes con LES es la producción de autoanticuerpos. Estos anticuerpos se dirigen contra varias moléculas propias encontradas en el núcleo, el citoplasma, y la superficie de la célula, además de las moléculas solubles tales como IgG y factores de coagulación. Los anticuerpos antinucleares son los más característicos y están presentes en el 95% de pacientes durante el curso de la enfermedad [(54).] Los anticuerpos Anti-ADN de doble cadena (ds-ADN) y anti-SM son específicos para LES. De hecho, su presencia se incluye en los criterios de clasificación de LES [(79).] El antígeno Sm es una pequeña ribonucleoproteína (snRNP) compuesta de un único grupo de moléculas de RNA ricas en uridina ligadas a un grupo común de proteínas centrales y otras proteínas asociadas con moléculas del RNA. Los anticuerpos anti-Sm reaccionan contra proteínas centrales snRNP, mientras que los anticuerpos anti-ADN lo hacen contra determinantes antigénicas conservadas, presentes

ampliamente en el DNA. La característica más notable de los anticuerpos anti- ADN es su asociación con la Glomerulonefritis, estos pueden ser aislados de eluidos glomerulares de pacientes con nefritis lúpica activa e incluso pueden inducir el desarrollo de la misma en ratones normales y con inmunodeficiencia combinada severa[79]. Su implicación en la nefritis está documentada por varias evidencias circunstanciales: primero, observaciones clínicas en la mayoría de pacientes indican que la nefritis activa está asociada con títulos elevados de anti-ADN y valores reducidos de complemento. Segundo, los anticuerpos anti-DNA muestran un depósito preferencial en los riñones, sugiriendo que la formación de complejos inmunes es un importante mediador de inflamación renal [80]. Estos anticuerpos pueden unirse a fragmentos de DNA adheridos en la membrana basal glomerular por medio de las histonas o interactuar con otros antígenos presentes en el glomérulo como el C1q, los nucleosomas, el heparán sulfato y la laminina, entre otros [81]. Esta unión puede desencadenar el proceso inflamatorio inicial y la activación del complemento. Sin embargo, la correlación entre los niveles de anti-DNA y nefritis no es absoluta. Sólo ciertos tipos de anticuerpos anti-DNA son patogénicos [82]. Algunos pacientes con nefritis lúpica activa no tienen anticuerpos anti-DNA, mientras otros que poseen estos anticuerpos e incluso a títulos altos no tienen compromiso renal. Sus propiedades como el isotipo, la capacidad para fijar el complemento y su capacidad para unirse al tejido glomerular explican estas diferencias.

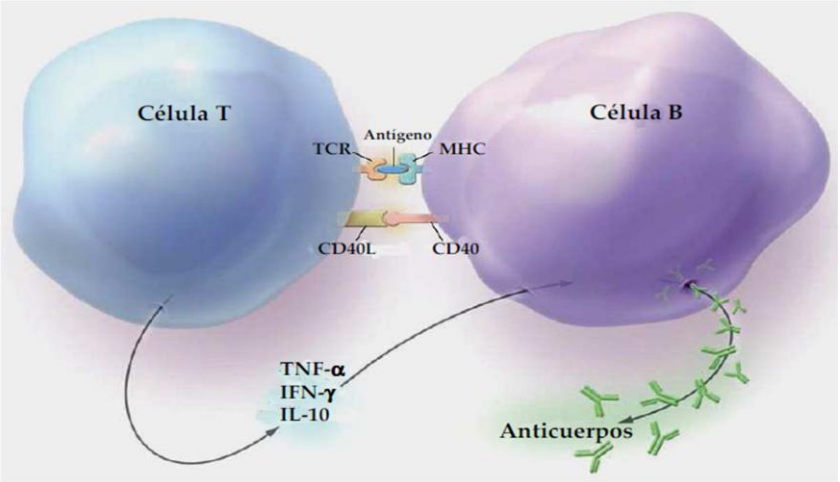
Aunque se ha determinado la asociación de otros autoanticuerpos con manifestaciones clínicas del LES, como anticuerpos: anti-ribosomal P y psicosis, anti-Ro y el bloqueo congénito de corazón y lupus subagudo cutáneo, la patogenicidad de estos anticuerpos no ha sido estudiada suficientemente [54].

1.4.8.2 Células T en LES

Las células T juegan un papel importante en la regulación del sistema inmune. El LES está caracterizado por un desbalance entre linfocitos T citotóxicos (Tc) y linfocitos T

colaboradores (Th). Parece que la ayuda excesiva e incontrolada de las células T en la diferenciación y activación de las células B productoras de autoanticuerpos es probablemente un camino final común [54]. Las células T en pacientes con LES reconocen a través de sus receptores de células T (TCR) autoantígenos como partículas de ribonucleoproteinas, aumentando la afinidad de las células B autorreactivas, dando lugar a la producción de autoanticuerpos (Figura 11). La activación de las células T y B requieren del estimulo por parte de antígenos específicos. Sustancias químicas como la prístina, el DNA bacteriano y fosfolípidos de la membrana celular, y agentes virales pueden inducir la síntesis de anticuerpos anti-DNA en ratones [82]. Por otra parte, autoantígenos como los complejos DNA-proteína y RNA-proteína pueden también inducir la síntesis de autoanticuerpos [83]. Los antígenos ambientales y los autoantígenos son reconocidos por las células presentadoras de antígenos profesionales (CPA) o se unen a anticuerpos presentes en la superficie de células B. Estos antígenos son presentados a través de una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) que se encuentra en la superficie de las células presentadoras de antígeno (CPA).

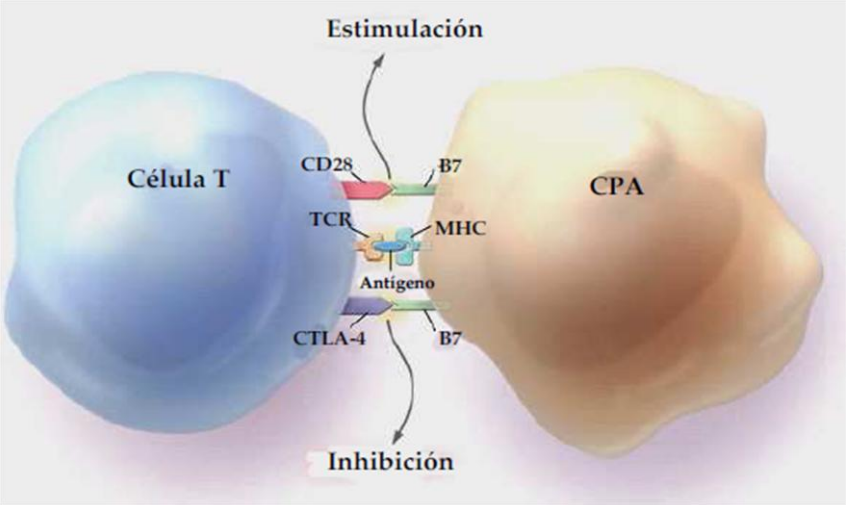
Figura 11. Interacción entre célula T y célula B



T h e New England Journal *o f* medicine

La presentación de este complejo antígeno-CMH no es suficiente para estimular a la célula T. Esta unión debe ir acompañada de una segunda interacción de coestimulación con el linfocito T (Figura 12). Existen varias parejas de coestimuladores moleculares, incluyendo la pareja CD40-CD40 Ligando y CD28-B7, las cuales son capaces de generar la segunda señal requerida para la activación de la célula T [41]. Otra posible interacción puede ocurrir entre la molécula B7 y CTLA-4 (antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico), la cual es inhibitoria. Si se produce la señal positiva mediante la interacción de CD28-B7, la célula T es activada, se produce la liberación de citoquinas y se promueve la inflamación. Por el contrario, si domina la señal negativa mediada por la interacción de CTLA-4-B7, la activación de la célula T se suprime [54].

Figura 12. **Presentación de autoantígenos:** señales, coestimulatoria (CD28/B7) y señal inhibitoria (CTLA4/B7)



T h e new England journal o f medicine

1.4.8.3 Células B en LES

La activación de los linfocitos B es anormal en los pacientes con LES. El número de células B en todos los estados de activación se encuentra aumentado en la sangre periférica de

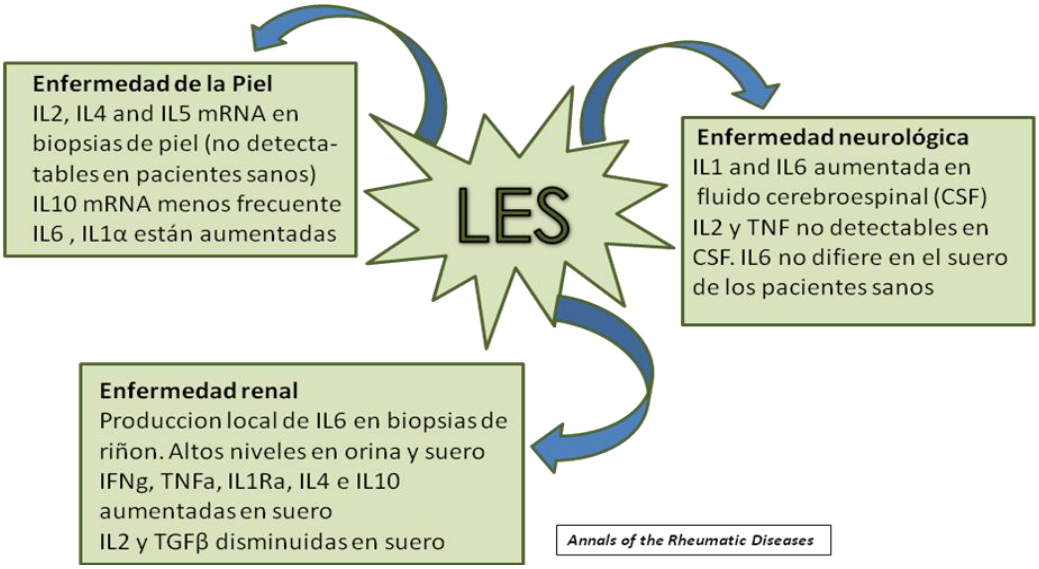
pacientes con LES activo[84]. La síntesis de autoanticuerpos puede preceder el desarrollo clínico de la enfermedad. Este hallazgo es similar al observado en otras EAI en las cuales se puede determinar la presencia de anticuerpos durante un largo período de tiempo antes de la primera manifestación clínica (anticuerpos predictores)[85]. Esto indica que las EAI tienen una evolución desde la respuesta inmune normal (autoinmunidad), hacia autoinmunidad patológica (EAI) influenciada por la genética y el medio ambiente. Las células B en los pacientes con LES tienen además, mayores concentraciones de calcio intracitoplasmático comparadas con pacientes sanos [86]. También existe evidencia que estas células son más sensibles a los efectos estimulatorios de citoquinas como IL-6[87]. De esta forma, las células B en los pacientes con LES son más susceptibles a la activación policlonal por antígenos, citoquinas y otros estímulos. Anormalidades en las células T se observan en pacientes con LES. El número total de células T se encuentra reducido en sangre periférica, probablemente debido a los efectos de anticuerpos antilinfocito [88]. Se encuentra además un sesgo en su función de interacción con los linfocitos B lo que induce a estos últimos a amplificar la producción de autoanticuerpos [89]. Sinembargo, la activación celular T es defectuosa en pacientes con LES [90, 91]. Su capacidad para proliferar en respuesta a un estímulo mitogénico y para producir IL-2 se encuentra reducida [92-95]. Las razones que explican el defecto de la respuesta Th1 son especulativas, entre éstas están: baja regulación por exceso de citoquinas Th2, un defecto en la interacción entre CPA y células T, efectos supresores de los linfocitos T CD8+ y las células NK, la presencia de inhibidores de IL-2, una baja regulación de los receptores de IL-2 y disminución de linfocitos T_{Reg} CD4+ CD25+ [95, 96].

1.4.8.4 Citoquinas en LES

Muchas citoquinas han sido implicados en la regulación de la actividad de la enfermedad y en la participación en los diferentes órganos de pacientes con LES. La producción de citoquinas en pacientes con LES difiere de la que ocurre en individuos sanos o pacientes con otras EAI como la AR, incluso esta producción difiere entre los diversos fenotipos de la

enfermedad [97], por ejemplo, los niveles de interleuquina 6 (IL-6) están aumentados en el liquido cerebro espinal de pacientes con LES que presentan síntomas neurológicos; sinembargo, este incremento no ocurre en pacientes que no presentan estos síntomas [98]. Puede ser que como en otras enfermedades inflamatorias, el equilibrio de las citoquinas sea más importante en la determinación del fenotipo o severidad de la enfermedad que en la determinación de susceptibilidad de la misma (Figura 13).

Figura 13. Resumen del perfil anormal de citoquinas en piel, riñón y sistema neurológico en el LES.



El balance de las citoquinas en pacientes con LES: Las células Th CD4+ pueden dividirse en dos subpoblaciones principales basándose en las citoquinas producidas por estas células. Las células Th1 que producen principalmente IFN-γ e IL-2 (citoquinas pro-inflamatorias) y que promueven la inmunidad mediada por células, y las células Th2 que secretan principalmente IL-4, IL-5 e IL-10 (citoquinas anti-inflamatorias) que están asociadas con la respuesta inmune humoral, lo cual induce la producción de autoanticuerpos [99]. En muchos desordenes autoinmunes, como es el caso del LES, se ha demostrado que el desbalance entre la producción de citoquinas Th1 y Th2 juega un papel clave en la

inducción y el desarrollo de la enfermedad [100]. En pacientes con LES se ha visto que los niveles de citoquinas proinflamatorias como interleuquina 2 se encuentran bajos, en cambio se encuentran elevados los de las citoquinas antiinflamatorias como la IL4, e IL10 [101]. El LES ha sido considerado históricamente como una enfermedad tipo Th2. El TNF-α ha demostrado reducir la actividad del LES en ratones (102) En pacientes hemos observado niveles altos de esta citoquina, en particular en aquellos con enfermedad inactiva, sugiriendo un papel protector.

1.4.8.5 Apoptosis

Defectos en la apoptosis pueden llevar a una mayor sobrevida de los linfocitos patogénicos. Esta hipótesis ha sido demostrada en modelos murinos de LES. El ratón MRL/lpr, portador del alelo *lpr*, asociado con un defecto de los receptores Fas (CD95), desarrolla una EAI similar al LES humano. Esta molécula Fas cuando interactúa con su ligando (FasL) traduce señales de apoptosis [103]. Dado que esta interacción se encuentra defectuosa, los ratones presentan una linfoproliferacion importante que compromete, entre otros órganos, los riñones (glomerulonefritis) [104]. Otro tipo de modelo, el ratón *Gld/gld*, caracterizado por presentar una molécula FasL no funcional, presenta también linfoproliferacíon, hipergamaglobulinemia y depósito de complejos inmunes (CIs) en el riñón [105]. Ambos modelos, aunque utilizados para el estudio de la enfermedad, difieren del modelo humano, en el que se observa linfopenia en vez de linfoproliferación y la expresión de Fas-FasL es normal [106, 107].

El papel de la apoptosis en el LES parece deberse más a alteraciones en la depuración de células apoptóticas por parte de los macrófagos, la cual se encuentra disminuida [108]. Las razones que explican esta alteración no son claras, pero pueden estar asociadas a defectos cualitativos y cuantitativos de proteínas del complemento como C2, C4 y C1q. Los pacientes con deficiencias homocigóticas de estos componentes padecen un lupus severo

a una edad temprana [109]. La disminución de la depuración de las células apoptóticas favorecería una mayor exposición de antígenos al sistema inmune [110, 111].

1.4.8.6 Alteraciones en el sistema del complemento

Individuos con alteraciones en la vía clásica del complemento (C4, C1q) tienen mayor riesgo de presentar LES. En la práctica clínica, niveles bajos del complemento indican actividad de la enfermedad, en particular en el riñón [112]. Dos hipótesis se han propuesto para explicar el desarrollo de LES en personas con deficiencias del complemento. La primera de ellas, ya señalada, es la "hipótesis de depuración" que plantea que una inadecuada depuración de cuerpos apoptóticos genera una inapropiada activación de células T y B autorreactivas. La segunda hipótesis, llamada "hipótesis de tolerancia", plantea que los componentes de la inmunidad innata son importantes en la selección negativa de los linfocitos autorreactivos, principalmente de las células B específicas para autoantígenos. Los componentes C1q y C4 aumentan la presentación de antígenos a células B inmaduras en la médula ósea. Cuando estas células B inmaduras encuentran un antígeno en estas circunstancias son seleccionadas negativamente. Así se disminuye el proceso de maduración y activación de células B autorreactivas[113].

1.4.8.7 Trastornos de la regulación inmune

La depuración de los CIs por las células fagocíticas es un mecanismo que se encuentra alterado en los pacientes con LES[114]. La fagocitosis de IgG2 e IgG3 disminuida puede explicarse por alteraciones en los receptores para inmunoglobulinas (FcγR), cuyo polimorfismo genético ha sido asociado a la enfermedad[114, 115]. También se ha determinado que la fagocitosis no-inflamatoria de células apoptóticas esta disminuida [108]. La persistencia de estos cuerpos apoptóticos podría servir como inmunógenos para la inducción de linfocitos autorreactivos y como antígenos para la formación de complejos inmunes. Por otra parte, la supresión de la actividad de las células B por parte de los

linfocitos T CD8+ supresores y las células asesinas naturales (NK) está alterada[89, 116]. Esta supresión disminuida puede ser un factor que facilite la perpetuación de la enfermedad.

1.5 ESCLERODERMA

1.5.1 Etiología

La escleroderma es una enfermedad de causa desconocida, se dice que factores ambientales actúan sobre individuos genéticamente susceptibles dando lugar a su expresión clínica. Adicionalmente interacciones gene-gene, y/o gene-medioambiente modulan probablemente el inicio de la enfermedad y/o el curso clínico[117]. Han propuesto a varios factores como agentes causativos, incluyendo la exposición a solventes orgánicos y toxinas, tanto en casa como en el lugar de trabajo [118, 119].

1.5.2 Características de la enfermedad

La escleroderma (palabra de raíces griegas que quiere decir literalmente piel (derma) endurecida (skleros) es una enfermedad que afecta al tejido conectivo o conjuntivo del organismo, tanto el que se encuentra bajo la piel, como el que contribuye a la estructura de sostén de la pared de las pequeñas arterias y de los órganos internos. La piel se endurece, especialmente en la cara y en las manos [120]. (Figura 4).

Figura 14. **Paciente con escleroderma, presenta fenómeno de Raynaud**

Los fibroblastos, células del tejido conectivo que elaboran el colágeno, en la escleroderma están fuera de control y lo producen en exceso, siendo esta la causa del engrosamiento y endurecimiento de la piel y los órganos que contienen colágeno como sostén de sus estructuras. La escleroderma también puede ser localizada, usualmente circunscrita a algunos lugares de la piel como una placa ovalada endurecida llamada morfea o también como escleroderma lineal, donde la piel está comprometida en forma de línea afectando un brazo, una pierna o un lado de la cara. La ES se caracteriza por presentar vasculopatía, que incluye la proliferación fibrointimal de pequeños vasos y episodios vasoespásticos que conducen a isquemia y son provocados por la exposición al frío o a estrés y son llamados fenómeno de Raynaud [(121).] Estos episodios pueden aparecer años antes de la fibrosis de la piel. Hay una asociación estrecha entre autoanticuerpos específicos que son marcadores para distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad [(117).] La fibrosis y vasculopatía más importante se presenta en los pulmones, siendo la causa principal de morbimortalidad en pacientes con Es.

1.5.3 Síntomas clínicos

Las manifestaciones clínicas de la esclerodermia varían de una persona a otra ya que pueden ser variadas las combinaciones de síntomas y de signos. Los síntomas limitados de la escleroderma se conocen como CREST: C: calcinosis, depósitos de calcio en piel, R: síndrome de Raynaud, E: compromiso esofágico, S: esclerodactilia engrosamiento y tensionamiento en dedos, manos y pies, T: talangiectasias

Cutáneos: Al comienzo de la enfermedad, hinchazón de los dedos de los manos y de la cara a causa del edema, sustituida, más tarde, por engrosamiento y rigidez de la piel.

Vasculares: Fenómeno o Síndrome de Raynaud.

Digestivos: Cuando la enfermedad afecta al esófago falla el mecanismo de conducción de lo ingerido desde la boca al estómago y se produce reflujo asociado incluso a dificultad para tragar (disfagia). También puede observarse trastornos en la movilidad y en la capacidad de absorción de los nutrientes en el intestino delgado.

Respiratorios: La afección pulmonar puede provocar disnea (dificultad para respirar), sobre todo provocada por el esfuerzo.

Cardíacos: A la larga la afección cardíaca puede provocar arritmias, dolor retro-esternal e incluso insuficiencia cardíaca.

Renales: La implicación del riñón en el endurecimiento del tejido conectivo puede originar, a largo plazo, hipertensión arterial e insuficiencia renal.

Articulares: Dolor y rigidez en las articulaciones, especialmente de los dedos de las manos.

1.5.4 Diagnóstico

En 1980 fueron publicados los criterios diagnósticos para la Esclerosis Sistémica. Estos criterios presentan una sensibilidad del 97% y una especificidad del 98%, lo que quiere decir que son muy fiables para el diagnóstico, requiriéndose un criterio mayor o la combinación de dos menores para el diagnóstico. Algunos investigadores y clínicos postulan la necesidad de incluir signos como el fenómeno de Raynaud o determinados anticuerpos en los criterios diagnósticos. (Tabla 5).

Tabla 5.	**CRITERIOS DE CLASIFICACION DE LA ESCLERODERMA**
CRITERIO MAYOR	
Esclerodermia proximal	Engrosamiento retracción e induración simétrica de la piel de los dedos y de la piel proximal a las articulaciones metacarpofalángicas. Los cambios pueden afectar a toda la extremidad, la cara, el cuello y el tronco
CRITERIOS MENORES	
Esclerodactilia Cicatrices	Los cambios arriba indicados pero limitados a los dedos de las manos cicatrices, digitales o pérdida de sustancias de los pulpejos de los dedos, áreas deprimidas en las puntas de los dedos o pérdida de tejido en los pulpejos, como resultado de isquemia.
Fibrosis pulmonar bilateral	Patrón reticular de densidades lineales o lineo nodulares bilaterales, más pronunciado en las porciones básales de ambos pulmones. En un estudio radiológico de rutina, puede tener la apariencia de moteado difuso o pulmón “en panal de abeja”. Estos cambios no deben ser atribuibles a enfermedad pulmonar primaria.

1.5.5 Aspectos epidemiológicos

La escleroderma es una enfermedad crónica autoinmune, la cual afecta entre 150.000 y 500.000 norteamericanos, predominantemente mujeres, con inicio de la enfermedad entre los 30 y 50 años de edad. La tasa de prevalencia es de 30 personas por cada 100.000 habitantes y la proporción es de cuatro mujeres por cada hombre afectado. En realidad se trata de una patología que tiene alta mortalidad en su forma difusa (50% a 5 años), especialmente cuando existe compromiso pulmonar y renal [(122).]

1.5.6 Evolución

Escleroderma localizada: Involucra sólo problemas de la piel de las manos y de la cara, ésta empeora muy lentamente y por lo general no afecta ninguna otra parte del cuerpo.
Escleroderma sistémica: Muy variable, desde la estabilización cutánea (estadio I), hasta la afección pulmonar (estadio II) o cardiaca o renal (estadio III), rápida.

1.5.7 Tratamiento

1.5.7.1 Inmunosupresores

Desde hace mucho tiempo se sabe que existe un componente inmunitario donde están implicados el sistema inmune innato y adaptativo, y a la vez compromiso del sistema humoral y celular, con importantes hallazgos recientes como la identificación de anticuerpos anti-endotelio y su implicación en la inmunopatogenia de ES.

Ciclofosfamida: La ciclofosfamida (Cy) es un agente alquilante que disminuye la replicación del ADN, es citotóxica, generando inmunosupresión humoral y celular. Ha sido utilizada ampliamente en Es cuando se asocia a alveolitis y fibrosis pulmonar intersticial.

Metrotexate: El metrotexate es un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa, depletando los niveles de folatos necesarios para la síntesis de purinas y pirimidinas, inhibiendo de esta forma la proliferación celular.

Ciclosporina: La ciclosporina es un péptido de 11 aminoácidos que posee actividad inmunosupresora por medio de la unión intracelular a la proteína ciclofilina, formando un complejo que inhibe la enzima calcineurina, con lo cual inhibe la primera fase de activación de los linfocitos T y la producción de IL-2.

D-Penicilamina: La D-Penicilamina ha sido utilizada por mucho tiempo dado sus propiedades teóricas antifibróticas al bloquear los grupos aldehído involucrados en la formación de puentes inter e intramoleculares en el colágeno.

1.5.7.2 Vasodilatadores

Epoprostenol: Es un producto derivado del ácido araquidónico, producido por las células endoteliales y tiene potentes propiedades vasodilatadoras

Bosentan: Es una nueva molécula que actúa como antagonista oral de la endotelina por medio del bloqueo de sus receptores A y B que tienen un potente efecto vasoconstrictor y mitógeno del músculo liso [(122).]

1.5.8 Patogenia y bases moleculares de Escleroderma

1.5.8.1 Daño vascular: Células endoteliales, apoptosis y defecto en la vasculogénesis.

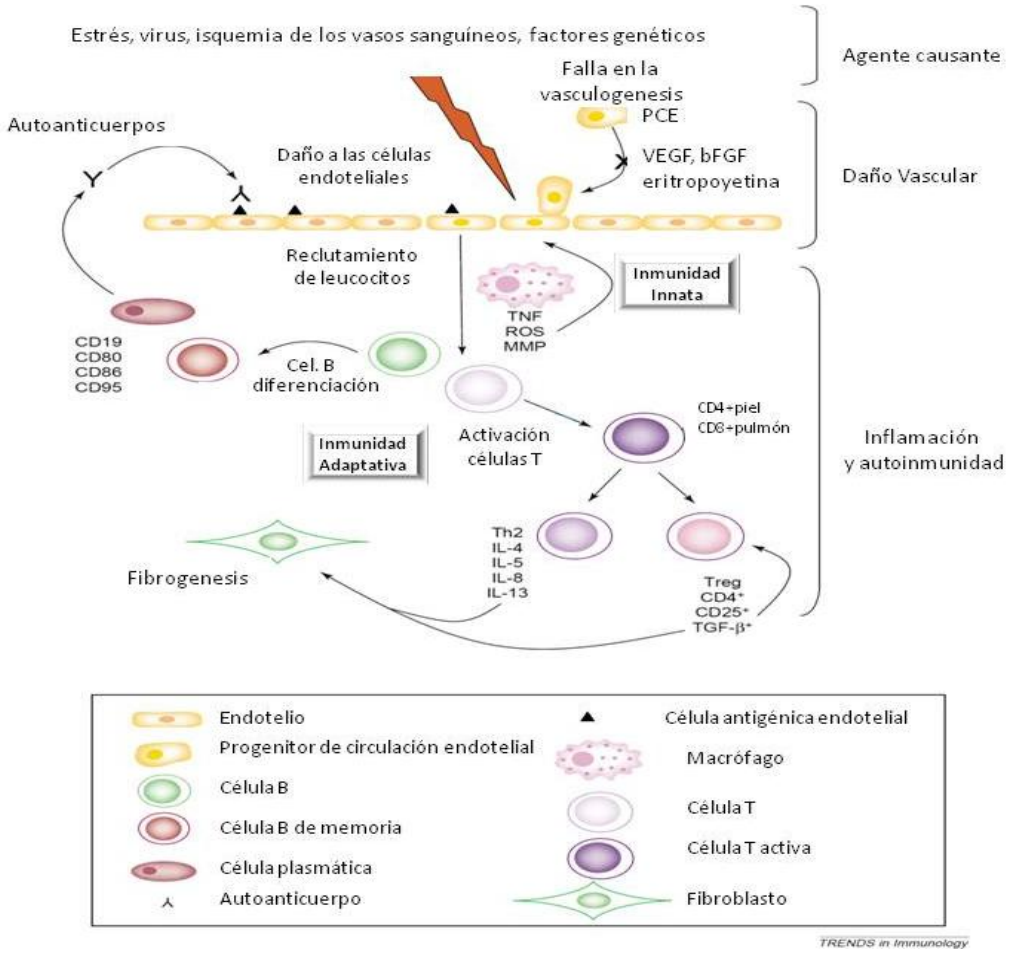
La enfermedad vascular es un componente que ocurre extremadamente temprano y es muy importante en Es. Hay daño en la regulación vasomotora (constricción y dilatación de los vasos sanguíneos), que proviene de la sensibilización y la producción alterada de factores, vasodilatadores como el oxido nítrico y vasoconstrictores como endotelinas [(123).]
Este ambiente patológico podría preceder al daño vascular o podría ser una consecuencia de daño más temprano, conduciendo después al daño de las células endoteliales y a cambios morfológicos y funcionales de la circulación. Los microvasos muestran un incremento en la permeabilidad, aumentando la migración de leucocitos a través del endotelio y la activación de las cascadas de coagulación y fibrinólisis, que culminan en trombosis [(124, 125).]

La vasculopatía afecta capilares y arteriolas (aunque hay amplias evidencias que los grandes vasos están involucrados también) severamente, bloqueando el flujo sanguíneo y reduciendo la oxigenación de los tejidos.

La apoptosis es mediada por anticuerpos anti-endotelio y la inducción de la vía Fas (CD95), además por la activación de periocitos microvasculares y la proliferación intimal, causando la oclusión de los vasos sanguíneos. La cual es caracterizada por capilaroscopia avascular, y densidad capilar reducida [124, 126]. A pesar de tales condiciones de isquemia, el proceso de revascularización que normalmente restablece el flujo sanguíneo al tejido isquémico parece fallar, posiblemente como consecuencia de la función anormal del progenitor de células endoteliales circulantes (PEC) [127, 128]. Aún en un ambiente angiogénico aumenta la migración de leucocitos.

Las anormalidades inmunológicas dentro del sistema inmune innato y adaptativo incluyen alteraciones en los repertorios y las actividades de células B y células T, el desarrollo de autoanticuerpos antígeno-específicos y la modulación de citoquinas, quemoquinas y factores de crecimiento. Así, anormalidades fundamentales en múltiples tipos de células, incluyendo células endoteliales vasculares, células de músculo liso, células inmunes (células B, células T, macrófagos y neutrófilos), y células de origen mesenquimal son la base de la patogénesis de la ES [129-132]. (Figura 15). La presencia de agentes infecciosos, como citomegalovirus humano (hCMV) [133], y el estrés oxidativo asociado con la generación de radicales libres [123], son también agentes potenciales causativos y factores candidatos que podrían modificar la progresión de la enfermedad

Figura 15. Patogénesis de autoinmunidad en ES. PCE; progenitor endotelial circulante, TNF; factor de necrosis tumoral, VEGF; factor de crecimiento endotelial vascular, bFGF; factor de crecimiento endotelial, ROS; especies reactivas de oxigeno, MMPs; metaloproteinasas, ET-1; endotelina 1



El daño a los microvasos del endotelio y el tejido circundante inicia una secuencia de acontecimientos, incluyendo la liberación de mediadores proinflamatorios, factores de crecimiento y quemoquinas, que activa procesos de reparación, y el reclutamiento de leucocitos en el tejido extravascular. La acumulación de leucocito inadecuada promueve la inflamación, la liberación de enzimas de degradación (MMPs) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que causan amplio daño al tejido. La transición de la inmunidad innata (macrófagos) a la inmunidad adaptativa es acompañada por

interacciones recíprocas que promueven la activación de las células T y el desarrollo de una respuesta de células Th2.

Las células Th2 producen citoquinas, como IL-4, IL-5 y IL-13, que tienen actividades pro-fibroticas y son importantes en la orquestación de la reparación de tejido conectivo. Las células T_{Reg} CD4 + CD25 mantienen la tolerancia inmune y producen y requieren del TGF-β para su expansión. El TGF-β promueve además el desarrollo de fibrosis por activación directa de los fibroblastos para que sinteticen colágeno. El estímulo de las células B conduce a la generación de autoanticuerpos específicos de la enfermedad [134].

1.5.8.2 Células T en ES.

Hay evidencias que sugieren que las células T son importantes en el patogénesis de la ES [135]. (Tabla 6).

Tabla 6	Evidencias de la participación de las células T en Es
1.	Las células T se infiltran en la piel temprano, antes de cualquier prueba de fibrosis
2.	La frecuencia de células T activadas en la sangre y lesiones de la piel, está aumentada
3.	Las células T son tipo Th2, productoras de interleukin-4, que induce a los fibroblastos para que produzcan colágeno. También induce la producción del TGFβ que actúa como mitógeno para el fibroblasto
4.	Las células T son necesarias para la producción de anticuerpos
5.	La enfermedad de injerto vs. huésped es una enfermedad mediada por células T, y se asemeja a ES
6.	Tratamientos directos contra Células T mejora la Es.
7.	Las células T que se infiltran en lesiones de la piel contienen células T oligloconales inducidas por Ags.

En especímenes secuenciales de biopsias de piel de pacientes con Es, la células mononucleares infiltradas consisten en células T y macrófagos que aparecen en la piel temprano [136, 137], antes de cualquier evidencia microscópica de fibrosis. Las células T aparecen en el área perivascular junto con macrófagos. Las células T con el fenotipo de memoria también fueron encontradas en especímenes de biopsia pulmonares de

pacientes con Es y con implicación pulmonar [138]. También se encontró que células T son necesarias para la producción de autoanticuerpos anti-topoisomerasa I en Es [139], que junto con otros autoanticuerpos, es un rasgo característico de pacientes con la enfermedad.

1.5.8.2.1 Receptores de células T en ES

Las células T en Es son activadas no específicamente por citoquinas o quemoquinas y específicamente por antígenos. Las células T usan sus receptores antigénicos (TCRs) para reconocer, en general, péptidos antigénicos en asociación con HLA (clases I y II) e iniciar una respuesta inmune. Dos TCRs diferentes han sido reportados, el TCR α/β y el TCR γ/δ, los cuales son expresados en una pequeña proporción (por lo general el 10 %) de células T de sangre periférica [140, 141]. La población de células T abarca un número muy grande de diversos clones de células T, que es definido por la expresión de cada TCR diferente. La activación y la proliferación no específica de las células T pueden ocurrir in vivo en respuesta a quemoquinas, citoquinas, o mitógenos y causarían una gran población policlonal y heterogénea de células T que expresan un TCR único, cuando son comparados el uno con el otro. Resultados de investigaciones demuestran la presencia de células T oligoclonales o en ciertos casos monoclonales en biopsias de piel de pacientes con ES. Es muy probable que estas células T han sufrido la proliferación específica conducida por antígenos y la proliferación clonal in vivo en respuesta a un antígeno aún no identificado. Lo cual sugiere que la ES. es una enfermedad de células T dirigida por un antígeno [135]. Asimismo en fluido de lavado bronco-alveolar de pacientes con ES, se han encontrado células T CD8 + y CD4+.

1.5.8.3 Activación de célula T y producción citoquinas que conducen a fibrosis

La activación y la proliferación de los clones de células T relevantes en pacientes con ES, en respuesta al estímulo específico por un antígeno de ES (péptido/epitopos CMH), implican la unión de TCRs de células T con los complejos apropiados (péptido/CMH). En presencia de señales coestimulatorias apropiadas [(142),] una respuesta de células T productiva ocurrirá y es caracterizada por la proliferación de células T y la producción de citoquinas.

Las células T helper CD4+ (células Th) se diferencian en dos grupos: Th1 y Th2, y se caracterizan por secretar distintos patrones de citoquinas. Mientras las células Th1 secretan citoquinas proinflamatorias, como interferón-γ (IFN-γ), IL-2, y el TNF-α, promoviendo así la inmunidad mediada por células, las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, y IL-13, facilitando así la inmunidad humoral.

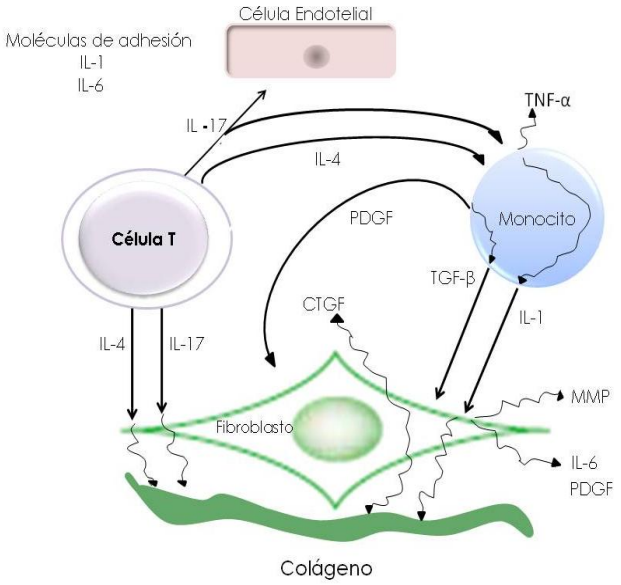
IL-17, puede ser producida tanto por célula Th1 como por células Th2 [(143),] y es sobre expresada en la sangre periférica y la piel de pacientes con ES [(144).] IL-17 aumenta la proliferación de fibroblastos [(144),] e induce la producción IL-6 por fibroblastos y células endoteliales [(145);] así mismo promueve la síntesis del TNF, la producción IL-1, y aumenta la expresión de moléculas de adherencia sobre células endoteliales. La IL-1 alternamente induce los fibroblastos a producir colágeno y la IL-6 induce el factor de crecimiento plaquetario-derivado (PDGF). El PDGF es un mitógeno fibroblastico que estimula la síntesis de colágeno [(146).] (Figura 16).

Las células T CD4+ son las mayores productoras de la proteína IL4. [(147).] En pacientes con ES, las células Th2 son activadas y producen grandes cantidades de IL-4, citoquina profibrótica. Niveles de IL-4 se encuentran aumentados en muchos pacientes con ES. La IL-4 aumenta la producción de colágeno, fibronectina, glicosaminoglicanos, y la síntesis de proteoglicanos in vitro. [(148-151).] En cambio el IFN-γ inhibe la síntesis de colágeno por los

fibroblastos in vitro e in vivo en ratones [151, 152]. Además de la IL-4, la principal citoquina fibrogénica en escleroderma, es el TGF-β. La IL-4 promueve la producción de TGF-β [153, 154], el cual es expresado sobre las células mononucleares infiltrantes, células endoteliales, y fibroblastos en etapas tempranas de fibrosis de la piel [155, 156].

El TGF-β, también induce la producción del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) por los fibroblastos. Hay por lo menos 3 isoformas de TGF-β TGF-β1, TGF-β 2, y TGF-β 3. El TGF-β TGF, para unirse a su receptor, activa factores de transcripción llamados Smads, algunos de los cuales son estimulatorios y otros inhibitorios [157]. Los fibroblastos de piel con ES pueden producir las cantidades de TGF-β similar a las secretadas por los fibroblastos de la piel normal, pero expresan niveles más altos del receptor TGF-β tipo 1 (TGF RI) y tipo TGF RII [158, 159]. TGF-β 1 puede causar la activación del fibroblasto, hiperplasia y la síntesis aumentada de colágeno y fibronectina, también inhibe las metaloproteinasas de la matriz [160]. IL-17 y TNF (EC) promueven el reclutamiento de células inflamatorias en áreas perivasculares en las células endoteliales.

Figura 16. Participación de las células T en la fibrosis de ES. MMP**;** mataloproteinasas de la matriz

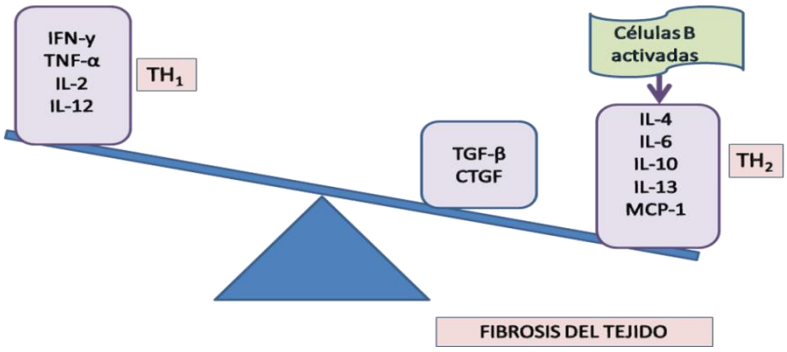


1.5.8.4 Células B en ES

Se Sabe que las células B activadas producen IL-6 y IL-10, las cuales inducen respuestas inmunes Th2 predominantes, que inducen fibrosis del tejido [161, 162]. El aumento de IL-6 producida por las células B activadas directamente puede promover la fibrosis del tejido en pacientes con ES. Las células B activadas expresan altos niveles de moléculas del CMH clase II y moléculas co-estimulatorias siendo casi tan eficaces como las células dendríticas en su capacidad de células presentadoras de antígenos. Las células que presentan antígenos juegan un papel crítico para la diferenciación de células T helper.

Las células Dendríticas preferencialmente evocan una respuesta Th1 por la producción de IL-12 [163], mientras que las células B promueven el desarrollo de las células Th2 [164, 165]. Alternativamente, las células B podrían influir en el equilibrio de Th1/Th2 por regulación de la función de las células dendríticas: IL-10 producido por células B activadas inhiben la producción de IL-12 por células dendríticas, promoviendo así la diferenciación Th2 [166]. (Figura 17). Estos hallazgos sugieren que las células B son críticas para el desarrollo de las respuestas Th2. Aunque los macrófagos sean una fuente importante de TGF-B1, las células B activadas también secretan niveles significativos de TGF-B activo in vitro [167], por lo tanto, el TGF-β liberado de células B activadas puede inducir la síntesis de colágeno excesiva por fibroblastos de pacientes con ES. Adicionalmente, la fibrosis de tejido inducida por el TGF-β puede ser aumentada por otras citoquinas como CTGF, IL-4, IL-13, Y MCP-1 [154, 168-170]. El TGF-β, CTGF y citoquinasTh2 cooperativamente pueden contribuir a la patogénesis de ES.

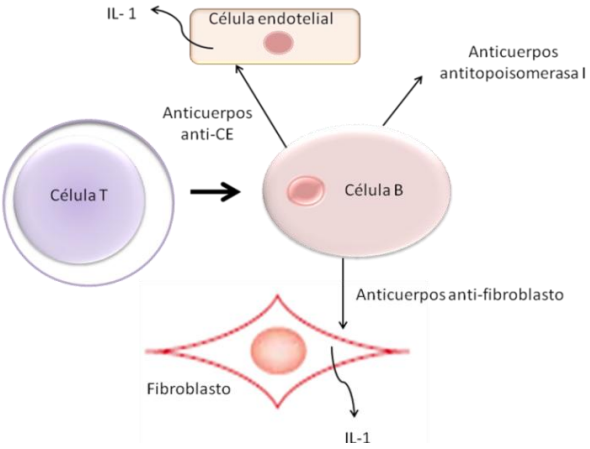
Figura 17. **Imbalance de citoquinas**: Se observa en pacientes con escleroderma



1.5.8.5 Autoanticuerpos

La detección de autoanticuerpos específicos circulantes, es uno de los rasgos más comunes y por lo general precede al inicio de enfermedad. La presencia de anticuerpos anti-topoisomerasa I o anticuerpos anti-ARN polimerasas, se asocian con ES cutánea difusa. Por el contrario, anticuerpos anti-centrómero o anti-Th/To generalmente están presentes en ES cutánea limitada. Sinembargo, se considera que estos autoanticuerpos contribuyen directamente a la fibrosis del tejido [(171).] Las células B son requeridas para la producción de anticuerpos. (Figura 18).

Figura 18. Producción de anticuerpos; las células T deben interactuar con las células B para la producción de auto anticuerpos. Parece que la IL-1 se produce después que los anticuerpos se pegan a la célula.



1.6 GENETICA DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Como se había comentado anteriormente el fondo genético de las EAI se evidencia por la agregación familiar, la cual se puede cuantificar mediante el coeficiente λs, que se define como el cociente de dividir la prevalencia de la enfermedad en hermanos de individuos afectados entre la prevalencia de la población general. El coeficiente λs en el LES es de 20-29 [172] y en AR varía entre 3-15. La comparación entre las altas tasas de concordancia de los familiares con la de la población general, evidencia que la predisposición genética es un factor dominante en el desarrollo de las EAI. Por otro lado, una menor tasa de concordancia en familiares que en gemelos MC, sugiere la presencia de múltiples genes en la predisposición genética para estas enfermedades. Por lo tanto, estudios de genes candidatos no-HLA, son un gran aporte al esclarecimiento de la etiología de dichas enfermedades, ya que su asociación con EAI está comprobada.

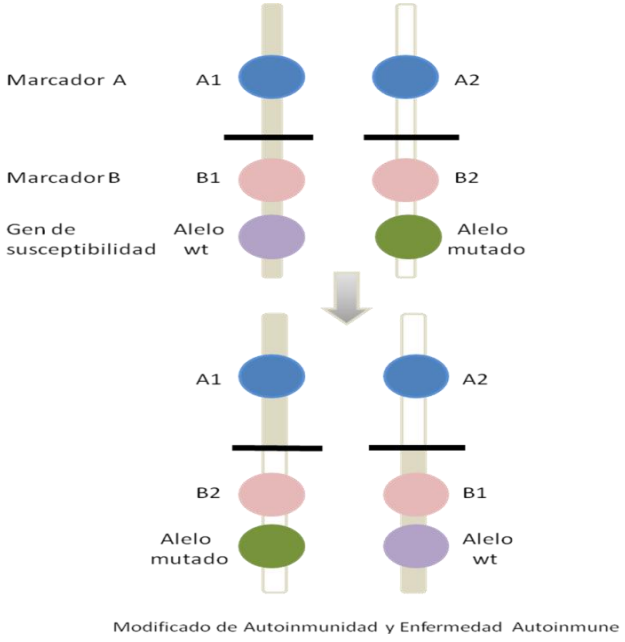
Hay principalmente dos clases de estudios para identificar estos genes no-CMH, involucrados en enfermedades complejas, los estudios de ligamiento y los estudios de asociación de genes candidatos.

1.6.1 Estudios de ligamiento

Los estudios de ligamiento se usan para identificar regiones cromosómicas dentro del genoma que contengan genes de predisposición a la enfermedad. Este análisis de ligamiento genético está basado en la transmisión de dos o más genes unidos sobre un cromosoma a la misma célula hija (cuando locus genéticos son heredados conjuntamente) con un rasgo fenotípico dentro de familias [173]. El modelo para estos estudios son parejas de hermanos enfermos (*affected sibling pairs,* ASP). Se espera que los familiares afectados muestren un exceso de haplotipos idénticos en las regiones donde se ubican los genes causantes de la enfermedad. Por consiguiente, se cree que las regiones cromosómicas que se comparten con alta frecuencia se encuentran genes de

susceptibilidad [173]. También tienen la capacidad de localizar genes de susceptibilidad sin tener un previo conocimiento de la etiología de la enfermedad. (Figura 19).

Figura 19. Principio de ligamiento. Durante meiosis, cuando los cromosomas homólogos se aparean, se rompen en los puntos idénticos a lo largo de su longitud, dando lugar a un intercambio de los segmentos idénticos del cromosoma entre dos cromosomas homólogos. El principio del análisis de ligamiento se basa en el hecho de que sí un marcador (B) está cerca de un gen de susceptibilidad, segregarán juntos durante la recombinación, mientras que sí un marcador (A) que está lejos del gen no se cosegregará con él. En el ejemplo mostrado, el marcador B se liga al gen de la enfermedad, y dentro de una familia determinada un alelo del marcador B (B2 en este ejemplo) será visto con mayor frecuencia que lo esperado por el azar en los individuos afectados (es decir, los que heredan el alelo mutado del gen). Cuanto más cercano el marcador se encuentre del gen relacionado con la enfermedad, más fuerte será el ligamiento con la enfermedad (wt: alelo salvaje o silvestre).



El primer paso para detectar ligamiento entre una región cromosómica y un fenotipo, es generar un mapa cromosómico utilizando marcadores genéticos en las familias estudiadas. Para que el análisis sea robusto y con alto poder estadístico hay que usar una serie de marcadores altamente informativos separados uniformemente a lo largo de los

cromosomas, usualmente cada 20 centimorgans (cM), en todos los sujetos de las familias a estudiar. Se considera que un marcador es altamente informativo cuando es muy polimórfico y es poco probable encontrar individuos con los dos alelos iguales (homocigotos). Si los dos alelos son distintos (heterocigotos) en la mayoría de sujetos de una familia, se puede seguir con facilidad la herencia de cada uno de ellos a lo largo de generaciones sucesivas. Por lo tanto, podemos determinar cuántos alelos idénticos comparten 2 individuos, las posibilidades pueden ser 0,1 o 2. Los marcadores genéticos más utilizados en la búsqueda de ligamiento son polimorfismos de nucleótido simple (SNP) y microsatélites. El concepto estadístico de *ligamiento* entre un fenotipo y un marcador genético se puede definir de la siguiente manera: si el fenotipo ocurre en individuos que comparten más alelos, es decir, que genéticamente son similares para un marcador determinado (SNP), se dice que el locus que contiene este marcador está ligado al fenotipo. Esto implica que en la proximidad del marcador existe un gen que influye en el fenotipo. El ligamiento se produce entre el marcador y el gen, aunque se acepta que el fenotipo sea el que está "ligado" al marcador [(174).] Una limitación de estos estudios en enfermedades complejas, es su limitado poder para detectar genes con un efecto modesto o pequeño, de manera que se necesitan un gran número de familias.

1.6.2 Estudios de asociación

Estos estudios buscan detectar una asociación entre uno o más polimorfismos genéticos y un rasgo característico. Los estudios de asociación difieren de los de ligamento en que el mismo alelo (o alelos) está asociado con ese rasgo de manera similar en toda la población, mientras que los estudios de ligamiento permiten que diferentes alelos estén asociados con ese rasgo en familias diferentes. Estos estudios de asociación pueden hacerse entre pacientes no relacionados (casos) y controles sanos para identificar marcadores que difieran significativamente entre los dos grupos o bien en grupos familiares formados normalmente por un individuo enfermo y sus progenitores [(175).] Este tipo de estudios normalmente tienen mayor poder para detectar asociaciones pequeñas o débiles que los

de ligamento. Numerosos estudios genéticos de asociación de genes candidatos se han llevado a cabo hasta la fecha en enfermedades autoinmunes, los cuales han producido resultados alentadores. La mayoría de las asociaciones publicadas no han sido replicadas en poblaciones diferentes a las asociadas inicialmente. Estas discrepancias podrían deberse, al menos en parte, a la heterogeneidad genética o a insuficiente poder estadístico de los estudios caso-control realizados hasta la fecha, para detectar odds ratios (OR) modestos.

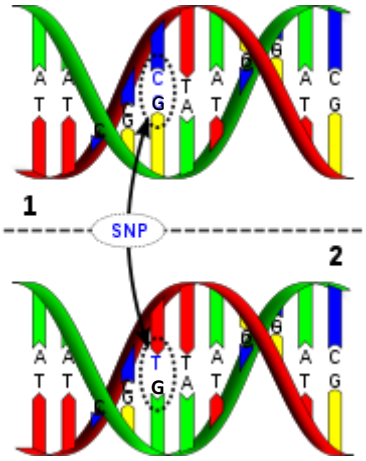
1.6.3 Estudios de asociación del genoma completo

En los últimos años gracias a los nuevos avances ha sido posible el desarrollo de los estudios de asociación del genoma completo [(176),] (*Genome-wide association studies,* GWAS). Estos avances han consistido principalmente en un mayor conocimiento de los patrones de variación génica humana con el proyecto internacional HapMap (www.hapmap.org) [(177),] la disponibilidad de nuevas técnicas de genotipado, con densa cobertura del genoma y costos más baratos, y por último la recolección de cohortes de pacientes y controles más amplias y mejor caracterizadas. Hasta la fecha se han realizado numerosos GWAS en EAI

1.6.4 Polimorfismos de nucleótido solo (SNPs)

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

Figura 20. SNP. Transición de un solo nucleótido



1.6.5 Selección de genes candidatos

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

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

La función: la cual consiste en seleccionar genes que puedan tener una implicación en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad, así como genes implicados en enfermedades inflamatorias o autoinmunes relacionadas. También se deben tener en cuenta genes que involucrados en las vías fisiopatologías de la enfermedad (inflamación, vías activación de células T y B entre otras).

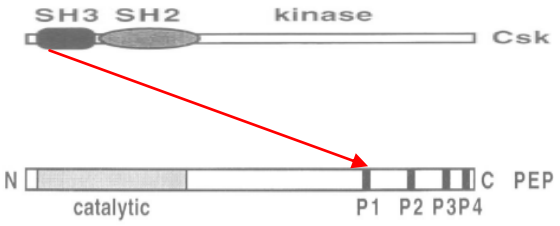
1.7 GENES IMPLICADOS EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE CELULAS T

El desarrollo y diferenciación de las células T así como sus funciones efectoras, están finamente controladas por la activación de varias rutas de señalización intracelular en respuesta a la activación del receptor de células T (TCR) y de receptores de moléculas coestimulatorias [178, 179]. En las EAI se han observado anormalidades como: efectos en: proliferación de células T, producción de citoquinas, apoptosis, cambios en el citoesqueleto y muchos otros procesos que son regulados por la vía de señalización del TCR en células tímicas y periféricas [180]. Por lo tanto genes involucrados en esta vía son candidatos para investigación en autoinmunidad. En este estudio se seleccionaron 3 genes.

1.7.1 *PTPN22* (Proteína Tirosina Fosfatasa No Receptor proteína 22)

PTPN22, está localizado en el cromosoma 1p13.3-p13.1 y codifica para una proteína tirosina fosfatasa linfoide intracelular (Lyp), con un peso molecular de 110 kd. Su estructura contiene un dominio catalítico N-terminal y un dominio no catalítico C-terminal con 4 dominios ricos en prolina [181]. (Figura 21).

Figura 21. Estructura de PTPN22, Lyp físicamente se une por un motivo rico en prolina [48], al dominio SH3 de la Csk quinasa.



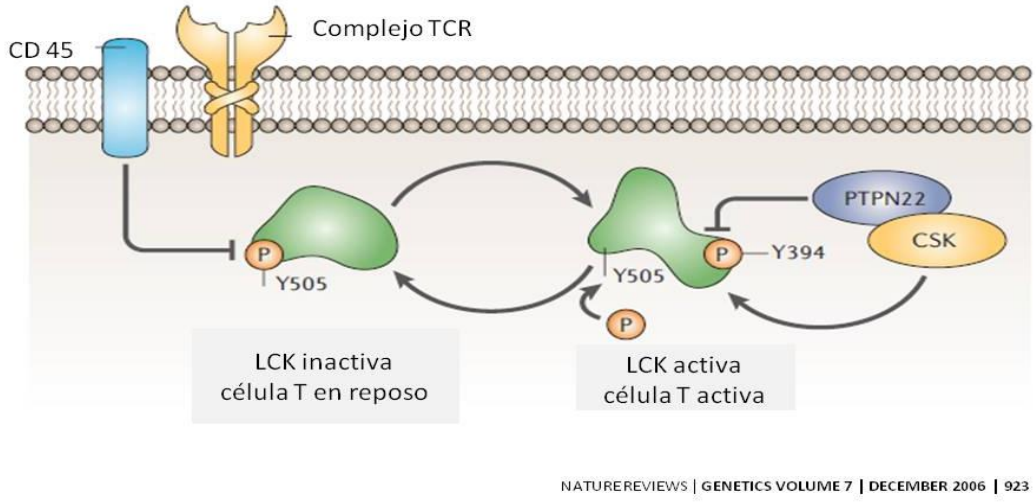
Bajo condiciones normales LYP trabaja como un regulador negativo, inhibiendo la señalización del TCR junto a la quinasa CSK. Esta actividad combinada inhibe la activación de la tirosina quinasa LCK que está involucrada en los eventos tempranos de la señalización del TCR.

Hallazgos recientes han demostrado que el polimorfismo 1858C/T de *PTPN22* (Centro Nacional para Información de Biotecnología dbSNP No rs2476601) cambia una arginina por triptófano en el codón 620 (W620R), localizado en el motivo P1, el cual interrumpe la interacción entre Lyp y Csk, evitando la unión del complejo, por lo tanto la no inactivación de Lck [(181).]

La capacidad de Csk y Lyp para inhibir la señalización de receptor de células T requiere su asociación física [(182).] Estas moléculas actúan conjuntamente para inactivar Lck, una quinasa de la familia Src que está involucrada en eventos tempranos de señalización de las células T.

El receptor de célula T (TCR) conduce a la defosforilación de la tirosina quinasa LCK en Y505 por la fosfatasa de membrana CD45. (Figura 22). La subsecuente autofosforilación de LCK en Y394 es un acontecimiento temprano en la activación de la Célula T conduciendo la fosforilación de sustratos corriente abajo por LCK. La tirosina fosfatasa PTPN22 y la quinasa intracelular CSK regulan a LCK por el retiro del fosfato de activación en Y394 por PTPN22, así como la refosforilación de Y505 por CSK. El polimorfismo de PTPN22 (R620W) ha mostrado interrumpir la unión de PTPN22 a CSK, y aumentar la actividad intrínseca de fosfatasa propia de PTPN22 [(183).]

Figura 22. PTPN22: Regulación de la actividad de la tirosina quinasa LCK por PTPN22 Y CSK



Todavía no se ha establecido directamente el papel de PTPN22 en las células T_{Reg}, pero el aumento de función puede reducir el umbral de señalización de estas células reduciendo así su función [(184).] Claramente, este polimorfismo no elimina completamente las funciones de PTPN22, porque aún los portadores homocigotos del alelo R620W de TPN22 no exponen un fenotipo como él del ratón *Knockout.*

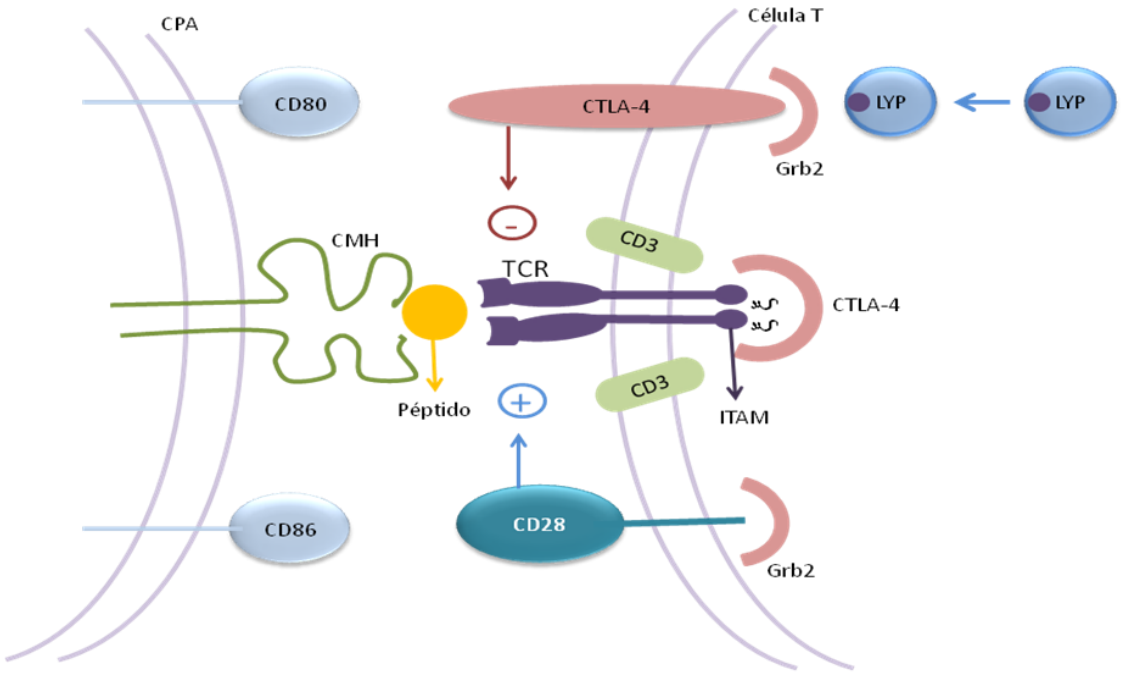
Si bien es cierto la principal actividad de PTPN22 ha sido demostrada en células T, también hay evidencias que se expresa en células B, natural killers, monocitos y neutrófilos, así como puede unirse a otras proteínas, como c-CBL y Grb2 (molécula adaptadora) involucradas en señalización de linfocitos B [(185).]

1.7.2 Antígeno 4 asociado al Linfocito T Citotóxico (*CTLA-4*)

Después de la activación de la célula T que ocurre por la unión del TCR al complejo péptido-CMH, viene una segunda señal coestimuladora que es modulada por moléculas en la superficie de la célula a través del TCR, tales como CD28, el inducible *T-cell co-*

stimulator (ICOS) y CTLA 4. Estas moléculas pertenecen a la superfamilia de las Inmunoglobulinas y se expresan en la superficie de las células $T_{Reg,}$ y se unen a ligandos homólogos en las células presentadoras de antígenos. CTLA 4 Está localizado en el cromosoma 2q33. La expresión de CTLA-4 es dependiente de la unión CD28 a CD80 o CD86 y ocurre un tiempo después [186, 187], pero a diferencia de CD28, molécula coestimuladora CTLA-4 es una molécula que inhibe la activación de células T. CTLA-4 regula la tolerancia periférica por diferentes mecanismos: Primero, inhibe la activación de células T patogénicas por modulación de la señalización del TCR, específicamente en la fosforilación de la cadenaξ, compite con las moléculas coestimuladoras CD28, por los ligandos CD80 y CD86 para inhibir el efecto coestimulador. (Figura 23). Además puede interactuar directamente con el complejo TCR-CD3 en sinapsis inmunológica para interrumpir la activación de Célula T enlazando y bloqueando el immunoreceptor de tirosina basado en un motivo de activación (ITAM) [188, 189]. Es importante recalcar que CTLA-4 solamente actúa en cis junto con el TCR, diferente del CD28 que actúa tanto en cis como en trans cuando se expresa B7 (CD80 o CD86) en una CPA [190]. Segundo, células T_{Reg} expresan constitutivamente CTLA-4 que se une a células efectoras para alterar la transducción de señales y la posterior liberación de citoquinas. La unión de CTLA-4 con su ligando produce la liberación del factor de crecimiento transformante β (TGF-β), lo cual ha sido propuesto como uno de los mecanismos de acción de las $T_{Reg.}$ Tercero, las cascadas de señalización de CTLA-4 afectan el patrón de expresión de citoquinas por ejemplo, el bloqueo entre CTLA 4 y CD80 o CD86 hace que se dé un patrón de expresión de citoquinas Th2 [191, 192].

Figura 23. Vía de señalización de CTLA4. Abreviaturas: APC: célula que presenta antígenos; ITAM: inmunoreceptor, motivo de activación basado en tirosina; LYP: lymphoid tyrosine phosphatase; CMH: complejo Mayor de histocompatibilidad; SH2/3: Src dominio de homología 2/3; TCR: receptor de Célula T.



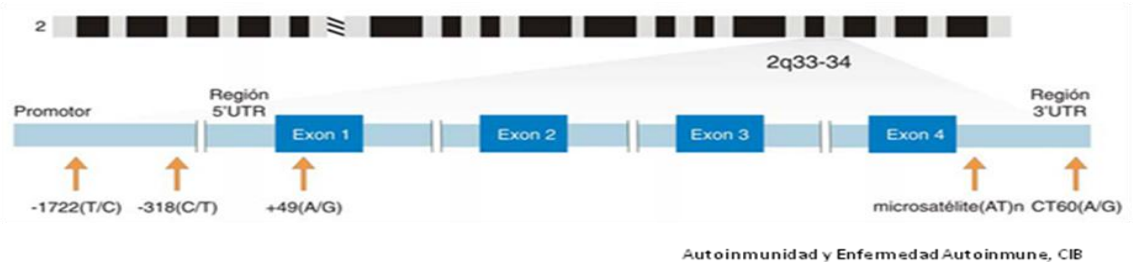
Expert Reviews in Molecular Medicine © 2005 Cambridge University Press.

También se ha propuesto otro mecanismo: CTLA-4 podría usar el complejo LYP/GRB2 para inhibir la activación de las Células T. El complejo LYP/Grb2 podría enlazar los dominios SH2 o SH3 DE CTLA-4 para así inhibir la activación de las Células T. Bien es establecido que Grb2 desempeña un papel corriente abajo de esta vía de señalización mediada por CD28. Este gen regula negativamente la vía de señalización del receptor de células T [(193).]

Polimorfismos de CTla4: Cinco polimorfismos han sido reportados en el gen de CTLA-4. El primero es un microsatélite dinucleotídico en el exón 4. El segundo polimorfismo es un cambio de una A por G en la posición 49 (49/AG) del exón 1. Este polimorfismo genera un cambio de alanina por treonina en el codón 17 de la secuencia líder [(191, 192).] El tercer y cuarto polimorfismos están en la región promotora, es un cambio de C por T en la posición

-318 (-318 C/T) y en la posición -1722 un cambio de una T por C (-1722T/C) [194]. Recientemente ha sido descrito otro polimorfismo llamado CT60 A/G ubicado en la región 3'UTR [195]. (Figura 24).

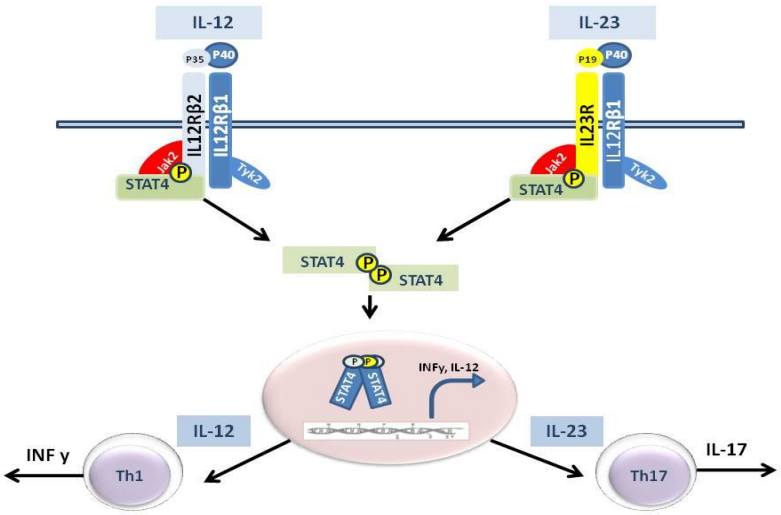
Figura 24. Ubicación genómica del gen CTLA-4: brazo largo del cromosoma 2 y polimorfismos de CTLA4



1.7.3 Transductor de señal y activador de transcripción (STAT 4)

*STAT4, g*en localizado en el cromosoma 2q12-q34, codifica un factor de transcripción que transmite señales inducidas por varias citoquinas claves en la vía quinasas Janus-STAT incluyendo IL 12 y el interferón tipo I así como IL 23 [196]. (Figura 25). Es un factor citosólico latente cuya activación ocurre tras la unión de las citoquinas a su receptor. Las quinasas Jak se activan y fosforilan su receptor en los residuos de tirosina lo que recluta a STATs, lo dimerizan y fosforilan siendo translocado al núcleo. Allí, estimula la transcripción de genes específicos incluyendo interferón λ, un indicador clave de diferenciación de células T en células Th 1. La señalización dependiente de *STAT4* por receptores de IL-12 juega un papel crítico en el desarrollo de una respuesta de células tipoTh1 [197, 198]. *STAT4* también ha sido implicado en la diferenciación óptima de un linaje recientemente definido de células T CD4+ designado como células Th17. Esto depende en parte de la actividad de la IL-23 como citoquina relacionada con la IL-12. Las células TH17 proinflamatorias y la Th1 juegan un papel importante en desórdenes inflamatorios crónicos.

Figura 25. Señalización de IL-12 e IL-23: STAT4 transductor de señal



La expresión de STAT 4 se encuentra aumentada en el sinovio de pacientes con AR. Ratones deficientes de STAT4 son generalmente resistentes a los modelos de enfermedad autoinmune, incluyendo la artritis [199]. De hecho, los experimentos que tienen como blanco a las células Th1 en modelos de enfermedad autoinmune generalmente tienen sin darse cuenta como blanco el linaje Th17, porque las citoquinas claves de los dos linajes, interleuquina-12 e interleuquina-23, y sus receptores comparte subunidades comunes.

El uso de oligodeoxinucleotidos inhibidores u oligonucleótidos antisentido específicos para STAT4 puede mejorar la enfermedad en modelos de artritis. Se sugiere la utilidad de STAT4 como un objetivo terapéutico [200, 201].

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar la asociación entre los polimorfismos de los genes PTPN22, CTLA4, STAT4 con AR, LES y ES, y sus manifestaciones clínicas, en dos poblaciones Colombianas.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar los polimorfismos: C1858T del gen PTPN22, rs7574865 del gen STAT4, rs3087243 del gen CTLA4 en pacientes con AR y hallar las frecuencias alélicas y genotípicas.
- Relacionar la presencia de los polimorfismos con la expresión de las manifestaciones típicas de AR.
- Determinar los polimorfismos: C1858T del gen PTPN22, rs7574865 del gen STAT4, rs3087243 del gen CTLA4 en pacientes con LES y hallar las frecuencias alélicas y genotípicas.
- Relacionar la presencia de los polimorfismos con la expresión de las manifestaciones típicas de LES.
- Determinar el polimorfismo C1858T del gen PTPN22 con Escleroderma y hallar las frecuencias alélicas y genotípicas.

3 METODOLOGÍA

3.1 Diseño del estudio

Se planteo un estudio de Casos y controles donde se establecieron dos tipos de asociaciones: 1) La asociación de los marcadores genéticos para desarrollar AR, LES y ES.
2) La asociación de los polimorfismos con la severidad de las enfermedades mediante ciertas manifestaciones clínicas de AR y LES. Los desenlaces de cada enfermedad que tuvimos en cuenta son para **AR:** anticuerpos anti-CCP, RF, ANAS, manifestaciones extra-articulares (nódulos reumáticos), articulaciones involucradas y erosiones articulares (demostrado radiográficamente). **LUPUS:** ENAS+, nefritis lúpica, neuropsiquiatrías (Psicosis, convulsiones), y cutáneas.

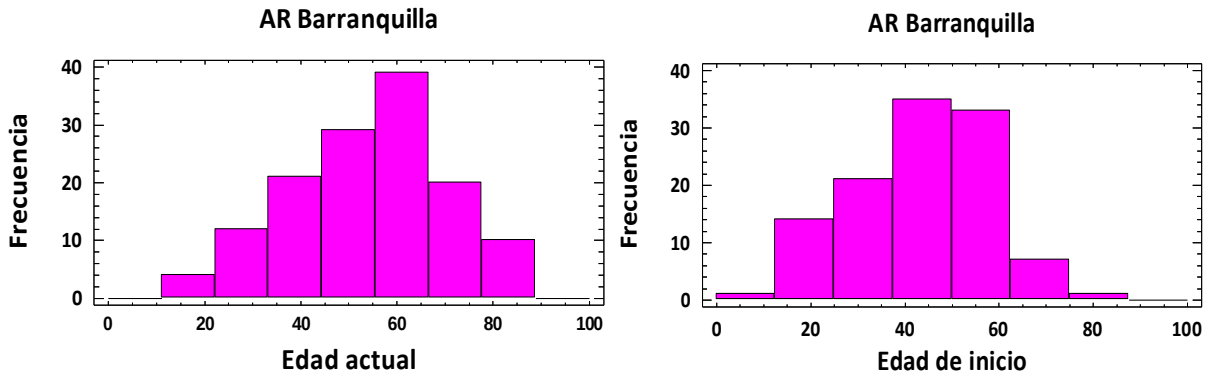
3.2 Definición de sujetos de estudio

Pacientes: Se escogieron pacientes de dos regiones del país: 1) De la Costa Atlántica, que asistían a consulta al Instituto de Reumatología en la ciudad de Barranquilla (se definieron como, población de Barranquilla) y 2) De la región central del país, que asistían a consulta al Instituto de Reumatología de Bogotá y a la Clínica Carlos Lleras Restrepo del Instituto de Seguro Social (definidos como población de Bogotá). La distribución de los pacientes fue: AR Barranquilla= 261, AR Bogotá= 133 para un total de 394 pacientes. LES Barranquilla= 47, LES Bogotá= 47, para un total 94 pacientes y ES Bogotá= 101. Los pacientes fueron diagnosticados bajo los criterios de inclusión del Colegio Americano de Reumatología para cada una de las enfermedades. De los 394 pacientes con AR, 344 eran mujeres y 51 hombres. Para LES 92 mujeres y 2 hombres.

Descripción pacientes AR Barranquilla: Edad actual, promedio= 54,2 años, ds= 15,7
Mínima= 20,0 Máxima= 86,0
Edad de inicio de la enfermedad, promedio= 43,4 años, ds= 14,7

Mínima= 12,0 Máxima= 84,0

Figura 26. AR Barranquilla: Edad actual, Edad de Inicio



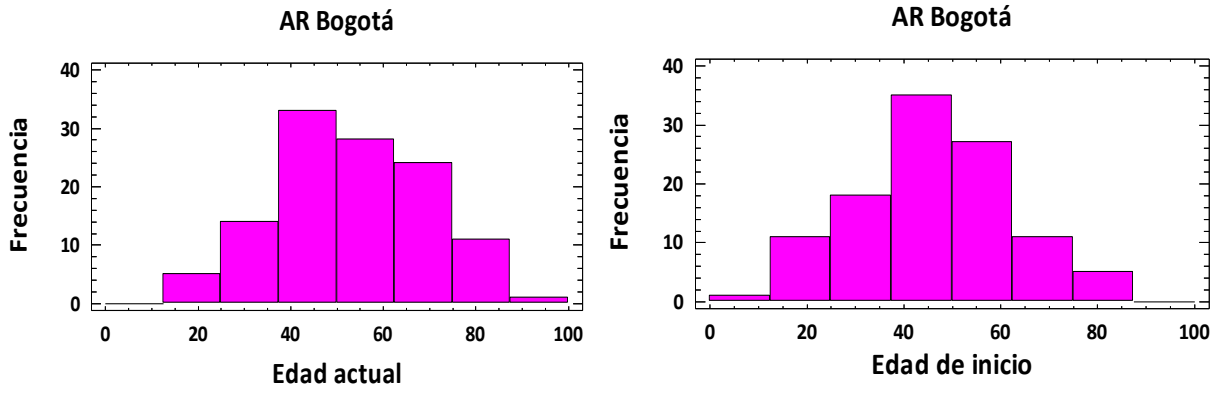
Descripción pacientes AR Bogotá: Edad actual, promedio= 53,1 años, ds= 16,2

Mínima= 20,0 Máxima= 89,0

Edad de inicio de la enfermedad promedio= 46,5 años, ds= 16,4

Mínima= 10,0 Máxima 86,0

Figura 27. AR Bogotá: Edad actual, Edad de inicio



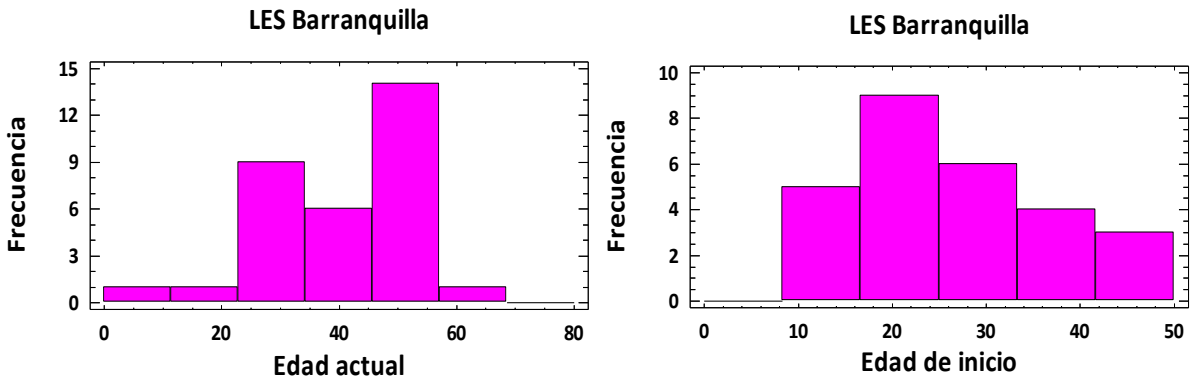
Descripción pacientes LES Barranquilla: Edad actual, promedio= 42,3 años, ds= 13,7

Mínima= 11,0 Máxima= 66,0

Edad de inicio de la enfermedad promedio=26,3 años, ds= 10,9

Mínima= 10 Máxima= 46,0

Figura 28. LES Barranquilla: Edad actual, Edad de inicio



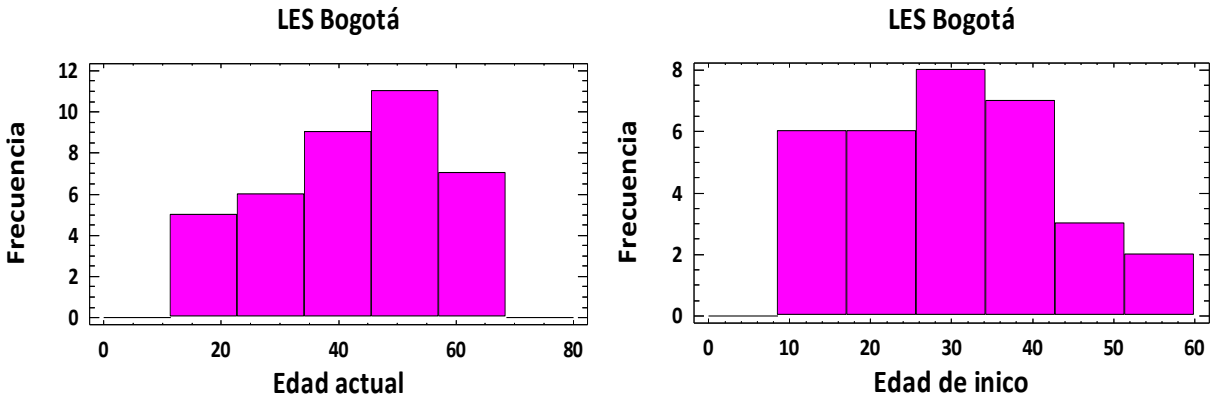
Descripción pacientes LES Bogotá: Edad actual, promedio= 43,3 años, ds= 14,4

Mínima= 18,0 Máxima= 66,0

Edad de inicio de la enfermedad promedio= 30,6 años, ds= 11,6

Mínima= 13,0 Máxima= 54,0

Figura 29. LES Bogotá: Edad actual, Edad de inicio



Controles: Para el estudio se tomaron dos tipos de controles: 1) 290 individuos sanos de la ciudad de Barranquilla y 144 de Bogotá. 2) los controles para la asociación con las manifestaciones fueron pacientes que cursaban con la enfermedad pero no presentaban la manifestación a evaluar. Los controles de Bogotá fueron seleccionados de manera

aleatoria de trabajadores y estudiantes de postgrado de la Universidad Nacional. Los controles de Barranquilla pertenecían a una población de individuos sanos que hacen parte de proyectos de investigación genética del laboratorio de Inmunogenética de la Universidad del Norte de Barranquilla. Los controles son sujetos mestizos que representan a la población de la costa Caribe. Para el análisis se tuvo en cuenta la edad, el sexo y la etnicidad de los controles con respecto a los casos. Se obtuvo consentimiento escrito de todos los participantes (pacientes y controles). El comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia aprobó el estudio.

El estudio se diseñó a mediados del año 2006 y se empezaron a tomar las muestras a finales de este mismo año hasta Octubre del 2008. En total se analizaron 1,024 individuos.

3.3 Procedimientos

3.3.1 Extracción de muestras de sangre y aislamiento de linfocitos a partir de sangre periférica del paciente.

Se tomaron aproximadamente 5 ml de sangre periférica mediante punción venosa en tubos con anticoagulante EDTA (venoject Beckton Dickenson) marcados con el número correspondiente a cada paciente y con el nombre del paciente, la muestra se refrigeró hasta realizar el aislamiento de los linfocitos mediante la técnica de Ficoll-Hypaque (Sigma). Las células obtenidas se almacenaron a -80°c.

3.3.2 Extracción de ADN a partir de linfocitos de pacientes.

Para este procedimiento se utilizó el kit comercial “ChargeSwitch® gDNA Blood” de Invitrogen. La técnica se basa en la utilización de perlas magnéticas que se proveen de una carga de superficie adecuada dependiente del pH del buffer circundante para facilitar

la purificación del DNA. A pH bajo las perlas adquieren carga positiva enlazando el DNA que está cargado negativamente, mientras que las proteínas y otros contaminantes son removidos mediante lavados con buffer acuoso, con ayuda de un imán externo. Posteriormente el DNA es eluído mediante la neutralización de la carga en la superficie de las perlas por adición de un buffer pH 8.5. Las concentraciones obtenidas de DNA se miden en un espectrofotómetro UV visible (nanodrop) a una longitud de onda de 260 nm.

3.3.3 Genotipificación.

Caracterización de los genotipos de cada paciente por análisis molecular con sondas de hibridación-PCR en tiempo real.

En el Instituto de Genética se llevó a cabo la genotipificación del polimorfismo C1858Tde PTPN22 para ES, AR Bogotá, AR Barranquilla (47muestras), LES Bogotá y LES Barranquilla. Se identificaron las formas homocigoto silvestre (CC), heterocigoto mutado (CT), y homocigoto mutado (TT), utilizando PCR en tiempo real con sondas de hibridación en el equipo LightCycler de Roche. Técnica ideal para detectar SNPs, (laboratorio Roche división Roche Molecular Biochemicals).

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

En la fase de anillamiento en el ciclo de PCR los oligonucleótidos (sonda) hibridizan en la región adyacente del ADN blanco. Los fluoróforos que están perfectamente acoplados a los oligonucleótidos hibridan muy cercanos uno del otro. La sonda donadora F1 marcada con un fluoróforo en su extremo 3’ es excitada por una luz externa, a su vez la sonda F1 pasa esa excitación como energía a la sonda F2 o aceptora marcada en el extremo 5’.

Finalmente, se produce una emisión de luz que se mide a 640nm y es captada por el equipo para crear la curva de amplificación. Esta sonda debe ser bloqueada en su extremo 3'con un grupo fosfato para evitar su extensión durante la reacción. Las diferencias de las temperaturas melting permiten evaluar los picos de los genotipos homocigoto silvestre, heterocigoto y homocigoto mutado.

PCR:

Protocolo	**volumen**	**final 20 µl**
Agua HPLC	12.8 µl	
$MgCL_2$	0.8 µl	
Primer Mix	1.2 µl	Conc. final 2 µl
Sonda Mix	1.2 µl	Conc. final 2 µl
Máster Mix	2.0 µl	
ADN	2.0 µl	

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

3.3.3.1 Controles Genotipificación sondas de hibridación

Para la identificación de los genotipos homocigoto wild type, Heterocigoto y homocigoto mutado de *PTPN22* se usaron como controles muestras previamente genotipificadas enviadas de la Corporación de investigaciones biológicas (CIB), Unidad de Biología Celular e Inmunogenética de Medellín.

La genotipificación del polimorfismo rs3087243 de *CTLA4* para muestras de AR (353) LES (94) y controles (214), se llevó a cabo en el hospital Virgen de las Nieves en la ciudad de Granada, España. La Genotipificación se llevo a cabo con la técnica PCR en tiempo real con sondas de hibridación en el equipo LightCycler (Laboratorio Roche división Roche Molecular Biochemicals). Los controles (muestras previamente genotipificadas) fueron proporcionados por el laboratorio de Inmunogenética del hospital Virgen de las Nieves.

La genotipificación del polimorfismo rs7574865 del gen *STAT4* para todas las muestras: AR, LES y controles, lo mismo que para el polimorfismo C1858T del gen *PTPN22* para 243 muestras de Barranquilla y los controles, se efectuaron en el Instituto de Parasitología y Biomedicina "Lopez-Neyra" Consejo Superior de Investigaciones Científicas en la ciudad de Granada, España. El análisis se realizó mediante la técnica PCR-tiempo real con sondas Taqman 5´ discriminación alélica (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Este método se basa en la actividad exonucleasa de la polimerasa. Las sondas TaqMan son complementarias a los dos alelos de un SNP y cada una tiene un *quencher* (bloqueador) en su extremo 3' y una molécula fluorescente (FAM y VIC) en 5'. Durante la fase de anillamiento extensión, la sonda se hibrida a los amplicones y la DNA polimerasa hidroliza (rompe) el *quencher*, lo que resulta en un incremento de la fluorescencia. La fluorescencia se detecta utilizando el *RealTime ABI PRISM® 7900 Sequence Detector.* Esta técnica resulta óptima para estudios que requieran el análisis de muchas muestras para el genotipado.

PCR:

Protocolo volumen final	**5 µl**
Mezcla inicial	
Máster Mix	220 µl
Sonda 40X	5 µl
H_2O HPLC	195 µl
Mezcla anterior	4 µl
ADN	1 µl

Condiciones	**PCR**	
Temperatura	Tiempo	
95°	10´	40 C
92°	15´	
60°	1´	
Discriminación alélica		
65°	1´	

3.3.3.2 Controles Genotipificación Sondas Taqman

Para la identificación de los genotipos homocigoto wild type, heterocigoto y homocigoto mutado de los polimorfismos *PTPN22* y STAT4 se usaron controles del laboratorio de Inmunogenética del Instituto de Parasitología y Biomedicina "Lopez-Neyra" CSIC. Las genotipificaciones se confirmaron con secuenciación cogiendo el 5% de las muestras al azar coincidiendo los resultados en un 100%

Secuencias de primers y sondas:

PTPN22

Primer F 5´ ACTATgTTgCgCAggCTAgTC 3´

Primer R 5´ TgCTCCAAggATAgATgATgAAATCC 3´

Sonda A 5´ CTgTACTCACCAgCTTCCTCAACCAC—FL

Sonda S 5´ LC640-AAATgATTCAggTgTCCATACAgg—PH

CTLA 4

Primer F 5' TCATTCAgTATCTggTggAgTCTC 3´

Primer R 5' CCAACATTggggTTgCCAT 3´

Sonda A 5' ggATATAACATgggTTAACACAg--FL

Sonda S 5' ggATATAACATgggTTAACACAg—FL

STAT 4

Sonda A **5' TATGAAAAGTTGGTGACCAAAATGT [G]AATAGTGGTTATCTTATTTCAGTGG-VIC**

Sonda S **5´ TATGAAAAGTTGGTGACCAAAATGT [T]AATAGTGGTTATCTTATTTCAGTGG-FAM**

4 ANALISIS ESTADISTICO

Para evaluar la asociación de los polimorfismos con AR, LES y ES, se construyeron tablas de contingencia correspondientes y se contrastó la hipótesis de asociación mediante un test de χ^2.

Se calcularon *odds ratios* (OR) de cada genotipo para cuantificar la magnitud de la asociación, con intervalos de confianza (IC) del 95%.

Los análisis comparativos de los resultados en cuanto a la presencia de los polimorfismos y la severidad de AR y LES se analizaron mediante el uso del test exacto de Fisher. Se tomó la p corregida de Yates.

El valor de p menor de 0.05 fue considerado estadísticamente significante.

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa estadístico STATA 10.

5 RESULTADOS

5.1 Población estudiada

Todos los casos fueron seleccionados para la realización de este trabajo, bajo los criterios del Colegio Americano de Reumatología, mientras que los controles fueron escogidos de manera aleatoria, en La Universidad Nacional de Colombia en Bogotá y en la Universidad del Norte en Barranquilla. Se usó una tasa de casos: controles para LES (1:2), para AR y Es (1:1).

5.2 Genotipificación

A las muestras de ADN se les midió la concentración a 260 nm y se ajustó a 25 ng. y se evaluó el coeficiente de pureza para cada una de las muestras. La mayoría de las muestras tenían un coeficiente entre 1.7-1.9, muestras menores de 1.5 y mayores de 2.0 se purificaron. El 6% de las muestras no amplificaron y por ende no fueron genotipificadas, en la tabla 7 se muestran el numero de muestras que fueron genotipificadas para cada gen, población y enfermedad.

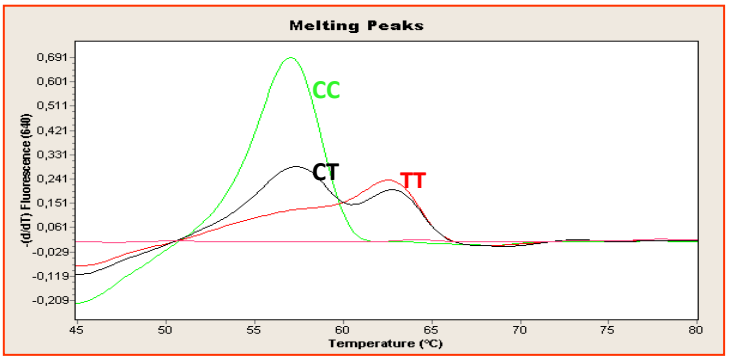
Tabla 7. Genotipificaciones realizadas para cada gen, población y enfermedad.

	AR Barranquilla	AR Bogotá	LES Barranquilla	LES Bogotá	ES	C. Barranquilla	C. Bogotá
PTPN22	261	133	47	47	101	290	144
STAT 4	271	124	42	51	0	67	144
CTLA 4	210	114	47	47	0	69	142

5.3 Controles

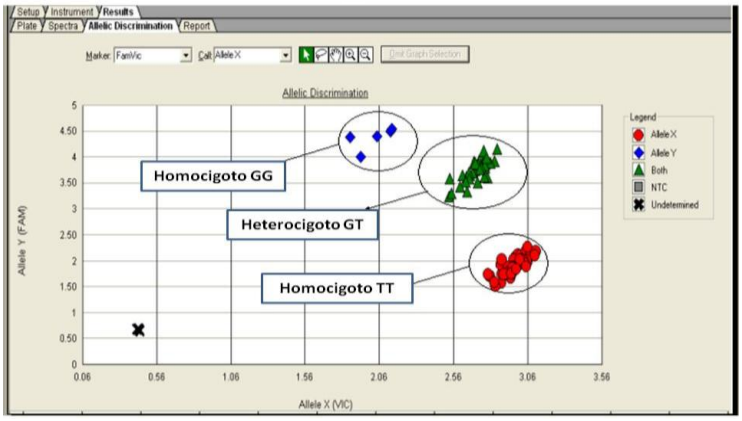
Se identificaron los tres genotipos en los controles para sondas de hibridación realizadas en el Ligthcycler.

Figura 30. Controles Genotipificación Sondas de hibridación *PTPN22*



También se identificaron los tres genotipos de los controles realizados con sondas de hidrólisis en el Applied Byosistem

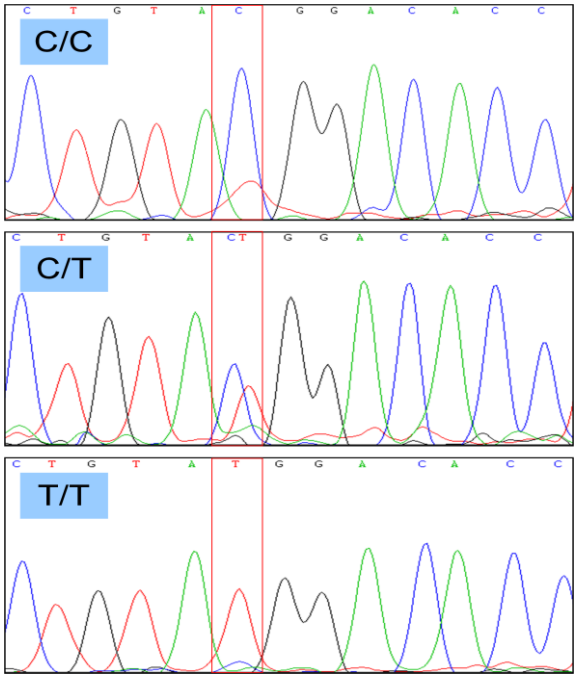
Figura 31. Controles Genotipificación sondas Taqman (hidrolisis)



5.4 Secuenciación

Las genotipificaciones se confirmaron secuenciando el 5% de las muestras escogidas al azar. Las muestras secuenciadas coincidieron en un 100% con las Genotipificaciones.

Figura 32. Secuenciación (Resultados)



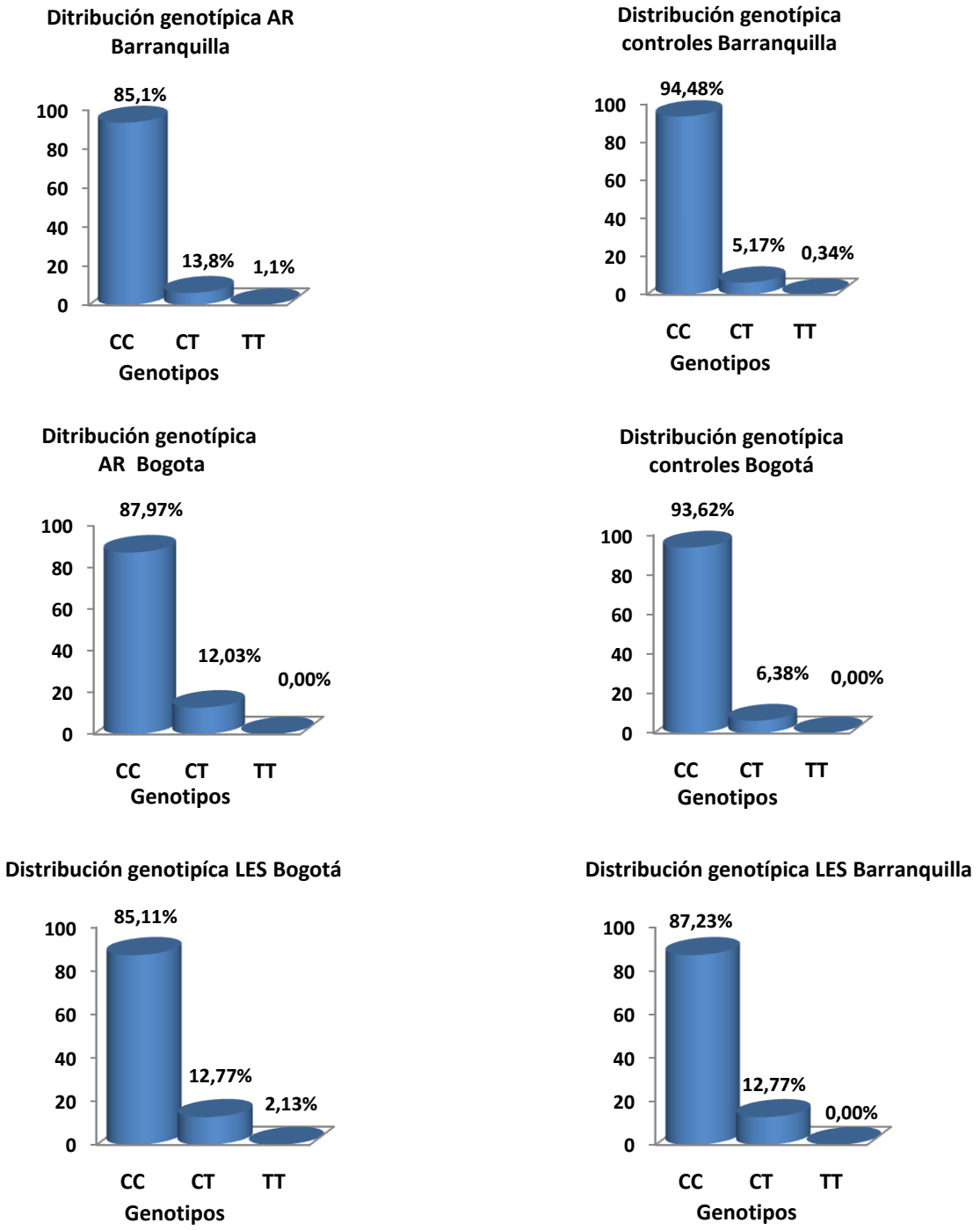
5.5 GENES ESTUDIADOS

5.5.1 PTPN22

Se analizaron las poblaciones de Barranquilla y Bogotá para todos los polimorfismos y las enfermedades por separado y conjuntamente.

Pacientes y controles se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los genes.

Figura 33. Distribución Genotipica pacientes AR, LES y controles PTPN22



En la cohorte de Barranquilla al analizar la variante genética del gen *PTPN22* se observó que existe un aumento de la frecuencia del alelo (620W) en los casos (8%) comparándola con los controles sanos (3%) (p=0,0002). En los casos 13,8% portan el genotipo heterocigoto mientras que en los controles 5,2% (p=0,0005). (Tabla 8).

En la cohorte de Bogotá los casos muestran un aumento en la frecuencia del genotipo CT (12%) al compararla con la frecuencia hallada en los controles (6,3%). No se observó asociación. (Tabla 8).

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C1858T de PTPN22 en controles y pacientes con AR

PTPN22 C1858T	Pacientes AR Barranquilla N=261 (%)	Controles N=290 (%)	P	OR (IC 95%)	Pacientes AR Bogotá N= 133 (%)	Controles N= 144 (%)	P	OR (IC 95%)
CC	222 (85,1)	274 (94,5)	0,0002	0,34 (0,18-0,62)	117 (88,0)	135 (93,7)	0,0935	0,51 (0,22-1,17)
CT	36 (13,8)	15 (5,2)	0,0005	2,82 (1,51-5,24)	16 (12,0)	9 (6,3)	0,0935	1,95 (0,84-4,51)
TT	3 (1,1)	1 (0,3)	0,2666	2,23 (0,32-15,27)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,0000	1,08 (0,02-54,92)
C	480 (92,0)	563 (97,0)	0,0002	0,35 (0,20-0,63)	250 (94,0)	279 (96,9)	0,1016	0,53 (0,23-1,19)
T	42 (8,0)	17 (3,0)	0,0002	2,80 (1,58-4,95)	16 (6,0)	9 (3,1)	0,1016	1,90 (0,83-4,28)

*Análisis independiente Barranquilla y Bogotá

También se analizaron las dos cohortes en conjunto. Se analizo el SNP y las dos poblaciones. El valor de p aumentó significativamente, mostrando una asociación de la enfermedad con el alelo de riesgo.

La frecuencia del genotipo CT en los casos AR provenientes de Barranquilla y Bogotá fue del 13,2%, los controles para este mismo genotipo presentaron un frecuencia de 5,5% encontrándose diferencias significativas entre casos y controles p= 0,00013. La frecuencia del alelo menor fue superior en los casos (7,4%) al compararlos con los controles (3,0%) presentando diferencias significativas (p=0,00005). Al unir las dos cohortes vemos que el valor de p pasa a ser altamente significativo, lo que podría indicar que la presencia del alelo menor podría ser un marcador de susceptibilidad para AR. (Tabla 9).

Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP C1858T en controles y pacientes con AR

PTPN22 C1858T	Pacientes AR Barranquilla y Bogotá N=394 (%)	Controles N=434 (%)	P	OR (IC 95%)
CC	339 (86,0)	409 (94,2)	0,00006	0,39 (0,23-0,62)
CT	52 (13,2)	24 (5,5)	0,00013	2,54 (1,54-4,19)
TT	3 (0,8)	1 (0,2)	0,27109	2,21 (0,32-15,06)
C	730 (92,6)	842 (97,0)	0,00005	0,35 (0,19-0,68)
T	58 (7,4)	26 (3,0)	0,00005	2,52 (1,57-4,03)

*Análisis conjunto Bogotá + Barranquilla

Al comparar el número total de casos con LES vs controles se observan diferencias en las frecuencias del genotipo CT 12,8% y 4,3% respectivamente (p=0,00867), la frecuencia del alelo T (alelo menor) fue superior en los casos (7,4%) que en los controles (2,1%) (p=0,00210). (Tabla 10).

Tabla 10. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP C1858T de *PTPN22* en controles sanos y pacientes con LES

PTPN22 C1858T	Controles Barranquilla y Bogotá N=188(%)	LES Barranquilla y Bogotá N=94 (%)	P	OR (IC 95%)
CC	180 (95,7)	81 (86,2)	0,00388	0,29 (0,11-0,71)
CT	8 (4,3)	12 (12,8)	0,00867	3,15 (1,28-7,82)
TT	0 (0,0)	1 (1,1)	0,15656	4,02 (0,16-99,66)
C	368 (97,9)	174 (92,6)	0,00210	0,28 (0,11-0,67)
T	8 (2,1)	14 (7,4)	0,00210	3,51 (1,47-8,35)

*Análisis conjunto Barranquilla + Bogotá

Al dividir los casos de LES por regiones se encuentra que los casos provenientes de Barranquilla muestran diferencias significativas para el genotipo CT (casos 12,8% - controles 2,12%, p=0,0101). La frecuencia del alelo T para esta población también muestra diferencias 6,4% para los casos y 1,1% para los controles (p=0,0112). La frecuencia del alelo T en los casos provenientes de Bogotá es de (8,5%) y los controles (3,2%) hallándose un valor cercano a la significancia (p=0.0525). En general para la población de Bogotá no se evidencian diferencias significativas entre casos y controles. (Tabla 11).

Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP c1858T en controles y pacientes con LES

PTPN22 C1858T	Pacientes LES Barranquilla N=47 (%)	Controles N=94 (%)	P	OR (IC 95%)	Pacientes LES Bogotá N=47 (%)	Controles N=94 (%)	P	OR (IC 95%)
CC	41 (87,2)	92 (97,8)	0,0101	0,19 (0,04-0,87)	40 (85,1)	88 (93,6)	0,0996	0,40 (0,13-1,22)
CT	6 (12,8)	2 (2,12)	0,0101	5,17 (1,15-23,25)	6 (12,7)	6 (6,4)	0,2004	2,11 (0,67-6,6)
TT	0 (0,0)	0 (0,0)	0	1,98 (0,04-101,30)	1 (12,2)	0 (0,0)	0,1558	4,04 (0,16-101,2)
C	88 (93,6)	186 (98,9)	0,0112	0,20 (0,05-0,09)	86 (91,5)	182 (96,8)	0,0525	0,36 (0,12-1,06)
T	6 (6,4)	2 (1,1)	0,0112	4,90 (1,12-21,55)	8 (8,5)	6 (3,2)	0,0525	2,7 (0,94-7,75)

*Análisis independiente Barranquilla y Bogotá

El análisis del Polimorfismo con Escleroderma no mostró diferencia en la frecuencia del alelo minoritario en la población con Es y la población sana, lo cual sugiere que la variante 620W no confiere riesgo para desarrollar ES (Tabla 12).

Tabla 12. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP C1858T de *PTPN22* en controles sanos y pacientes con ES

PTPN22 C1858T	Controles N=144 (%)	ES N=101 (%)	P	OR (IC 95%)
CC	135 (93,8)	95 (94,1)	0,92079	1,01 (0,36-2,82)
CT	9 (6,3)	6 (5,9)	0,92079	0,09 (0,35-2,78)
TT	0 (0,0)	0 (0,0)	-	1,42 (0,02-72,23)
C	279 (96,9)	196 (97,0)	0,92205	1,01 (0,36-2,77)
T	9 (3,1)	6 (3,0)	0,92205	0,99 (0,36-2,74)

*Análisis Bogotá

Para la asociación del polimorfismo con la severidad de AR, se analizaron las variables aplicando el test exacto de Fisher, en algunos casos se tomó la p corregida de Yates. Se analizaron las cortes de Barranquilla y Bogotá independientemente. (Tablas 13, 14).

Tabla 13. Relación del polimorfismo C1858T de *PTPN22* con manifestaciones de AR Barranquilla.

PTPN22 C1858T	Manifestaciones Extra-articulares	ANAS	Ac. Anti-CCP	RF	Nódulos Reumáticos	Vasculitis	Erosiones Oseas
CC	78,4% (29)	82,9% (34)	80,4% (37)	81,5% (66)	87.5% (7)	100% (1)	82,4% (56)
CT	21,6% (8)	17,1% (7)	19.6% (9)	17,3% (14)	12.5% (1)	0,0% (0)	17,6% (12)
TT	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0% (0)	1,2% (1)	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0% (0)
CC	29	34	37	66	7	1	56
CT+TT	8	7	9	15	1	0	12
P	0,5126*	0,7113*	0,2284**	0,7771*	0,5975**	0,8318**	0,9853*
OR	1,61	1,6	3,41	1,13	0,69	0,00	1,13
IC 95%	(0,52-4,90)	(0,37–7,29)	(0,37–18,33)	(0,43-4,23)	(0,03-6,27)	(0,00-26,34)	(0,37-3,55)

**Fisher * p corregida de YATES Se analizaron los genotipos CT+TT Vs. CC

Tabla 14. **Relación del polimorfismo C1858T de *PTPN22* con manifestaciones de AR Bogotá.**

PTPN22 C1858T	Manifestaciones Extra-articulares	ANAS	Ac anti-CCP	RF	Nódulos Reumáticos	Vasculitis	Erosiones Oseas
CC	83,3% (35)	94,8% (55)	93.3% (70)	88,6% (78)	100% (4)	100% (2)	84,5% (49)
CT	16,7% (7)	5,2% (3)	6,7% (5)	11,4% (10)	0,0% (0)	0,0% (0)	15,2% (9)
TT	0,0% (0)	0	0	0,0% (0)	0,0%	0,0% (0)	0,0% (0)
CC	35	55	70	78	4	2	49
CT+TT	7	3	5	10	0	0	9
P	0,4317¨*	0,0610*	0,0839**	0,5472**	0,5812**	0,5893*	0,4804*
OR	1,9	0,25	0,36	1,20	0.00	0,0	1,88
IC 95%	0,527,06	(0,05-1,05)	(0,09-1,38)	(0,27-5,95)	(0,00-11,81)	(0,00-31,35)	(0,48-7,92)

**Fisher *p corregida de YATES Se analizaron los genotipos CT+TT Vs. CC

No se encontró asociación con ninguna de las manifestaciones planteadas para las dos poblaciones. Algunas variables tenían un valor de p cercano a la significancia (ANAS= 0,0610 y Ac. anti-CCP= 0,0839), por lo tanto se analizaron conjuntamente. No se observó Asociación en este análisis para ninguna manifestación. (Tabla 15).

Tabla 15. **Relación del polimorfismo C1858T de *PTPN22* con manifestaciones de AR Bogotá + AR Barranquilla**

PTPN22 C1858T	Manifestaciones Extra-articulares	ANAS	Ac anti-CCP	RF	Nódulos Reumáticos	Vasculitis	Erosiones Oseas
CC	80,5% (62)	88,9% (88)	88,9% (112)	89,6% (156)	91,7% (11)	66,7% (2)	87,5% (84)
CT	19,5% (15)	11,1% (11)	11,1% (14)	9,8% (17)	8,3% (1)	33,3% (1)	12,5% (12)
TT	0,0% (0)	0	0	0,6% (1)	0	0	0
CC	62	88	112	156	11	2	84
CT+TT	15	11	14	18	1	1	12
P	0,2082*	0, 991*	0,6781*	0,1554*	0,4855**	0.3614**	0,5481*
OR	1,75	0,9	1,5	0,52	0,55	3,19	0,73
IC	(0,77-3,98)	(0,34-2,83)	(0,43-5,72)	(0,22-1,23)	(0,03-4,41)	(0,00-47,07)	(0,31-1,69)

**Fisher *p corregida de YATES Se analizaron los genotipos CT+TT Vs. CC

La asociación del polimorfismo con LES fue independiente de cualquier manifestación, de severidad o del estatus de anticuerpos, tanto en la cohorte Bogotá como en la de Barranquilla. (Tablas 16 y 17)

Tabla 16. Relación del polimorfismo C1858T de *PTPN22* con manifestaciones de LES

PTPN22 C1858T	Nefritis	Neuropsiquiatrías	Cutáneas	Vasculitis	Hematológicos (Anemia)
CC	83,9% (26)	88,9% (8)	89,5% (34)	75% (3)	82,3% (28)
CT	12,9% (4)	11,1% (1)	10,5% (4)	0	14,7% (5)
TT	3,2% (1)	0	0	25% (1)	2,9% (1)
CC	26	8	34	3	28
CT+TT	5	1	4	1	6
P	0,4019**	0,5534**	0,3392**	0,5557**	0,6571*
OR	1,83	0,61	0,51	1,59	1,07
IC 95%	(0,27-15,4)	(0,03- 6,24)	(0,08-3,40)	(0,00-21,36)	(0,15-9,20)

**Fisher *p corregida de YATES Se analizaron los genotipos CT+TT Vs. CC

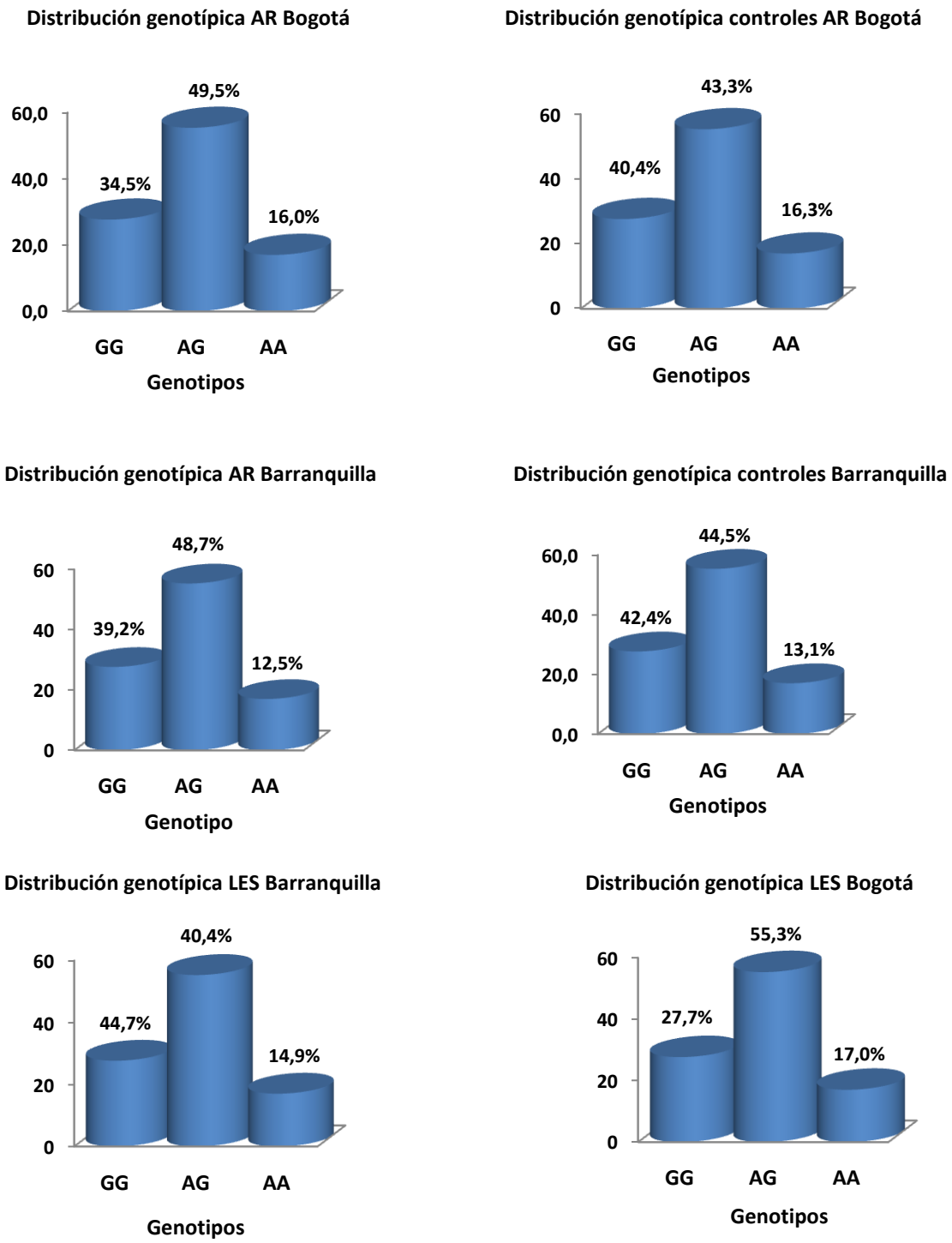
Tabla 17. Relación del polimorfismo C1858T de *PTPN22* con status de anticuerpos de LES.

PTPN22	ANAS	AC. anti-DNA	AC. anti-La	Ac. anti-Ro	Ac. anti-RNP	Ac. anti-SM
CC	86,4% (51)	86,3% (25)	85,7% (6)	94,7% (18)	87% (20)	85% (17)
CT	11,9% (7)	10,3% (3)	14,3% (1)	5,3% (1)	8,6% (2)	15% (3)
TT	1,7% (1)	3,4% (1)	0	0	4,4% (1)	0
CC	51	25	6	18	20	17
CT+TT	8	4	1	1	3	3
P	0,5009**	0,3891**	0,5628**	0,4150**	0,3797**	0,4314**
OR	0	1,92	1,61	0,41	2,7	1,85
IC 95%	0	(0,26-16,87)	(0,00_24,36)	(0,01-5,12)	(0.21-74,03)	(0,21-18,33)

**Fisher *p corregida de YATES Se analizaron los genotipos CT+TT Vs. CC

5.5.2 CTLA 4

Figura 34. Distribución genotípica pacientes AR, LES y controles CTLA4



Se estudió el polimorfismo rs3087243 (CT60) el cual ha mostrado la asociación mas fuerte con EAI en estudios reportados anteriormente en población Caucásica[202]. Después del análisis con las cohortes por separado y en conjunto, se encontró que CTLA 4 no está asociado con AR o LES en la población estudiada. Las frecuencias alélicas son similares tanto en pacientes como en controles. (Tablas 18, 19 y 20).

Tabla 18. Frecuencias alélicas y genotípicas de CTLA4 en pacientes con AR y controles sanos

CTLA4 rs3087243	Pacientes AR Barranquilla N=240 (%)	Controles N=290 (%)	P	OR (IC 95%)	Pacientes AR Bogotá N=113 (%)	Controles N=141 (%)	P	OR
GG	94 (39,2)	123 (42,4)	0,4492	0,88 (0,61-1,23)	39 (34,5)	57 (40,4)	0,3342	0,78 (0,46-1,30)
AG	116 (48,3)	129 (44,5)	0,3761	1,17(0,82-1,64)	56 (49,6)	61(43,3)	0,3172	1,28 (0,78-2,10)
AA	30 (12,5)	38 (13,1)	0,8362	0,95 (0,57-1,58)	18 (15,9)	23 (16,3)	0,9343	0,98 (0,50-1,91)
G	304 (63,3)	375(64,7)	0,6553	0,94 (0,73-1,21)	134 (59,3)	175 (62,1)	0,5258	0,89 (0,62-1,27)
A	176 (36,7)	205(35,3)	0,6553	1,06 (0,82-1,36)	92(40,7)	107 (37,9)	0,5258	1,12 (0,78-1,60)

*Análisis independiente Barranquilla y Bogotá

Tabla 19. Frecuencias alélicas y genotípicas de CTLA4 en pacientes con AR y controles sanos

CTLA4 rs3087243	Controles Barranquilla y Bogotá N=431 (%)	AR Barranquilla y Bogotá N=298 (%)	P	OR (IC 95%)
GG	180 (41,8)	133 (37,7)	0,24510	0,84 (0,63-1,12)
GT	190 (44,1)	172 (48,7)	0,19462	1,20 (0,90-1,59)
TT	61 (14,2)	48 (13,6)	0,82304	0,96 (0,63-1,43)
G	550 (63,8)	438 (62,0)	0,47126	0,93 (0,75-1,13)
T	312 (36,2)	268 (38,0)	0,47126	1,08 (0,87-1,32)

*Análisis conjunto Barranquilla + Bogotá

Tabla 20. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs3087243 de CTLA4 en pacientes con LES y controles sanos

CTLA4 rs3087243	Controles Barranquilla y Bogotá N=188 (%)	LES Barranquilla y Bogotá N=94 (%)	P	OR (IC 95%)
GG	70 (37,2)	34 (36,2)	0,86143	0,96 (0,57-1,60)
AG	83 (44,1)	45 (47,9)	0,55383	1,16 (0,70-1,90)
AA	35 (18,6)	15 (16,0)	0,58146	0,86 (0,44-1,64)
G	223 (59,3)	113 (60,1)	0,85557	1,03 (0,72-1,47)
A	153 (40,7)	75 (39,9)	0,58148	0,97 (0,67-1,38)

*Análisis conjunto Barranquilla + Bogotá

Este polimorfismo no es un factor de riesgo para AR ni para LES en nuestra población, tampoco se encuentra involucrado con la severidad de la enfermedad. No se encontró asociado a ninguna manifestación clínica de AR o LES en los análisis independientes y conjuntos. (Tablas 21, 22 y 23).

Tabla 21. Relación del polimorfismo rs3087243 de *CTLA4* con status de anticuerpos de LES.

CTLA4 rs3087243	ANAS	Ac. anti-DNA	Ac. anti-La	Ac. anti-Ro	Ac. anti-RNP	Ac. anti-SM
GG	33,9% (20)	21,4% (6)	57,1% (4)	33,3% (6)	34,8% (8)	30.0% (6)
AG	49,2% (29)	60,8% (17)	42,9% (3)	50,0% (9)	43,5% (10)	50,0%(10)
AA	16,9% (10)	17,8% (5)	0,0% (0)	16,7% (3)	21,7% (5)	20,0% (4)
GG	20	6	4	6	8	6
AG+AA	39	22	3	12	15	14
P	0,2071**	0,1746*	0,1510**	0,8120*	0,8533*	0,9939*
OR	0	2,69	0,29	0,94	1,09	1,24
IC	(0,00-3,36)	(0,71-10,55)	(0,04-2.02)	(0,22-4,14)	(0,26-4,67)	(0,29-5,45)

**Fisher *p corregida de YATES Se analizaron los genotipos AT+AA Vs. GG

Tabla 22. Relación polimorfismo rs3087243 de *CTLA 4* con manifestaciones de LES.

CTLA4 rs3087243	Nefritis	Neuropsiquiatricos	Cutáneos	Vasculitis
GG	35,5% (11)	22,2% (2)	32,4% (12)	20,0% (1)
AG	45,2% (14)	55,6 (5)	54,1% (20)	40,0% (2)
AA	19,3% (6)	22,2% (2)	13,5% (5)	40,0% (2)
GG	11	2	12	1
AG+AA	20	7	25	4
P	0,3842*	0,4263**	0,4218*	0,5201**
OR	0,45	1,69	0,69	1,82
IC	(0,10-1,98)	(0,27-13,50)	(0,15-3,06)	(0,16-46,55)

**Fisher *p corregida de YATES Se analizaron los genotipos AT+AA Vs. GG

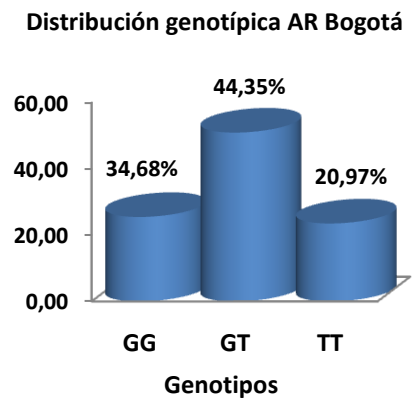
Tabla 23. Relación polimorfismo rs3087243 de *CTLA 4* con manifestaciones de AR.

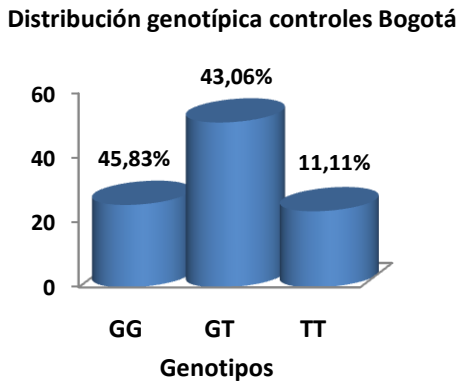
CTLA 4 rs3087243	Manifestaciones Extra-articulares	ANAS	Ac. anti-CCP	RF	Nódulos Reumáticos	Vasculitis	Erosiones óseas
GG	37,8% (25)	42,2% (35)	35,4% (35)	39,1% (54)	54,5% (6)	66,7% (2)	38,5% (25)
AG	41,0% (27)	47,0% (39)	44,4% (44)	44,2% (61)	36,4% (4)	33,3% (1)	46,1% (30)
AA	21,2% (14)	10,8% (9)	20,2% (20)	16,7% (23)	9,1% (1)	0,0% (0)	15,4% (10)
GG	25	35	35	54	6	2	25
AG+AA	41	48	64	84	5	1	40
P	0,8974*	0,2102*	0,8276*	0,9467*	0,1773*	0,3055*	0,5843*
OR	0,91	0,61	1,17	0,92	0,46	0,28	0,79
IC 95%	0,45-1,82	(0,29-1,27)	(0,52-2,65)	(0,45-1,88)	(0,12-1,82)	(0,01-4,12)	(0.39-1,60)

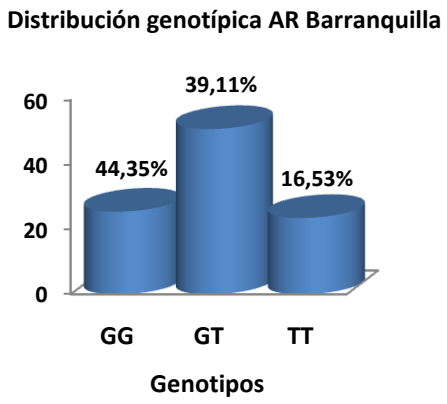
**Fisher *p corregida de YATES Se analizaron los genotipos AT+AA Vs. GG

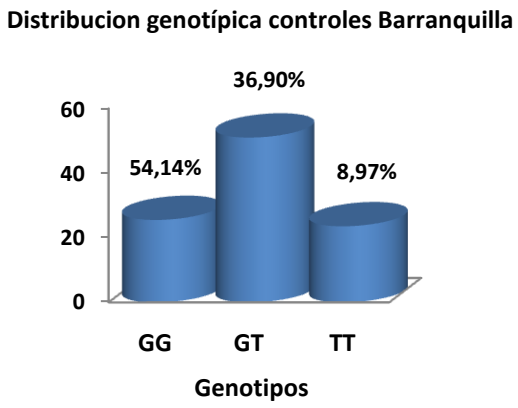
5.5.3 STAT 4

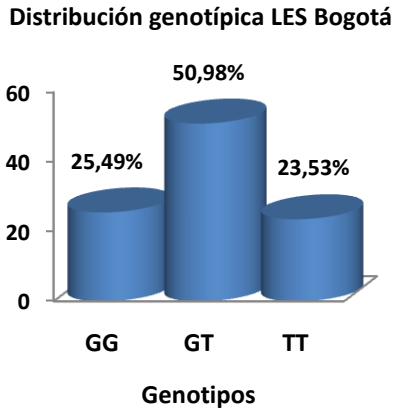
Figura 35. Distribución genotípica pacientes AR, LES y controles STAT4

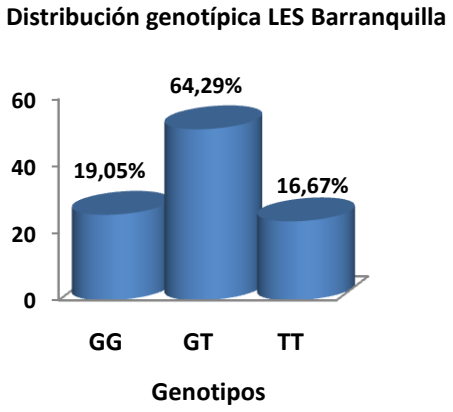












Al evaluar las frecuencias genotípicas para las dos poblaciones casos AR y controles se observaron diferencias significativas para el genotipo TT, donde la frecuencia del genotipo de los casos (18,0%) fue superior a la de los controles (9,7%) (p= 0,00059). La frecuencia del alelo T en los casos fue de 38,3% y en los controles del 29,1% (p=0.00009) (Tabla 24).

Tabla 24. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs7574865 de STAT4 en controles y pacientes con AR

STAT4 rs7574865	Controles Barranquilla y Bogotá N=434 (%)	AR Barranquilla y Bogotá N=373 (%)	P	OR (IC 95%)
GG	223 (51,4)	154 (41,3)	0,00415	0,67 (0,50-0,88)
GT	169 (38,9)	152 (40,8)	0,60031	1,08 (0,81-1,43)
TT	42 (9,7)	67 (18,0)	0,00059	2,02 (1,34-3,05)
C	615 (70,9)	460 (61,7)	0,00009	0,66 (0,53-0,81)
T	253 (29,1)	286 (38,3)	0,00009	1,51 (1,22-1,85)

*Análisis conjunto Barranquilla y Bogotá

Al estratificar la población por regiones la frecuencia del genotipo TT fue superior en los casos, AR de Barranquilla (16,5%) y AR de Bogotá (21%) al compararlo con los controles AR Barranquilla (9%) y controles AR Bogotá (11,1%) (p=0,0085 y p= 0,0269 respectivamente). Al estimar las frecuencias alélica se encontró que la frecuencia del alelo T fue superior en los casos (AR Barranquilla (36%) y AR Bogotá (43,1%)) en comparación con los controles (AR Barranquilla (27,4%) y AR Bogotá (32,6%)) (p=0,0026 y p=0,0122 respectivamente). (Tabla 25).

Tabla 25. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo rs7574865 de STAT4 en controles y pacientes con AR

STAT4 rs7574865	Pacientes AR Barranquilla N=249 (%)	Controles N=290	P	OR (IC 95%)	Pacientes AR Bogotá N=124 (%)	Controles N=144 (%)	P	OR (IC 95%)
GG	111 (44,5)	157 (54,1)	0,0269	0,68 (0,48-0.95)	43 (34,7)	66 (45,8)	0,0638	0,63 (0,38-1,03)
GT	97 (39,0)	107 (36,9)	0,6231	1,09 (0,77-1,54)	55 (44,3)	62 (43,1)	0,8307	1,05 (0,65-1,70)
TT	41 (16,5)	26 (9,0)	0,0085	1,972 (1,17-3,31)	26 (21,0)	16 (11,1)	0,0269	2,07 (1,06-4,03)
G	319 (64,0)	421 (72,6)	0,0026	0,67 (0,52-0,87)	141 (56,9)	194 (67,4)	0,0122	0,64 (0,45-0,91)
T	179 (36,0)	159 (27,4)	0,0026	1,48 (1,14-1,92)	107 (43,1)	94 (32,6)	0,0122	1,56 (1,09-2,21)

*Análisis independiente Barranquilla y Bogotá

El análisis de la población total de casos con LES mostró diferencias significativas para la frecuencia genotípica GT (57%) y frecuencia genotípica TT (20,4%) vs controles (GT: 43,1% y TT: 10,6%), p=0,02810 genotipo GT y p= 0,02547 genotipo TT. La frecuencia génica para T también presento diferencias significativas al comparar ambas poblaciones (casos 48,9% y controles 32,2% p= 0,00011) (Tabla 26).

Tabla 26. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs7574865 de *STAT4* en controles sanos y pacientes con LES

STAT4 rs7574865	Controles Barranquilla y Bogotá N=188(%)	LES Barranquilla y Bogotá N=93 (%)	P	OR (IC 95%)
GG	87 (46,3)	21 (22,6)	0,00012	0,35 (0,19-0,61)
GT	81 (43,1)	53 (57,0)	0,02810	1,73 (1,05-2,85)
TT	20 (10,6)	19 (20,4)	0,02547	2,15 (1,09-4,22)
C	255 (67,8)	95 (51,1)	0,00011	0,50 (0,34-0,71)
T	121 (32,2)	91 (48,9)	0,00011	2,01 (1,40-2,87)

*Análisis conjunto Barranquilla y Bogotá

Al evaluar los casos por regiones, los casos LES provenientes de Barranquilla presentaron diferencias significativas en la frecuencia alélica de T y frecuencia genotípica para el heterocigoto GT, siendo superior en los casos (48,8% y 64,3% respectivamente) mientras en los controles la frecuencia del alelo T 31,9% y la frecuencia del genotipo GT 42,6%. p=0.0077 y p=0.0192 respectivamente.

La frecuencia del genotipo TT para los casos LES provenientes de Bogotá (23,5%) fue superior a la frecuencia obtenida en los controles (10,6%) (p=0,0388). La frecuencia génica para el alelo menor fue superior en los casos (49%) vs. controles (32,4%) (p=0.0056). (Tabla 27).

Tabla 27. Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs7574865 de *STAT4* en controles sanos y pacientes con LES por región.

STAT4 rs7574865	Pacientes LES Barranquilla N=42 (%)	Controles N= 94 (%)	P	OR (IC 95%)	Pacientes LES Bogotá N=51 (%)	Controles N=94 (%)	P	OR
GG	**8 (19,0)**	**44 (46,8)**	**0,0021**	**0,29 (0,12-0,68)**	**13 (25,4)**	**43 (45,8)**	**0,0168**	**0,42 (0,20-0,88)**
GT	**27 (64,3)**	**40 (42,6)**	**0,0192**	**2,34 (1,11-4,93)**	**26 (50,1)**	**41 43,6)**	**0,3958**	**1,34 (0,67-2,63)**
TT	**7 (16,7)**	**10 (10,6)**	**0,3260**	**1,71 (0,62-4,74)**	**12 (23,5)**	**10 (10,6)**	**0,0388**	**2,51 (1,01-6,19)**
G	**43 (51,2)**	**128 (68,1)**	**0,0077**	**0,45 (0,29-0,83)**	**52 (51,0)**	**127 (67,6)**	**0,0056**	**0,50 (0,30-0,82)**
T	**41 (48,8)**	**60 (31,9)**	**0,0077**	**2,02 (1.19-1,40)**	**50 (49,0)**	**61 (32,4)**	**0,0056**	**1,99 (1,21-3,24)**

*Análisis independiente Barranquilla y Bogotá

La asociación del polimorfismo rs7574865 de *STAT4* con LES y AR es independiente de la severidad de las enfermedades y no se asocio con ninguna variable estudiada. (Tablas 28 y 29). La variante rs7574865 de *STAT4* se asocia con LES independientemente del status de anticuerpos, y no es marcador de severidad de la enfermedad. (Tabla 30).

Tabla 28. Relación del polimorfismo rs7574865 de *STAT 4* con manifestaciones y status de anticuerpos en AR

STAT4 rs7574865	Manifestaciones Extra-articulares	ANAS	Ac. anti-CCP	RF	Nódulos Reumáticos	Vasculitis	Erosiones Oseas
GG	41,4% (31)	40,2% (39)	40,8% (49)	41,4% (70)	25,9% (3)	33,3% (1)	38,0% (35)
GT	49,3% (37)	42,3% (41)	44,1% (53)	45,0% (76)	75,1% (9)	66,7% (2)	45,7% (42)
TT	9,3% (7)	17,5% (17)	15,1% (18)	13,6% (23)	0,0% (0)	0,0% (0)	16,3% (15)
GG	31	39	49	70	3	1	35
GT+TT	44	58	71	99	9	2	57
P	0,9483*	0,6404*	0,1371*	0,2326*	0,0536*	0,6256*	0,9706*
OR	0,98	0,83	0,55	0,66	1,92	1,15	1,05
IC 95%	(0,53-1,79)	(0,43-1,58)	(0,25-1,189	(0,34-1,27)	(0,46-9,28)	(0,08-32,66)	(0,58-1,93)

**Fisher *p corregida de YATES Se analizaron los genotipos CT+TT Vs. CC

Tabla 29. Relación del polimorfismo rs7574865 de *STAT 4* con manifestaciones de LES

STAT4 rs7574865	Nefritis	Neuropsiquiatricos	Cutáneos	Vasculitis	Anemia
GG	42,4 % (12)	33,3% (2)	27,0% (10)	40% (2)	28,1% (9)
GT	48,3% (14)	16,7% (1)	62,2% (23)	40% (2)	53,1% (17)
TT	10,3% (3)	50,0% (3)	10,8% (4)	20% (1)	18,7% (6)
GG	12	2	10	2	9
GT+TT	17	4	27	3	23
P	0,0981*	0,9772*	0,7923**	0,6238**	0.6402
OR	0,25	0,61	1,5	0,59	0,96
IC 95%	(0,05-1,2)	(0,08-5,62)	(0,33-6,68)	(0,07-5,82)	(0,16-5,469

**Fisher *p corregida de YATES Se analizaron los genotipos CT+TT Vs. CC

Tabla 30. **Relación del polimorfismo rs7574865 de *STAT 4* con status de anticuerpos en LES**

STAT4 rs7475865	ANAS	Ac. anti-DNA	Ac. anti-Ro	Ac. anti-RNP	Ac. anti-SM	Ac. anti-La
GG	32,1% (18)	28,6% (8)	16,7% (3)	27,3% (6)	20,0% (4)	50% (3)
GT	50,0% (28)	53,6% (15)	66,7% (12)	45,5% (10)	60,0% (12)	50% (3)
TT	17,9 % (10)	17,8% (5)	16,6% (3)	27,2% (6)	20,0% (4)	0,0% (0)
GG	18	8	3	6	4	3
GT+TT	38	20	15	16	16	3
P	0,3181*	0,7766*	0,1623 *	0,9447*16	0,3526*	0,3666**
OR	0	1,41	3,57	1,33	2,46	0,41
IC 95%	(0,00-2,80)	(0,38-5,23)	(0,68-20,77)	(0,28-6,37)	(0,5-12,74	0,05

**Fisher *p corregida de YATES Se analizaron los genotipos CT+TT Vs. CC

6 DISCUSION

6.1 PTPN22

Desde la identificación de la relación entre las EAI y los genes HLA, hace 30 años no se había descrito otro gen diferente, como marcador de susceptibilidad para estas enfermedades. En los últimos años ha surgido un nuevo gen de riesgo a múltiples EAI. Este gen es una proteína tirosina fosfatasa (PTP) que en un primer estudio se encontró asociado con a DT1 [(184).] Desde que Bottini y col. en 2004 describieran la primera asociación entre el polimorfismo 1858C/T y DT1 [(184),] esta proteína tirosina fosfatasa intracelular se ha convertido en el mayor factor genético común de riesgo a autoinmunidad en humanos. Más adelante trabajando una amplia gama de SNPs funcionales por ligamento, Begovich y col (Agosto del 2004). reportaron una asociación similar para AR [(203).] Posteriormente a estos estudios iniciales, numerosos grupos han replicado la asociación de dicho polimorfismo en diversas poblaciones de origen caucásico para AR, LES y otras EAI [(203-206).] LM Gómez y col [(207)] reportaron la asociación de C1858T/*PTPN22* para LES, DT1, Síndrome Primario de Sjögren (SS), pero no para AR (OR=1.26, IC 95% 0.64–2.44, P=0.5) en población Colombiana.

Teniendo en cuenta el papel de PTPN22 en la regulación del TCR y la relevancia que parece tener el SNP C1858T en susceptibilidad para autoinmunidad, se decidió estudiar la asociación de este SNP con AR, LES, ES y su relación con la severidad de AR y LES en dos poblaciones colombianas: la región Caribe y la región central del país, se hizo un análisis diferencial entre las dos poblaciones. Respecto al trabajo de investigación llevado a cabo por Gómez y col en el 2005 para población Colombiana, donde tomaron 298, casos y 308 controles para AR, se aumentó en el presente estudio el número de individuos= 394 casos y 434 controles sanos, con el fin de obtener mayor poder estadístico, para revaluar la no asociación de AR con el polimorfismo C1858T de *PTPN22.*

Los resultados de este estudio reportan asociación del polimorfismo C1858T de *PTPN22* con AR Barranquilla (OR=2.80; IC 95% 1.58-4.95 p=0.0002, para el alelo T), no se observó asociación con la población de AR Bogotá, pero se observó una tendencia para el genotipo CT. Al analizar las dos poblaciones en conjunto vemos que la asociación fue más fuerte (OR= 2,52 IC 95% 0,83-4,28 p=0,00005 para el alelo T). La presencia de no asociación en la población del centro del país podría ser debida al número de individuos analizados, 133 pacientes mientras que para Barranquilla el número de pacientes fue de 261, situación que podría estar afectando el poder estadístico para esta población.

La asociación hallada al evaluar la población total de pacientes con AR es relevante ya que en estudios anteriores en población Colombiana no se había reportado esta asociación.

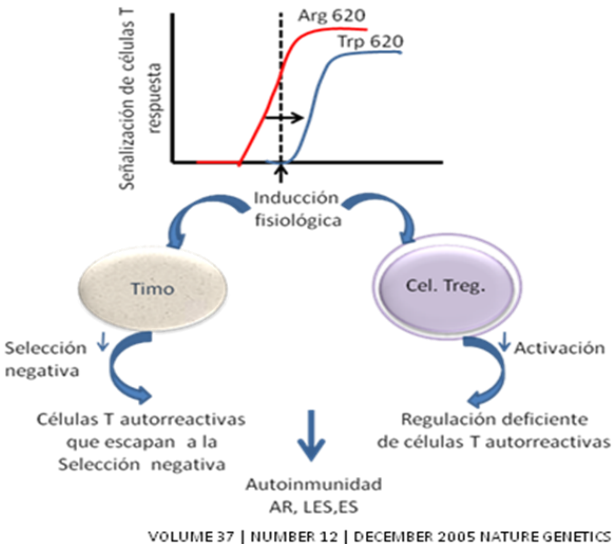
También se encontró una asociación significativa para LES (OR=3,51; IC 95% 1,47-8,35 p= 0.00210 para el alelo T). Se reprodujo la asociación del estudio colombiano [206] y de los diferentes estudios a nivel mundial [202-205]. En un meta-análisis reciente que incluye en su mayoría estudios en caucásicos confirmó una fuerte asociación global para LES ($P<10^{-5}$, OR= 1.49, IC 95% 1.28-1.75) y para AR ($P<10^{-5}$, OR= 1.68, IC 95% 1.53-1.84) [208]. Se identificó al polimorfismo C1858T de *PTPN22* como la asociación más robusta y reproducible después de la región HLA. Adicionalmente a la fuerte susceptibilidad de C1858T para desarrollar LES y AR, se ha visto asociado a otras EAI, como enfermedad de Graves [209], AIJ [210], tiroiditis de Hashimoto [205] y miastenia gravis [211]. Todos estos fenotipos autoinmunes tienen en común un componente humoral, con autoanticuerpos específicos para cada patología, que frecuentemente aparecen antes de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Parece ser que *PTPN22* se encuentra asociado a patología autoinmunes caracterizadas por la producción de anticuerpos, mientras que en enfermedad intestinal inflamatoria [212], esclerosis múltiple [213, 214]. y enfermedad celiaca no es una característica dominante [213]. En estas patologías no se ha encontrado asociación con la variante alélica R620W. Teniendo en cuenta esta observación analizamos la relación de la variante alélica con los anticuerpos anti-CCP, FR, anti-dcADN,

ENAS, observando que la asociación del polimorfismo con AR y LES fue independiente del status de anticuerpos, no se asoció a FR, anticuerpos anti-CCP, anti-ADNdc o anticuerpos anti-ENAS.

Se ha demostrado que los alelos del epitopo compartido (EC) HLA-DRB1 y PTPN22 junto con el FR y los anticuerpos anti-citrulina (anti-CCP) son marcadores de susceptibilidad y de severidad para AR. Últimamente se ha propuesto que los alelos del EC HLA-DRB1 se asocian solamente a los pacientes seropositivos para anticuerpos anti-CCP.

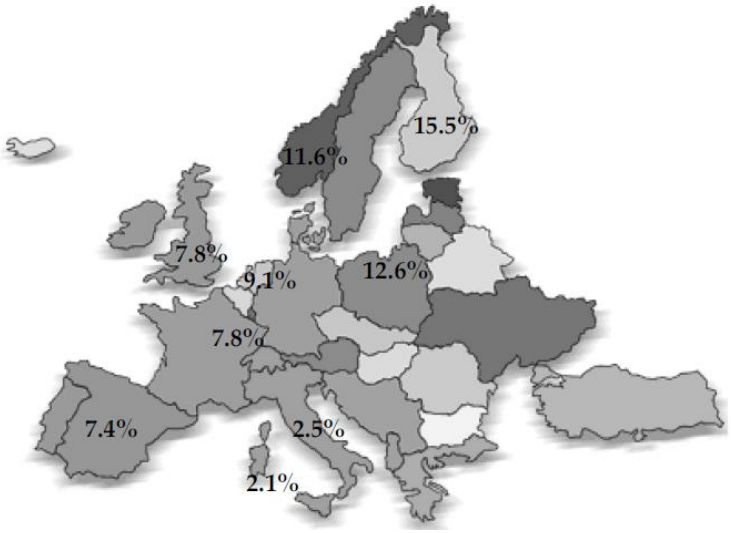
La asociación del alelo R629W con la enfermedad puede ser el cambio en la regulación de Lck, causando la pérdida de la regulación negativa en la vía de señalización del receptor de células T. Es más probable que el polimorfismo R620W cause un cambio del nivel de actividad eficaz de PTPN22 en los compartimentos celulares, como una ganancia de función. ¿Cómo esta ganancia de función de la variante alélica acompañada del cambio en la regulación de la vía de señalización del TCR se puede involucrar en autoinmunidad?
El polimorfismo R620W de PTPN22 resulta en una ganancia de función enzimática que va a aumentar el umbral para la señalización del TCR (Figura 36).

Figura 36. PTPN22: Ganancia de función



El efecto de esos cambios bioquímicos conduce a un aumento de nivel del umbral de estimulación que es requerido para la señalización del TCR. En el timo, este cambio en el umbral de señalización puede resultar en la selección positiva de timocitos que en situación normal serían delecionados, resultando así en la periferia células T maduras, potencialmente autorreactivas. Un segundo mecanismo puede involucrar una señal reducida en las células Treg con un resultado deficiente en la regulación de las células T autorreactivas. Uno o ambos de estos mecanismos puede llevar al estado de susceptibilidad a desordenes autoinmunes como, AR, LES y DT1 [(215).] Un estudio reciente demostró que el polimorfismo incrementa las células T de memoria CD4+ y altera la producción de citoquinas. Adicionalmente puede alterar las células B, donde se ha descrito que la variante 620W da lugar a una menor producción de células B de memoria dichas células van a responder menos al estimulo del receptor de células B (BCR) [(216).] Este hecho podría finalmente resultar en una mayor producción de autoanticuerpos. Las frecuencias alélicas del polimorfismo C1858T de *PTPN22* varían entre las distintas poblaciones. En Europa existe un marcado gradiente norte-sur, siendo las frecuencias más bajas en el sur de Europa y las más altas en los países escandinavos (Figura 37). El alelo 620W está prácticamente ausente en poblaciones asiáticas y africanas [(217).]

Figura 37. Mapa de Europa: Resume la variación de la frecuencia demográfica para el alelo 1858T de PTPN22



Por lo tanto los intentos de replicación de esta asociación en EAI en esas poblaciones han resultado negativos. En conclusión, el polimorfismo 1858T de *PTPN22* está fuertemente asociado con susceptibilidad a AR y LES, además ha sido propuesto como un marcador común de predisposición a diversas EAI en poblaciones caucásicas (Tabla 31). Con este estudio podemos confirmar la influencia de este polimorfismo en poblaciones hispanas**.**

Tabla 31. Características de los estudios del Polimorfismo 1858T de PTPN22 y Enfermedades autoinmunes.

Estudio	País (etnicidad)	Enfermedad	Número Casos	Número Controles	Principales hallazgos (OR para alelo T vs. C)	Poder[a] ($\alpha = 0.05$, OR = 1.5)
Kahles *et al.*	Germany (C)	T1D	239	220	T1D: OR = 1.88, $P = 0.0009$	57.2
		Addison's diseases		121	Addison's disease: NS	
Prescott *et al.*	UK (U)	IBD	374	514	NS	84.6
Martin *et al.*	Spain (C)	IBD	812	1113	NS	99.2
Zhernakova *et al.*	Netherland (C)	RA	528	151	RA: OR = 1.8, $P = 0.003$	83.6
		T1D		334	T1D: OR = 2.3, $P < 0.0000002$	
		Celiac disease		309	Celiac disease: NS	
Gomez *et al.*	Colombian (H)	RA	308	298	RA: NS	86.2
		SLE		143	SLE: OR = 2.56, $P = 0.001$	
		T1D		110	T1D: NS	
Wagenleiter *et al.*	German (C)	CD	254	146	NS	79.9
Steer *et al.*	UK (C)	RA	374	302	OR = 2.05, $P = 0.00003$	73.9
Wesoly *et al.*	Netherlands (C)	RA	891	416	OR = 1.55, $P < 0.00001$	99.9
Rueda *et al.*	Spain (C)	Celiac disease	653	534	NS	93.2
Seldin *et al.*	Finland (C)	RA	1400	1030	RA: OR = 1.47, $P = 3.0 \times 10^{-7}$	99.9
		JIA		230	JIA: NS	
Reddy *et al.*	Sweden (C)	SLE	1042	571	OR = 1.42, $P = 0.0007$	98.0
van Oene *et al.*	Canada (C)	RA	603	906	OR = 1.80, $P = 0.000002$	97.3
Skorka *et al.*	Polland (C)	GD	310	290	OR = 1.70, $P = 0.0008$	68.8
Hinks *et al.*	UK (C)	RA	595	886	RA: OR = 1.88, $P = 1.8 \times 10^{-8}$	97.1
		JIA		661	JIA: OR = 1.53, $P = 0.0005$	
		Psoriasis		279	Psoriasis: NS	
		PsA		455	PsA: NS	
		MS		379	MS: NS	
Ittah *et al.*	France (C)	Sjogren's disease	172	183	NS	47.0
Simkins *et al.*	New Zealand (C)	RA	563	869	OR = 1.58, $P = 0.0003$	96.6
Matesanz *et al.*	Spain (C)	MS	200	120	NS	43.2
Viken *et al.*	Norway (C)	RA	555	515	RA: OR = 1.58, $P = 0.001$	90.5
		JIA		320	JIA: OR = 1.41, $P = 0.04$	
		CD		316	CD: NS	
		SLE		162	SLE: NS	
Zheng *et al.*	USA (C)	T1D	1178	396	OR = 3.40, $P = 0.008$	97.8
Orozco *et al.*	Spain (C)	RA	1036	826	RA: OR = 1.45, $P = 0.001$	99.1
		SLE	512	338	SLE: OR = 1.45, $P = 0.03$	
		GD	429	549	GD: OR = 1.88, $P = 0.00003$	87.9
Velaga *et al.*	UK (U)	Addison's disease		104	Addison's disease: OR = 1.69, $P = 0.03$	
Smyth *et al.*	UK (U)	T1D	1718	1573	T1D: OR = 1.78, $P = 1.17 \times 10^{-14}$	99.9
		GD	833	901	GD: OR = 1.43, $P = 0.0004$	
Kyogoku *et al.*	USA (C)	SLE	1035	520	OR = 1.32, $P = 0.03$	97.6
Begovich *et al.*	USA (U)	RA	926	840	OR = 2.13, $P < 0.0001$	98.8
Bottini *et al.*	USA (U)	T1D	395	294	OR = 1.79, $P = 0.002$	74.7

C= Caucásico U= Desconocido H= hispano

6.2 CTLA 4

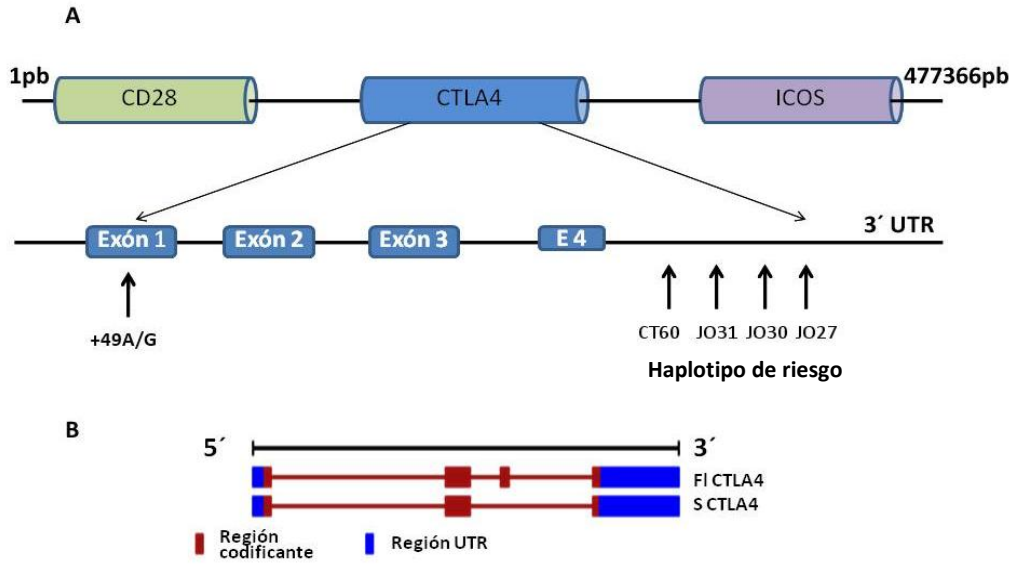
CTLA4 es generalmente un regulador negativo de la activación de las células T porque compite por los ligandos CD80 y CD86 con la molécula coestimuladora CD28, por lo tanto cualquier alteración en su función podría llevar a una estimulación exagerada de las células T por parte de CD28 lo cual se observa en las EAI.

El papel regulador de CTLA-4 ha sido demostrado en ratones Knock-out para este gen, los cuales desarrollan desórdenes linfoproliferativos que resultan en expansión policlonal de linfocitos T CD4+ aparentemente como resultado de una tolerancia desbalanceada a los autoantígenos [218, 219]. El bloqueo *in vitro* de CTLA-4 por anticuerpos monoclonales potencia la proliferación celular, aumenta la producción de IL-2, produce cambios en el citoesqueleto de los linfocitos y aumenta la velocidad del ciclo celular por intermedio de las ciclinas [193, 220]. Los polimorfismos de CTLA4 han sido asociados con una variedad de enfermedades autoinmunes humanas, con ORs que van de 1.1 a 1.5 [221]. Tales asociaciones fueron reportadas primero con enfermedad de Graves [222]. Y subsecuentemente con diabetes tipo 1 [223]. La mayoría de estos estudios se han realizado con el SNP +49 A/G.

CTLA4 se encuentra en una región que también codifica para otras dos moléculas coestimulatorias CD28 e ICOS (Figura 38 A), por lo que fue sugerido inicialmente que la asociación con *CTLA4* podría reflejar el desequilibrio de ligamento con otros genes candidatos en la región [183, 221]. Sin embargo, un análisis extenso de SNPs redujo una región importante de riesgo a un segmento de 6.1 kb en la región 3´ de *CTLA4*, incluyendo polimorfismos posiblemente reguladores en la región 3'UTR [202]. Se han reportado otros SNPs en esta región por estar asociados a otros desordenes autoinmunes [221], como la enfermedad de Addison, enfermedad celiaca y artritis reumatoide [224]. Por lo tanto, *CTLA4* parece ser un loci de susceptibilidad para autoinmunidad. Se observó que un haplotipo

formado por 4 SNPs donde el CT60 mostraba la asociación más fuerte con Diabetes tipo I, enfermedad de graves y tiroiditis autoinmune.

Figura 38. A. Posible región de ligamiento, haplotipo y SNP de riesgo. **B**. isoformas de la molécula CTLA 4.



Se han propuesto varios mecanismos para ver la implicación de *CTLA4* en la pérdida de la auto-tolerancia y autoinmunidad:

1. El haplotipo de riesgo se asocia a bajos niveles de una variante de empalme que codifica la forma soluble de *CTLA4,* (sCTLA4) (Figura 38 B) la cual se une a sus ligandos CD80 y CD86, bloqueando su interacción con la molécula coestimulante CD28. Esta disminución en los niveles de sCTLA4 puede indicar una carencia relativa del bloqueo de la actividad de la célula T efectora, permitiendo mayor activación de estas y poner al individuo en riesgo para desarrollar autoinmunidad. Sin embargo, esta investigaciones no han sido conclusivas [(221).]

2. Paradójicamente a su función reguladora negativa *CTLA 4* activa las células $T_{Reg,}$ donde se expresa constitutivamente. Así que una alteración en el gen podría conducir a una disminución en la activación de las células $T_{Reg,}$ desencadenando autoinmunidad [183].

Aunque *CTLA4* se ha propuesto como un gen de susceptibilidad para autoinmunidad, también se han visto resultados inconsistentes. Barton A y col (2004)[225]. publicaron un análisis de haplotipos en familias simplex (con un solo miembro afectado). Fue usado el genotipo de 5 haplotipos (-1722 T/C, -1661 A/G, -658 C/T, -319 C/T, and +49 A/G) y adicionalmente 2 SNPs (CT60 y rs1863800). No hubo evidencia de asociación de los SNPs simples ni de los 5 haplotipos en esa población [226]. En población española se hicieron dos estudios con el polimorfismo CT60, uno para AR [227], donde no se reporto asociación. El otro estudio se llevó a cabo con el mismo polimorfismo y una cohorte con LES [228]. En contraste este estudio reportó la asociación del polimorfismo CT60 con LES. En este estudio en población colombiana no se observó asociación con AR ni con LES. En conclusión, analizando los resultados podemos decir que *CTLA 4* no es un gen de susceptibilidad para AR. Podría tener un pequeño efecto para LES (OR= 1,87 IC 95% 0,92-3,77 p= 0,0724 para el genotipo AG), (OR= 1,52 IC 95% 0,92-2,52 p= 0,0992 para el alelo A).

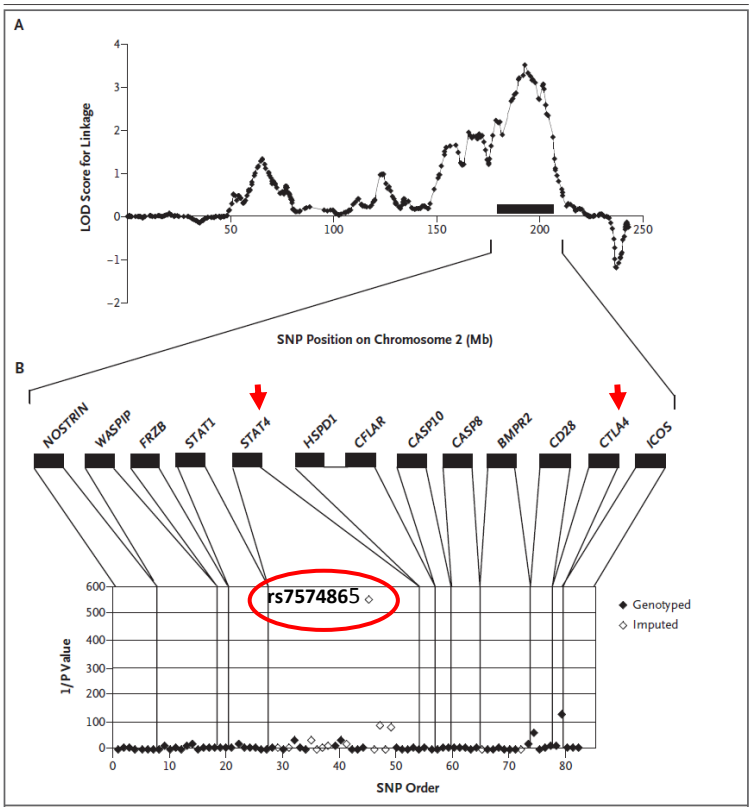
Se tendría que revaluar la asociación de *CTLA* con autoinmunidad, realizando mas estudios donde se incremente el número de población, aumentar el número de haplotipos y realizar un análisis de ligamiento ya que podría estar en desequilibrio de ligamiento con el gen responsable de susceptibilidad para EAI.

6.3 STAT4

STAT4 está localizado en el cromosoma 2q en una región identificada como región putativa de ligamiento [229], donde se encuentran CTLA4, CD28-CTLA2-ICOS. En el estudio desarrollado por Remmers y col [225], en población norteamericana con ancestro Europeo y

Sueco, se realizó un mapeo fino de dicha región utilizando una selección de genes candidatos, para encontrar polimorfismos asociados con AR. (Figura 39). Se encontró una fuerte asociación para STAT4, en cambio la asociación de CTLA4 fue bastante moderada sugiriendo que la asociación encontrada anteriormente, se atribuyó a STAT4 y la contribución de CTLA4 fue pequeña.

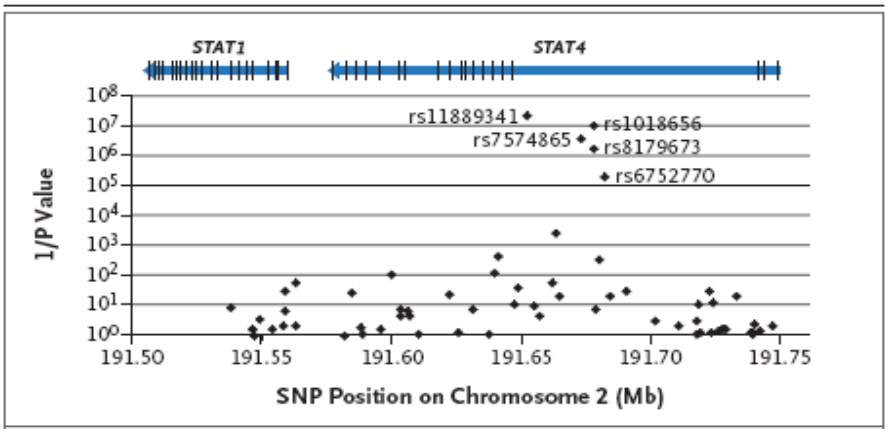
Figura 39. Panel A: Pico de ligamiento identificado anteriormente en el cromosoma 2 para la presencia de los genes que podrían influir en la artritis reumatoidea. Se evaluaron 13 genes candidatos. **Panel B:** Asociación para los 82 SNPs dentro de los genes candidatos seleccionados.



En el mismo estudio analizando una región entre STAT1 y STAT4 se encontró un haplotipo en el gen STAT4, fuertemente asociado con el riesgo de desarrollar AR y LES. El alelo menor (alelo de riesgo) del haplotipo definido por 4 SNPs estaba presente en el 27 % de

los cromosomas de pacientes con AR, comparado con el 22 % en los controles, y en el 31% de los cromosomas de pacientes con LES comparados con el 22% en los controles. Estos marcadores se encuentran en alto desequilibrio de ligamiento (DL), siendo el SNP rs7574865 el de más alto riesgo para AR y LES, sugiriendo una vía compartida para estas enfermedades. La figura 40, muestra la significancia de las asociaciones (presentada como 1 dividido por el valor de P) para 63 SNPS en la región STAT1-STAT4, mostrada según la posición cromosómica. Se muestran los cinco SNPs con valores de p menor de 1×10^{-5}.

Figura 40. Región STAT1- STAT4



El estudio anterior fue reproducido en población Coreana por Hye-Soon Lee y col (2007). en 1.123 casos y 1008 controles apareados por etnicidad. Los 4 SNPs de riesgo fueron los mismos que en el estudio Norteamericano, pero con un resultado de asociación-moderado (odds ratio 1.21–1.27). Un haplotipo común se ha definido con este marcador TTCG y lleva el alelo de riesgo para AR en Coreanos [34 % versus 28 %, P = 0.0027, OR = 1.33, (IC 95% 1.10–1.60)]. Esta asociación se ha reproducido en poblaciones española, holandesa y una cohorte Sueca [230]. Lo mismo que en población japonesa, obteniendo resultados similares [231]. Adicionalmente se ha encontrado que la variante que confiere mayor riesgo a la enfermedad (rs7574865) está más fuertemente asociada en individuos

con LES caracterizados por la presencia de autoanticuerpos anti-ADNdc, nefritis y una edad de diagnóstico menor de 30 años [232].

Este estudio fue desarrollado para investigar la asociación antes relatada, del polimorfismo rs7574865 de *STAT4* con AR y LES. También se quiso reproducir la asociación reportada por RJ Palomino- Morales y col [233] en población Colombiana (OR 1,62; IC 95% 1,22-2,16 p= 0.0005) Se pudo reproducir dicha asociación con AR y LES en las dos poblaciones Barranquilla y Bogotá al analizarlas individual y conjuntamente sugiriendo así a STAT4 como un marcador de susceptibilidad para estas enfermedades. Estos estudios muestran que la asociación es más significativa en colombianos (OR= 2,01 ; IC 95% 1,40-2,87 p= 0,00011) que en norteamericanos, suecos y coreanos [225].

Respecto a las manifestaciones de severidad de la enfermedad el polimorfismo no se asoció a ninguna variable seleccionada para este estudio.

Cómo podría influir STAT4 en la susceptibilidad a LES y AR? Puesto que STAT4 está involucrado en la regulación de la respuesta T_{h1} y T_{h17} y estas poblaciones celulares tienen un papel importante en la etiopatología de LES y AR, este gen podría ejercer su influencia en el LES y AR a través de una señalización alterada en esta ruta. Adicionalmente *STAT4* se encuentra aumentado en el sinovio de pacientes con AR [234].

Debido a la función de STAT4 como regulador en la respuesta de células T, lo cual lo hace ser marcador potencial para autoinmunidad, sería interesante estudiarlo con otras enfermedades autoinmunes.

7 CONCLUSIONES

- ✓ La variante alélica C1858T de *PTPN22* está fuertemente asociada con la susceptibilidad para AR y LES en población colombiana. Nuestro trabajo contribuyó al establecimiento del gen PTPN22 como un marcador de susceptibilidad para enfermedades autoinmunes. Esta es la asociación más robusta y reproducible para AR y LES fuera de los genes HLA.

- ✓ La asociación de *PTPN22* es independiente del estatus de anticuerpos y de las manifestaciones de severidad de LES y AR planteadas en este trabajo.

- ✓ Replicamos la asociación de la variante rs7574865 de *STAT4* con LES, reportada anteriormente en varias poblaciones. También se reprodujo para AR en la población del centro del país, y de la costa atlántica, siendo la más significativa.

- ✓ El alelo menor de *STAT4* no está asociado a las manifestaciones de severidad de de AR o LES ni a la producción de anticuerpos.

- ✓ El polimorfismo rs3087243 (CT60) del gen *CTLA4* factor que regula negativamente la coestimulacion del TCR, no está involucrado en el riesgo de desarrollar AR o LES en la población estudiada. Con este estudio se contribuyó al entendimiento del papel de este gen ya que es el primer estudio desarrollado en colombianos.

- ✓ PTPN22 no es un factor de riesgo para Escleroderma en la población colombiana estudiada.

8 PERSPECTIVAS

En los últimos 30 años hemos sido testigos de grandes avances en el campo de la genética humana. Desde el descubrimiento de los genes del CMH, en particular del sistema HLA, y su implicación como importantes factores de riesgo genético asociados a las EAI. Esto nos ha llevado a un mayor conocimiento de las bases genéticas que predisponen a EAI, Sin embargo, la gran parte de los genes que contribuyen a estas enfermedades están aún por descubrirse. Algunos de estos genes han sido estudiados en este trabajo y como resultado se ha podido establecer los polimorfismos 1858C →T del gen *PTPN22* y rs7574865 de *STAT4* son marcadores de susceptibilidad para AR y LES, pero no para ES. Mientras que la variante rs3087243 de *CTLA4* no parece contribuir al riesgo genético de estas enfermedades. En el campo de la epidemiologia genética los resultados de no asociación poseen un alto valor ya que ayudan a descartar posibles genes que parecen tener un papel importante en la enfermedad. La contribución de este estudio fue conocer un poco las bases genéticas de algunas EAI en población colombiana. Se replicaron asociaciones y se establecieron marcadores para AR y LES como *PTPN22* y *STAT4,* como también se descarto a *CTLA4* como factor de riesgo para AR y LES en la población estudiada, pero sería necesario desarrollar un estudio replicativo con una mayor número de casos y controles para su confirmación y poder concluir que no es un marcador de susceptibilidad en colombianos. Los estudios de asociación para identificar polimorfismos genéticos causales son más directos que los análisis de ligamiento y son útiles para detectar factores de riesgo individuales que confieren solo un riesgo moderado. Sin embargo se pueden presentar problemas como falsos positivos, falta de poder estadístico, heterogeneidad genética y clínica, por lo tanto los estudios se deben desarrollar en cohortes amplias con gran número de pacientes y controles para obtener el poder estadístico necesario para detectar asociaciones moderadas. Se deben hacer estudios de replicación en diferentes poblaciones para poder confirmar los resultados y determinar si el polimorfismo es realmente un marcador de riesgo.

Ya que las enfermedades autoinmunes son precedidas por la presencia de anticuerpos anti-CCP en el suero, la identificación de estos junto con el alelo de riesgo de PTPN22 sería de gran importancia para el diagnostico temprano de la AR.

Estudios colaborativos se hacen necesarios para obtener cohortes amplias, como los que han realizado el Consorcio Norteamericano de Artritis y otras enfermedades autoinmunes (NARAC), el sueco EIRA y el británico WTCCC, que han contribuido al entendimiento de la genética de estas enfermedades identificando polimorfismos con asociaciones robustas. Adicionalmente se debe minimizar la heterogeneidad poblacional en los estudios para que se puedan confirmar las asociaciones. Como se sabe que las enfermedades complejas, como las autoinmunes son enfermedades poligénicas por lo tanto, se deben seguir investigando otros genes que estén involucrados en los procesos biológicos anormales de dichas enfermedades. El estudio de alelos poco frecuentes, seria de mucha utilidad podrían contribuir a estas patologías ya que las variantes de riesgo estudiadas hasta ahora parecen ser comunes en la población. El estudio de asociación amplio del genoma (GWAS) también conocido como estudio de asociación de todo el genoma (WGA), se diseña para identificar asociaciones génicas con rasgos observables como la presencia o la ausencia de una enfermedad. Estos estudios permiten el rastreo de 500.000 o más SNPs. Se han utilizados gracias al proyecto HapMap. El HapMap es un bloque de haplotipos y los SNP específicos que identifican estos haplotipos, llamados SNP marcadores (*tags*). El proyecto se formó en el año 2002 y su objetivo fundamental fue examinar el genoma en relación con los fenotipos, También ha sido posible realizarlos por las nuevas técnicas de genotipificación a gran escala como microarrays, y se han utilizado para investigar el estudio de enfermedades complejas. Con estas estrategias se abre un camino, para en el futuro poder encontrar la influencia genética en la fisiopatología de la autoinmunidad.

9 REFERENCIAS

1 Biológicas CPI. Autoinmunidad y Enfermedad Autoinmune 3-287.

2 Kokuina E. De la Autoinmunidad a la Enfermedad Autoinmune. Rev Cubana Med 2001; 40: 36-40.

3 Mackay IR. Tolerance and autoimmunity BMJ 2000; 321: 93-6.

4 Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: learning self-control in the thymus. Nat Rev Immunol 2005; 5: 772-82.

5 Liu Y-J. A unified theory of central tolerance in the thymus Trends in immunology 2006; 27: 215-21.

6 Goldschneider I, Cone RE. A central role for peripheral dendritic cells in the induction of acquired thymic tolerance. Trends in Immunology 2003; 24: 77-81.

7 Matzinger P, Guerder S. Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? Nature 1989; 338: 74-6.

8 Yasutomo K, Lucas B, Germain RN. TCR Signaling for Initiation and Completion of Thymocyte Positive Selection Has Distinct Requirements for Ligand Quality and Presenting Cell Type. J Immunol 2000; 165: 3015-22.

9 Watanabe N, Wang Y-H, Lee HK, et al. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. Nature 2005; 436: 1181-5.

10 CR. M. Homing of naive, memory and effector lymphocytes Opin Immunol 1993; 5: 423-7.

11 J. Q. Anergy as a mechanism of peripheral T cell tolerance. J Immunol 1996; 156: 1325-7.

12 Greenfield EA NK, Kuchroo VK. CD28/B7 costimulation: a review. Crit Rev Immunol 1998; 18: 389.

13 MarelliBerg FM LR. Antigen presentation by parenchymal cells: a route to peripheral tolerance. Immunol Rev 1999; 172: 297.

14 Granville D CC, Hunt DWE, McManus BM. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. Lab Invest 1998; 78: 893-913.

15 Vaishnaw AK TE, Ohsako S, Drappa J, Buys S, Estrada J, et al. The spectrum of apoptotic defects and clinical manifestations, including systemic lupus erythematosus, in humans with CD95 Fas/APO1 mutations. Arthritis Rheum 1999; 42: 1833-42.

16 Asseman C, Herrath Mv. About CD4pos CD25pos regulatory cells Autoimmunity reviews 2002; 1: 190-7.

17 S S, K F, K K, T M. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. The Journal of experimental medicine 1985 161: 72-87.

18 Pacholczyk R, Kraj P, Ignatowicz L. Peptide Specificity of Thymic Selection of CD4+CD25+ T Cells. J Immunol 2002; 168: 613-20.

19 Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ T Cells Inhibit Both the Induction and Effector Function of Autoreactive T Cells and Represent a Unique Lineage of Immunoregulatory Cells. J Immunol 1998; 160: 1212-8.
20 EM S, CA P, AM T, RS. M. Control of T cell activation by CD4+CD25+ suppressor T cells. Novartis Foundation symposium 2003; 252: 24-36.
21 Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. Int Immunol 1998; 10: 1969-80.
22 Shevach EM MR, Piccirillo CA. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. Immunol Rev; 182: 58-67.
23 HL W. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. Immunol Rev 2001; 182: 207-14.
24 Moore Kw Dwmr, Coffman RL. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor Ann Rev Immunol 2001: 683-765.
25 Sanchez-Fueyo A, Weber M, Domenig C, Strom TB, Zheng XX. Tracking the Immunoregulatory Mechanisms Active During Allograft Tolerance. J Immunol 2002; 168: 2274-81.
26 Chiffoleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Soulillou J-P, Cuturi MC. Role for Thymic and Splenic Regulatory CD4+ T Cells Induced by Donor Dendritic Cells in Allograft Tolerance by LF15-0195 Treatment. J Immunol 2002; 168: 5058-69.
27 Matteson CTaEL. Genetics of Rheumatoid Arthritis. Mayo Clinic Proceding 2006; 81: 94-101.
28 Van Venrooij WJ PGC. A small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. Arthritis Res 2000; 2: 249-51.
29 Gorman JD. Smoking and Rheumatoid Arthritis: Another Reason to Just Say No. Arthritis & Rheumatism 2006; 54, No. : 10–3.
30 Angélica María Delgado-Vega 1 JM, Julio Granados 3, Juan Manuel Anaya 1. Epidemiología genética de la artritis reumatoide: ¿qué esperar de América Latina? Biomedica 2006; 26: 562-84.
31 TK. K. Epidemiology and Burden of Illnes of rheumathoid arthritis. Pharmacoeconomics 2004; 22: 1-12.
32 Arnett FC ES, Bloch DA, McShane DJ, Fries JFR..Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, ... The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1988; 31: 315-24.
33 Nancy J. Olsen MD, and C. Michael Stein, M.B., Ch.B. New Drugs for Rheumatoid Arthritis. The new england journal of medicine 2004; 350:: 2167-79.
34 Kenneth G. Saag GGT, 1 Nivedita M. Patkar,1 Jeremy Anuntiyo,2. Recommendations for the Use of Nonbiologic and Biologic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs in Rheumatoid Arthritis. Arthritis & Rheumatism 2008; 59: 762–84.
35 Ernest H.S. Choy MD, and Gabriel s. Panayi, m.d., SC.D. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. N Engl J Med, 2001; 344: 907-16.

36 Schett‡ IBMaG. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. NATURE REVIEWS 2007; 7: 429-42.
37 Hendrik Schulze-Koops MD P, Associate Professor of Clinical Immunologya, and Joachim R. Kalden MD, Professor of Internal Medicine and Director. The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 2001; 15: 677-91
38 Lubberts E, Koenders M, van den Berg W. The role of T cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. Arthritis Res Ther 2005; 7: 29 - 37.
39 Iwakura Y. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. The Journal of Clinical Investigation 2006; 116: 1218-22.
40 Luzina IG, Atamas AP, Storrer CE, et al. Spontaneous formation of germinal centers in autoimmune mice. J Leukoc Biol 2001; 70: 578 - 84.
41 Carballo OG. Anticuerpos anti-péptido cíclico Citrulinado (anti-CCP) en artritis reumatoide. Bioquimica y Patologia Clínica 2006; 69: 24-9.
42 Browning JL. B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. Nat Rev Drug Discov 2006; 5: 564-76.
43 Edwards JCW, Cambridge G. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. Nat Rev Immunol 2006; 6: 394-403.
44 arthritis cir. This is a seminal review of the balance of cytokine activities in rheumatoid arthritis. Rheumatoid arthritis 1996 85: 307–10.
45 Feldmann M, Brennan, F. M. & Maini, R. N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol 1996; 14 397–440.
46 Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science 2000; 289 1504–8.
47 Li Pea. RANK signaling is not required for TNFα-mediated increase in CD11hi osteoclast precursors but is essential for mature osteoclast formation in TNFα-mediated inflammatory arthritis J Bone Miner Res (2004). 19: 207–13.
48 Distler2 TPaO. Linking Angiogenesis to Bone Destruction in Arthritis. Arthritis & Rheumatism 2005; 52: 1346–8.
49 Matsuura E KK, Lopez LR. Atherosclerosis in autoimmune diseases. Curr Rheumatol Rep 2009; 11: 61-9.
50 Edwards SWH, M. B. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. Immunol Today 1997; 18: 320-4.
51 Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB. Mast Cells: A Cellular Link Between Autoantibodies and Inflammatory Arthritis. Science 2002; 297: 1689-92.
52 Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM. T Cell Activation in Rheumatoid Synovium Is B Cell Dependent. J Immunol 2001; 167: 4710-8.
53 Ohata Jea. Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cellactivating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines. J Immunol 2005; 174,: 864–70
54 C C Mok CSL. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. J Clin Pathol 2003; 56: 481–90.

55 Buyon JP PM, Kim MY, Kalunian KC, Grossman J, Hahn BH, et al. The effect of combined estrogen and progesterone hormone replacement therapy on disease activity in systemic lupus erythematosus: a randomized trial. Ann Intern Med 2005; 142: 953-62.
56 Adams LE MA. Role of genetic factors in drug-related autoimmunity. Lupus 1994; 3: 443-7.
57 J A James KMK, A D Farris, E Taylor-Albert, T J Lehman and J B Harley An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. The Journal of Clinical Investigation Volume 1997; 100: 3019–26.
58 Furukawa F, Kashihara-Sawami M, Lyons MB, Norris DA. Binding of Antibodies to the Extractable Nuclear Antigens SS-A/Ro and SS-B/La Is Induced on the Surface of Human Keratinocytes by Ultraviolet Light (UVL): Implications for the Pathogenesis of Photosensitive Cutaneous Lupus. J Investig Dermatol 1990; 94: 77-85.
59 Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS. Smoking and use of hair treatments in relation to risk of developing systemic lupus erythematosus. The Journal of Rheumatology 2001; 28: 2653-6.
60 PE P. The mechanism of action of L-canavanine in inducing autoimmune phenomena. Arthritis Rheum 1985; 28: 1198–200.
61 Cervera R FJ, Pare C, et al. Cardiac disease in systemic lupus erythematosus: prospective study of 70 patients. Annals of the Rheumatic Diseases 1992; 51: 156-9.
62 Anaya JM UM, Pinto LF, Matute G, Molina JF, Calle I. Nefritis Lúpica. Definición clínica, patológica y terapéutica. Revista Colombiana Reumatologia 2001 8: 61-74.
63 SE. N. Neurologic manifestations of connective tissue disease. . Neurologic Clinics 2002 20: 151-78.
64 Kotzin BL. Systemic Lupus Erythematosus. Cell 1996; 85: 303-6.
65 Kammer GM MN. Systemic lupus erythematosus in the elderly. Rheumatic diseases clinics of North America 2000; 26: 475-92.
66 Jacobson DL GS, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and Estimated Population Burden of Selected Autoimmune Diseases in the United States. Clinical Immunology and Immunopathology 1997; 84: 223-43.
67 N D Hopkinson MD, R J Powell. Clinical features and race-specific incidence/prevalence rates of systemic lupus erythematosus in a geographically complete cohort of patients. Annals of the Rheumatic Diseases 1994; 53: 675-80.
68 Molokhia M, McKeigue P. Systemic lupus erythematosus: genes versus environment in high risk populations. Lupus 2006; 15: 827-32.
69 DP. S. Frequency of lupus in people of African origin. Lupus 1995; 4.
70 Sang-Cheol B, Patricia F, Matthew HL. The epidemiology of systemic lupus erythematosus in populations of African ancestry: A critical review of the

ldquoprevalence gradient hypothesisrdquo. Arthritis & Rheumatism 1998; 41: 2091-9.

71 Weller S, Braun MC, Tan BK, et al. Human blood IgM 'memory' B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. Blood 2004; 104: 3647 - 54.

72 Bastian HM, Roseman JM, McGwin G, Jr., et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. XII. Risk factors for lupus nephritis after diagnosis. Lupus 2002; 11: 152-60.

73 Graciela S Alarcón GM, Jr., Michelle Petri, Rosalind Ramsey-Goldman, Barri J Fessler, Luis M Vilá, Jeffrey C Edberg, John D Reveille, Robert P Kimberly, and for the PROFILE Study Group. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. IX. Differences in damage accrual. Arthritis and rheumatism 2001; 44: 2797-806.

74 Pons-Estel BA, Catoggio LJ, Cardiel MH, et al. The GLADEL Multinational Latin American Prospective Inception Cohort of 1,214 Patients With Systemic Lupus Erythematosus: Ethnic and Disease Heterogeneity Among "Hispanics". Medicine 2004; 83: 1-17.

75 MC. H. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis and Rheumatism 1997; 40: 1725.

76 Ramanujam M, Davidson A. Targeting of the immune system in systemic lupus erythematosus. Expert Reviews in Molecular Medicine 2008; 10: null-null.

77 S Vasoo GHT. Theory, targets and therapy in systemic lupus erythematosus. Lupus 2005 14: 181–8.

78 Munoz LE, Gaipl US, Franz S, et al. SLE--a disease of clearance deficiency? Rheumatology 2005; 44: 1101-7.

79 E M Tan ASC, J F Fries, A T Masi, D J McShane, N F Rothfield, J G Schaller, N Talal, and R J Winchester. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982; 25: 1271–7. .

80 M H Foster BC, and M P Madaio. Nephritogenic autoantibodies in systemic lupus erythematosus: immunochemical properties, mechanisms of immune deposition, and genetic origins. Lab Invest 1993; 69: 494–507.

81 van Bruggen M, Kramers C, Walgreen B, et al. Nucleosomes and histones are present in glomerular deposits in human lupus nephritis. Nephrol Dial Transplant 1997; 12: 57-66.

82 Hahn BH. Antibodies to DNA. N Engl J Med 1998; 338: 1359-68.

83 By Judith A. James TG, R. Hal Scofield, and John B. Harley. Immunoglobulin Epitope Spreading and Autoimmune Disease After Peptide Immunization: Sm B/B'-derived PPPGMRPP and PPPGIRGP Induce Spliceosome Autoimmunity. The Journal of Experimental Medicine 1995; 181: 453.

84 Lipsky PE. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. Nat Immunol 2001; 2: 764 - 6.

85 Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, et al. Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. N Engl J Med 2003; 349: 1526-33.
86 S N Liossis BK, G Dennis, G M Kammer, and G C Tsokos. B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events. J Clin Invest 1996; 98: 2549–57. .
87 Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozeri-Chen T, Klinenberg JR. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. J Immunol 1991; 147: 117-23.
88 A C Bakke PAK, R C Kitridou, F P Quismorio, Jr, T Rea, G R Ehresmann, and D A Horwitz. T lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus. Correlations with corticosteroid therapy and disease activity. Arthritis Rheum 1983; 26: 745–50.
89 M Linker-Israeli FPQ, Jr, and D A Horwitz. CD8+ lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus sustain, rather than suppress, spontaneous polyclonal IgG production and synergize with CD4+ cells to support autoantibody synthesis. Arthritis Rheum 1990; 33: 1216–25. .
90 D Portales-Pérez RG-A, C Abud-Mendoza, and S Sánchez-Armáss. Abnormalities in CD69 expression, cytosolic pH and Ca2+ during activation of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. Lupus 1997; 6: 48–56.
91 B Fernández-Gutiérrez SdM, C Morado, C Hernández-García, A Bañares, and J A Jover. Defective early T and T-dependent B cell activation in systemic lupus erythematosus. Lupus 1998; 7: 314–22. .
92 Garrett DAHaMA. Lymphocyte reactivity to mitogens in subjects with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and scleroderma. Clin Exp Immunol 1977; 27: 92–9. .
93 Alarcón-Segovia JA-VaD. Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 1982; 69: 1388–92.
94 Warrington RJ. Interleukin-2 abnormalities in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. A role for overproduction of interleukin-2 in human autoimmunity? J Rheumatol 1988; 15: 616–20. .
95 Linker-Israeli M, Bakke AC, Kitridou RC, Gendler S, Gillis S, Horwitz DA. Defective production of interleukin 1 and interleukin 2 in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). J Immunol 1983; 130: 2651-5.
96 F J García-Cózar IJM, M J Cuadrado, M Marubayashi, J peña, and M Santamaría. Defective B7 expression on antigen-presenting cells underlying T cell activation abnormalities in systemic lupus erythematosus (SLE) patients. Clin Exp Immunol 1996; 104: 72–9.
97 Dean GS, Tyrrell-Price J, Crawley E, Isenberg DA. Cytokines and systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 2000; 59: 243-51.
98 Jara LJ IL, Ortiz MJ, Zazueta B, Bravo G, Espinoza LR. Prolactin and interleukin-6 in neuropsychiatric lupus erythematosus. Clin Rheumatol 1998; 17: 110-14.

.99 Mosmann TR CH, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 1986; 136: 2348-57.
100 Mitsuteru A, Hitoshi N, Yosuke T, et al. Th1/Th2 balance of peripheral T helper cells in systemic lupus erythematosus. Arthritis & Rheumatism 1999; 42: 1644-8.
101 Steinberg DMKaAD. Inquiry into murine and human lupus.Immunol Rev 1995; 144: 157–93. .
102 Jacob CO MH. Tumor necrosis factor-α in murine autoimmune lupus nephritis. Nature. Nature 1988; 331: 356-8.
103 Noboru S, Motohide I, Shoji M, Sakae K, Tsuyoshi S. Inhibition of FAS/FAS ligand-mediated apoptotic cell death of lymphocytes in vitro by circulating anti-FAS ligand autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. ARTHRITIS & RHEUMATISM 1998; 41: 344-53.
104 Theofilopoulos AN DF. Etiopathogenesis of murine SLE. Immunol Rev 1981; 55: 179-216.
105 Takahashi T TM, Brannan CI, et al. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the fas ligand Cell 1994; 76: 969–76.
106 McNally J, Yoo DH, Drappa J, et al. Fas ligand expression and function in systemic lupus erythematosus. J Immunol 1997; 159: 4628-36.
107 Jianguo Wu JW, ‡ Jin He,* Lianbin Xiang,‡ Peter H. Schur,§ and John D. Mountz*. Fas Ligand Mutation in a Patient with Systemic Lupus Erythematosus and Lymphoproliferative Disease. J Clin Invest 1996; 98: 1107–13.
108 Martin H, Reinhard EV, Otmar MZ, Manuela H, Botond BP, Joachim RK. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis & Rheumatism 1998; 41: 1241-50.
109 Walport MJ DK, Botto M. C1q and systemic lupus erythematosus. Immunobiology 1998; 199: 265–85.
110 Marina Botto1 CDA, Anne E. Bygrave1, E. Mary Thompson2, H. Terence Cook3, Franz Petry4, Michael Loos4, Pier Paolo Pandolfi5 & Mark J. Walport1, 6. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. Nature Genetics 1998; 19: 56 - 9.
111 Sheriff A GU, Voll RE, Kalden JR, Herrmann M. Apoptosis and systemic lupus erythematosus. Rheum Dis Clin North Am 2004; 30: 505-27.
112 Ramos-Casals M CM, Chamorro A, et al. Hypocomplementemia in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome: prevalence and clinical significance in 667 patients. Lupus 2004; 13: 777-83.
113 Carroll MC. A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus. Nat Rev Immunol 2004; 4: 825-31.
114 Salmon JE MS, Schachter LA, et al. Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. J Clin Invest 1996; 97: 1348-54.

115 Harry RK, Marion K, Anton JGS, et al. T <I>FcgammaRIIIA-158F</I> allele is a risk factor for systemic lupus erythematosus. Arthritis & Rheumatism 1998; 41: 1813-8.
116 Filaci G, Bacilieri S, Fravega M, et al. Impairment of CD8+ T Suppressor Cell Function in Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus. J Immunol 2001; 166: 6452-7.
117 Pravitt G, Filemon KT, Shervin A, et al. Association of the <I>PTPN22</I> R620W polymorphism with anti-topoisomerase I- and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis. Arthritis & Rheumatism 2006; 54: 3945-53.
118 MaÃ®tre A, Hours M, Bonneterre V, et al. Systemic sclerosis and occupational risk factors: role of solvents and cleaning products. The Journal of Rheumatology 2004; 31: 2395-401.
119 Bovenzi M, Barbone F, Pisa F, et al. A case–control study of occupational exposures and systemic sclerosis. International Archives of Occupational and Environmental Health 2004; 77: 10-6.
120 FJ. DBG. Manual de las Enfermedades Reumáticas. Ed Médica panamericana, 2004: 120-32.
121 Sakkas LI CI, Platsoucas CD. Mechanisms of Disease: the role of immune cells in the pathogenesis of systemic sclerosis. Nat Clin Pract Rheumatol 2006; 2: 679-85.
122 Fredy Orlando Guevara Pulido MEDC. Escleroderma. Acta Med Colomb 2006; 32: 83-91.
123 Herrick AL MCM. The emerging problem of oxidative stress and the role of antioxidants in systemic sclerosis. Clin Exp Rheumatol 2001; 19: 4-8.
124 Kahaleh MB. Raynaud phenomenon and the vascular disease in scleroderma. Current Opinion in Rheumatology 2004; 16: 718-22.
125 Kahaleh MB LE. Autoimmunity and vascular involvement in systemic sclerosis (SSc). Autoimmunity 1999; 31: 195-214.
126 Roswitha S, Matthias SG, Guenther B, Norbert S, Johann G, Georg W. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. Arthritis & Rheumatism 2000; 43: 2550-62.
127 Nicoletta Del P, Gualtiero C, Nicola F, et al. Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. ARTHRITIS & RHEUMATISM 2004; 50: 1296-304.
128 Kuwana M OY, Yasuoka H, Kawakami Y, Ikeda Y. Defective vasculogenesis in systemic sclerosis. The Lancet 2004; 364: 603 - 10.
129 Sergei PA, Barbara W. Cytokine regulation of pulmonary fibrosis in scleroderma. Cytokine & Growth Factor Reviews 2003; 14: 537-50.
130 Cepeda EJ, Reveille JD. Autoantibodies in systemic sclerosis and fibrosing syndromes: clinical indications and relevance. Current Opinion in Rheumatology 2004; 16: 723-32.
131 Riccieri V, Parisi G, Spadaro A, et al. Reduced circulating natural killer T cells and gamma/delta T cells in patients with systemic sclerosis. The Journal of Rheumatology 2005; 32: 283-6.

132 Shinichi Sato, a, Manabu Fujimotob, Minoru Hasegawaa, Kazuhiko Takeharaa and Thomas F. Tedderc. Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis Molecular Immunology 12; 41: 1123-33
133 Hamamdzic D, Kasman LM, LeRoy EC. The role of infectious agents in the pathogenesis of systemic sclerosis. Current Opinion in Rheumatology 2002; 14: 694-8.
134 Abraham DJ VJ. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models TRENDS in Immunology 26.
135 Lazaros IS, Chris DP. Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? Arthritis & Rheumatism 2004; 50: 1721-33.
136 Prescott RJ FA, Jones CJP, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. J Pathol 1992; 166: 255–63.–63.
137 Fleischmajer R PJ, Reeves JR. Cellular infiltration in scleroderma skin. Arthritis Rheum 1977; 20: 975–84.
138 Wells AU, Lorimer S, Majumdar S, et al. Fibrosing alveolitis in systemic sclerosis: increase in memory T-cells in lung interstitium. Eur Respir J 1995; 8: 266-71.
139 Kuwana M MT, Wright TM. T and B collaboration is essential for the autoantibody response to DNA topoisomerase I in systemic sclerosis. J Immunol 1995; 155: 2703–14.
140 Arden B CS, Kabelitz D, Mak TW. Human T cell receptor variable gene segment families. Immunogenetics 1995; 42: 455–500.
141 Rowen L KB, Hood L. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human T cell receptor locus. Science 1996; 272: 1755–62
142 RH. S. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. Science 1990; 248: 1349–56.
143 Albanesi C, Scarponi C, Cavani A, Federici M, Nasorri F, Girolomoni G. Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma and interleukin-4 induced activation of human keratinocytes. J Invest Dermatol 2000; 115: 81 - 7.
144 Kurasawa K, Hirose K, Sano H, et al. Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum 2000; 43: 2455 - 63.
145 Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. J Exp Med 1996; 183: 2593 - 603.
146 E G Nabel LS, V J Pompili, Z Y Yang, H San, H B Shu, S Liptay, L Gold, D Gordon, R Derynck , et al. Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. Proc Natl Acad Sci U S A ;: 1993; 90: 10759–63.
147 Melanie AS. The role of STAT6 in mast cell IL-4 production. Immunological Reviews 2001; 179: 48-56.

148 Y Wegrowski VP, P Gillery, B Kalis, A Randoux, and F X Maquart. Stimulation of sulphated glycosaminoglycan and decorin production in adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin-4. Biochem J 1995; 30: 673-8.

149 Fertin C NJ, Gillery P, Kalis B, Banchereau J, Marquart FX. Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. Cell Mol Biol 37 1991; 37: 823-9.

150 Postlethwaite AE HM, Katai H, Raghow R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. J Clin Invest 1992; 90: 1479-85.

151 Sempowski GD DS, Phipps RP. Interleukin-4 and interferon-y discordantly regulate collagen biosynthesis by functionally distinct lung fibroblast subsets. J Cell Physiol 1996; 167: 290-6.

152 S A Jimenez BFaJR. Selective inhibition of human diploid fibroblast collagen synthesis by interferons. J Clin Invest 1984; 74: 1112-6

153 Seder RA, Marth T, Sieve MC, et al. Factors Involved in the Differentiation of TGF-{beta}-Producing Cells from Naive CD4+ T Cells: IL-4 and IFN-{gamma} Have Opposing Effects, While TGF-{beta} Positively Regulates Its Own Production. J Immunol 1998; 160: 5719-28.

154 McGaha T, Saito S, Phelps RG, et al. Lack of Skin Fibrosis in Tight Skin (TSK) Mice with Targeted Mutation in the Interleukin-4R[alpha] and Transforming Growth Factor-[beta] Genes. 2001; 116: 136-43.

155 Akio Yamakage KK, Edwin A. Smith, E. Carwile LeRoy, and Maria Trojanowska. Selective upregulation of platelet-derived growth factor alpha receptors by transforming growth factor beta in scleroderma fibroblasts. Exp Med 1992; 175: 1227–34.

156 Falanga V GC, Dasch JR, Takehara K, Ksander GA. Skin distribution and differential expression of transforming growth factor beta 1 and beta 2. J Dermatol Sci 1 1992; 3: 131-6.

157 John V. Scleroderma and Smads: Dysfunctional Smad family dynamics culminating in fibrosis. Arthritis & Rheumatism 2002; 46: 1703-13.

158 Hironobu I, Kenichi Y, Masahide K, Kunihiko T. Blockade of endogenous transforming growth factor beta signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: Association with increased expression of transforming growth factor beta receptors. Arthritis & Rheumatism 2001; 44: 474-80.

159 Masahide K, Hironobu I, Kenichi Y, Kunihiko T. Up-regulated expression of transforming growth factor beta receptors in dermal fibroblasts in skin sections from patients with localized scleroderma. Arthritis & Rheumatism 2001; 44: 731-4.

160 inhibitor. teocam. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. EMBO J July; 6(7): 1987; 6.

161 Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin (IL)-6 Directs the Differentiation of IL-4-producing CD4+ T Cells. J Exp Med 1997; 185: 461-70.
162 C S Hsieh ABH, J S Gold, A O'Garra, and K M Murphy. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 6065–9.
163 Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. J Immunol 1995; 154: 5071-9.
164 By Brigitta Stockinger TZ, * Anna Zal,* and David Grays. B cells solicit their own help from T cells J Exp Med 1996; 183: 891-9.
165 D. M. The role of B cells in the programming of T cells for IL-4 synthesis J Exp Med 1996; 183: 717- 9.
166 Skok J, Poudrier J, Gray D. Dendritic Cell-Derived IL-12 Promotes B Cell Induction of Th2 Differentiation: A Feedback Regulation of Th1 Development. J Immunol 1999; 163: 4284-91.
167 Snapper CM WW, Beernink H, Dasch JR. Transforming growth factor-beta 1 is required for secretion of IgG of all subclasses by LPS-activated murine B cells in vitro. J Immunol 1993; 151: 4625—36.
168 Frazier K WS, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. J Invest Dermatol 1996 107: 404-11.
169 Lee CG HR, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Koteliansky V, et al. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). J Exp Med 2001; 194: 809—21.
170 Gharaee-Kermani M DE, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. J Biol Chem 1996; 271: 17779—84.
171 Minoru H, Manabu F, Kazuhiko T, Shinichi S. Pathogenesis of systemic sclerosis: Altered B cell function is the key linking systemic autoimmunity and tissue fibrosis. Journal of dermatological science 2005; 39: 1-7.
172 BP. T. The genetics of human systemic lupus erythematosus Trends Immunol 2003; 24: 595-602.
173 Invernizzi P, Gershwin ME. The genetics of human autoimmune disease. Journal of Autoimmunity; In Press, Corrected Proof.
174 Consortium* MotCT. The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view. Nat Rev Genet 2003; 4: 911–6.
175 Cordell HJ CD. Genetic association studies. Lancet 2005; 366: 1121-31.
176 CornÃ©lis Fo, FaurÃ© S, Martinez M, et al. New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1998; 95: 10746-50.

177 Gudmundur A. Thorisson, 2,3 Albert V. Smith,1,2 Lalitha Krishnan,1 and Lincoln D. Stein1. The International HapMap Project Web site. Genome Res 2005; 15: 1592-3.
178 Kane LP LJ, Weiss A. Signal transduction by the TCR for antigen. Current Opinion in Immunology 2000; 12: 242-9.
179 Andre EN. T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: Signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. The Journal of allergy and clinical immunology 2002; 109: 758-70.
180 Andre EN, Ndaisha S. T-cell activation through the antigen receptor. Part 2: Role of signaling cascades in T-cell differentiation, anergy, immune senescence, and development of immunotherapy. The Journal of allergy and clinical immunology 2002; 109: 901-15.
181 Cohen S DH, Shaoul E, Sharfe N, Roifman CM. Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, lyp. Blood 1999; 93: 2013-24. 182 Cloutier JF VA. Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase. J Exp Med 1999; 189: 111-21.
183 Gregersen PK, Behrens TW. Genetics of autoimmune diseases [mdash] disorders of immune homeostasis. Nat Rev Genet 2006; 7: 917-28.
184 Bottini N ML, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. Nat Genet 2004; 36: 337-8.
185 Siminovitch KA. PTPN22 and autoimmune disease. Nature Genetics 2004; 1038 ng1204-48.
186 Waterhouse P PJ, Timms E. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. Science 1995; 270: 985-8.
187 Chambers CA ST, Allison JP. Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells. Immunity 1997; 7: 885-95.
188 Dariavach P MM, Golstein P. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. Eur J Immunol 1988; 18: 1901-5.
189 Harper K BC, Rouvier E. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. J Immunol 1991; 147: 1037-44.
190 Polymeropoulos MH XH, Rath DS. Dinucleotide repeat polymorphism at the human CTLA4 gene. Nucleic Acids Res 1991; 19: 4018.
191 Larsen ZM KO, Mato E. IDDM12 (CTLA4) on 2q33 and IDDM13 on 2q34 in genetic susceptibility to type 1 diabetes (insulin-dependent). Autoimmunity 1999; 31: 35-42.

192 Nistico L BR, Pritchard LE. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Hum Mol Genet 1996; 5: 1075-80.
193 Thompson CB AJ. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. Immunity 1997; 7: 445-50.
194 Liu M-F. Chinese patients with systemic CTLA-4 gene polymorphism in promoter and exon-1 regions in lupus erythematosus Lupus 2001; 10: 647-9.
195 Oaks MK HK. A soluble form of CTLA-4 in patients with autoimmune thyroid disease. J Immunol 2000; 164: 5015-8.
196 Watford WT HB, Bream JH, Kanno Y, Muul L, O'Shea JJ. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. Immunol Rev 2004; 202: 139-56.
197 Morinobu A GM, Strober W. STAT4 serine phosphorylation is critical for IL-12-induced IFN-gamma production but not for cell proliferation. Proc Natl Acad Sci; 99: 12281-6.
198 Nishikomori R UT, Wu CY, Morinobu A, O'Shea JJ, Strober W. Activated STAT4 has an essential role in Th1 differentiation and proliferation that is independent of its role in the aintenance of IL-12R beta 2 chain expression and signaling. J Immunol 2002; 169: 4388-98.
199 Mathur AN CH, Zisoulis DG. Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. J Immunol 2007; 178: 4901-7.
200 Klinman DM GI, Klaschik S, Dong L, Currie D, Shirota H. Therapeutic potential of oligonucleotides expressing immunosuppressive TTAGGG motifs. Ann N Y Acad Sci 2005; 1058: 87-95.
201 Hildner KM SP, Atreya I. Targeting of the transcription factor STAT4 by antisense phosphorothioate oligonucleotides suppresses collagen induced arthritis. J Immunol 2007; 178: 3427-36.
202 Ann B. Begovich VEHC, Lee A. Honigberg, Steven J. Schrodi, Anand P. Chokkalingam, Heather C. Alexander, Kristin G. Ardlie, Qiqing Huang, Ashley M. Smith, Jill M. Spoerke, Marion T. Conn, Monica Chang, Sheng-Yung P. Chang, Randall K. Saiki, Joseph J. Catanese, Diane U. Leong, Veronica E. Garcia, Linda B. McAllister, Douglas A. Jeffery, Annette T. Lee, Franak Batliwalla, Elaine Remmers, Lindsey A. Criswell, Michael F. Seldin, Daniel L. Kastner, Christopher I. Amos, John J. Sninsky, Peter K. Gregersen. A Missense Single-Nucleotide Polymorphism in a Gene Encoding a Protein Tyrosine Phosphatase (PTPN22) Is Associated with Rheumatoid Arthritis The American Journal of Human Genetics 2004 75: 330-7.
203 Gisela O, Elena S, Miguel AG-G, et al. Association of a functional single-nucleotide polymorphism of <I>PTPN22</I>, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Arthritis & Rheumatism 2005; 52: 219-24.
204 Criswell LA, Pfeiffer KA, Lum RF, et al. Analysis of Families in the Multiple Autoimmune Disease Genetics Consortium (MADGC) Collection: the PTPN22

620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes. Am J Hum Genet 2005; 76: 561 - 71.

205 Victoria E.H. Carlton XH, Anand P. Chokkalingam, Steven J. Schrodi, Rhonda Brandon, Heather C. Alexander, Monica Chang, Joseph J. Catanese, Diane U. Leong, Kristin G. Ardlie, Daniel L. Kastner, Michael F. Seldin, Lindsey A. Criswell, Peter K. Gregersen, Ellen Beasley, Glenys Thomson, Christopher I. Amos, Ann B. Begovich. PTPN22 Genetic Variation: Evidence for Multiple Variants Associated with Rheumatoid Arthritis The American Journal of Human Genetics 2005; 77: 567-81.

206 Gomez LM, Anaya JM, Gonzalez CI, et al. PTPN22 C1858T polymorphism in Colombian patients with autoimmune diseases. Genes Immun 2005; 6: 628 - 31.

207 Lee YH, Rho YH, Choi SJ, et al. The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune diseases--a meta-analysis. Rheumatology 2007; 46: 49-56.

208 Velaga MR, Wilson V, Jennings CE, et al. The Codon 620 Tryptophan Allele of the Lymphoid Tyrosine Phosphatase (LYP) Gene Is a Major Determinant of Graves' Disease. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 5862-5.

209 Anne H, Anne B, Sally J, et al. Association between the <I>PTPN22</I> gene and rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis in a UK population: Further support that <I>PTPN22</I> is an autoimmunity gene. Arthritis & Rheumatism 2005; 52: 1694-9.

210 Claire V, Claire C, Matthieu G, et al. Association of the PTPN22*R620W polymorphism with autoimmune myasthenia gravis. Annals of Neurology 2006; 59: 404-7.

211 Anna L, Orazio P, Maria Rosa V, et al. Evaluating the role of the genetic variations of <I>PTPN22</I>, <I>NFKB1</I>, and <I>FcGRIIIA</I> genes in inflammatory bowel disease: A meta-analysis. Inflammatory Bowel Diseases 2007; 13: 1212-9.

212 Zhernakova A, Eerligh P, Wijmenga C, Barrera P, Roep BO, Koeleman BP. Differential association of the PTPN22 coding variant with autoimmune diseases in a Dutch population. Genes Immun 2005; 6: 459 - 61.

213 Matesanz F, Rueda B, Orozco G, et al. Protein tyrosine phosphatase gene (PTPN22) polymorphism in multiple sclerosis. Journal of Neurology 2005; 252: 994-5.

214 Gregersen PK. Gaining insight into PTPN22 and autoimmunity. Nature Genetics 2005; 37: 1300-1.

215 Rieck M, Arechiga A, Onengut-Gumuscu S, Greenbaum C, Concannon P, Buckner JH. Genetic Variation in PTPN22 Corresponds to Altered Function of T and B Lymphocytes. J Immunol 2007; 179: 4704-10.

216 Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R, Yamamoto K. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. J Hum Genet 2005; 50: 264-6.

217 Griffin MD HD, Holman PO. Blockade of T cell activation using a surface-linked single-chain antibody to CTLA-4 (CD152). J Immunol; 164: 4433-42.
218 Khattri R AJ, Griffin MD. Lymphoproliferative disorder in CTLA-4 knockout mice is characterized by CD28-regulated activation of Th2 responses. J Immunol 1999; 162: 5784-91.
219 Masteller EL CE, Mullen AC. Structural analysis of CTLA- 4 function in vivo. J Immunol 2000; 164: 5319-27.
220 Stephen CLG, Lucy SKW, David MS. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. Immunological Reviews 2005; 204: 102-15.
221 Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80: 41-5.
222 Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet 1996; 5: 1075-80.
223 Ueda H, Howson JMM, Esposito L, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. Nature 2003; 423: 506-11.
224 Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, et al. Replication of Putative Candidate-Gene Associations with Rheumatoid Arthritis in >4,000 Samples from North America and Sweden: Association of Susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. Am J Hum Genet 2005; 77: 1044 - 60.
225 Anne B, Francine J, Stephen E, et al. Haplotype analysis in simplex families and novel analytic approaches in a case-control cohort reveal no evidence of association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheumatism 2004; 50: 748-52.
226 G. Orozco BTAN-RMFG-EJM. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4-CT60 polymorphism in rheumatoid arthritis. Tissue Antigens 2004; 64: 667-70.
227 Belén T, Francisco A, Ernesto F, et al. Association of the CT60 marker of the <I>CTLA4</I> gene with systemic lupus erythematosus. Arthritis & Rheumatism 2004; 50: 2211-5.
228 Amos CI, Chen WV, Lee A, et al. High-density SNP analysis of 642 Caucasian families with rheumatoid arthritis identifies two new linkage regions on 11p12 and 2q33. Genes Immun 2006; 7: 277-86.
229 Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, et al. STAT4 and the Risk of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. N Engl J Med 2007; 357: 977-86.
230 Gisela O, Behrooz ZA, Angélica MD-V, et al. Association of <I>STAT4</I> with rheumatoid arthritis: A replication study in three European populations. Arthritis & Rheumatism 2008; 58: 1974-80.
231 Aya Kawasaki1 II, Koki Hikami1, Jun Ohashi1, Taichi Hayashi2, Daisuke Goto2, Isao Matsumoto2, Satoshi Ito2, Akito Tsutsumi2,3, Minori Koga4, Tadao Arinami4, Robert R Graham5, Geoffrey Hom5, Yoshinari Takasaki6, Hiroshi Hashimoto6, Timothy W Behrens5, Takayuki Sumida2 and Naoyuki Tsuchiya1.

Role of STAT4 polymorphisms in systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study of the STAT1-STAT4 region. Arthritis Research & Therapy 2008; 10.

232 Taylor KE, Remmers EF, Lee AT, et al. Specificity of the <italic>STAT4</italic> Genetic Association for Severe Disease Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. PLoS Genet 2008; 4: e1000084.

233 Palomino-Morales R, Rojas-Villarraga A, Gonzalez C, Ramırez G, Anaya J-M, Martın J. STAT4 but not TRAF1/C5 variants influence the risk of developing rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Colombians. Genes and Immunity 2008; 9: 379–82.

234 Walker JG, Ahern MJ, Coleman M, et al. Expression of Jak3, STAT1, STAT4, and STAT6 in inflammatory arthritis: unique Jak3 and STAT4 expression in dendritic cells in seropositive rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2006; 65: 149-56.