



PROGRAMA PARA LA FORMACIÓN BIOMÉDICA - PRO.IN.BIO

MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

“Asociación entre polimorfismos del codón 72 de TP53 y desarrollo de lupus eritematoso sistémico en la población uruguaya”

Dra. Carolina Diaz Cuña

Directora Académica: Dra. Nora Artagaveytia

Tutora de Especialidad: Dra. Sandra Consani

Centro de Investigación donde se realizó el proyecto: Hospital Maciel, Hospital De Clínicas. Montevideo, Uruguay.

Escuela de Graduados - Facultad de Medicina

ABREVIATURAS:

LES: Lupus eritematoso sistémico

EAS: Enfermedad autoinmune sistémica

AR: Artritis reumatoide

SS: Síndrome de Sjögren

SAF: Síndrome de anticuerpos antifosfolípidos

ES: Esclerosis sistémica

EMTC: Enfermedad mixta del tejido conectivo

AAF: Anticuerpos antifosfolipídicos

NL: Nefritis lúpica

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

LT: Linfocito T

LB: Linfocito B

ANA: anticuerpos anti-nucleocitoplasma

Anti-ENA: anticuerpos anti-antígeno nuclear extraíble

Anti-RNP: anti-ribonucleoproteína

Anti-sm: anti-smith

GC: Glucocorticoides

IS: Inmunosupresores

IC: Inmunocomplejos

LCA: Lupus cutáneo agudo

LCC: Lupus cutáneo crónico

LSCA: Lupus cutáneo subagudo

SLEDAI: score de actividad de la enfermedad

SLICC/ACR (SDI): score de daño de la enfermedad. Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus

PCR-RFLP: Reacción en cadena de polimerasa por restricción de fragmento

Equilibrio de HWE: equilibrio de Hardy-Weinberg

ÍNDICE:

-Resumen	Página 5
-Introducción	Página 6
-Descripción del problema de investigación e Hipótesis.....	Página 50
-Objetivos	Página 51
-Metodología	Página 51
-Resultados	Página 57
-Discusión	Página 70
-Conclusiones	Página 76
-Perspectivas futuras	Página 76
-Bibliografía	Página 77
-Anexos	Página 84

RESUMEN:

Introducción: La apoptosis juega un rol primordial en la patogenia del LES, siendo el gen TP53 un regulador clave. Son controversiales los estudios relacionados al polimorfismo del codón 72 de TP53 y el riesgo de desarrollo de LES.

Objetivos: valorar la asociación entre polimorfismo del codón 72 de TP53 y el desarrollo de LES en la población uruguaya. Poner a punto la técnica PCR-RFLP. Describir características de la población, frecuencia del polimorfismo, correlacionar hallazgos moleculares con fenotipo clínico. Valorar relación entre polimorfismo y actividad/daño acumulado.

Metodología: Estudio caso-control desarrollado entre junio 2018-diciembre 2020. El polimorfismo fue realizado por PCR-RFLP.

Resultados: se incluyeron 45 lúpicos y 46 controles. Características de los controles: edad 36,2 años +/-16,4; mujeres 87%. Los lúpicos presentaron: edad 46,8 +/- 14,1; mujeres un 95,6%. Los solapamientos más frecuentes fueron: LES-SAF 27%, LES-AR 7%, LES-SS 7%. Se destacaron como manifestaciones clínicas en orden de frecuencia: 95% cutáneas (LCA 75%, LCC 7,5%, LCSA 2,5%); articulares 82%; hematológicas 62%; renales 36%; serositis 24%; neuropsiquiátricas 24%; trombosis 18%; miocarditis 11%; y un 2% endocarditis trombótica no bacteriana.

Fenotipo Serológico: dentro de los patrones del ANA se evidenció: 45,7% patron homogéneo; 37,1% nuclear puntillado; 8,6% moteado; 5,7% nucleolar y 2,9% citoplasmático. Dentro de los anti-ENA predominó con un 72,7% el anti-DNA, seguido del anti-Ro con 33,3%. Los anti-La, anti-nucleosoma, anti-histonas presentaron un 13%; 6,7% para anti-RNP; 4,5% anti-Smith, y 2% para el anti-centrómero. Los anti-fosfolípidos mostraron una frecuencia de 48,8%, el 24% presentó triple positividad. Hubo un 73% con hipocomplementemia, a predominio de C3. El polimorfismo se encontró en equilibrio de HWE. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre frecuencias genotípicas entre casos y controles. Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las manifestaciones cutáneo-mucosas y el genotipo pro/arg (p 0,044) OR 2.867(1.906-4.312); el LCA y el genotipo arg/arg (p 0,016) OR 0.111(0.012-0.989), pro/arg (p 0,002) OR 1.765(1.291-2.413); así como con el LCA y alelo pro (p 0,016) OR 9.0 (1.011-80.130). No se encontraron otras asociaciones estadísticamente significativas entre polimorfismo y fenotipo clínico, así como tampoco con la actividad de la enfermedad ni el daño acumulado.

Conclusiones: Nuestros hallazgos sugieren una predominancia del alelo arg en la población uruguaya así como una mayor proporción del genotipo arg/arg en las pacientes lúpicas, lo cual podría estar asociado a un mayor riesgo de desarrollo de LES. El genotipo arg/pro y el alelo pro serían de riesgo para el desarrollo de LCA, siendo el arg/arg protector.

INTRODUCCIÓN:

LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO:

1) Generalidades:

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad inflamatoria crónica, multisistémica, de etiología desconocida y patogenia autoinmune. Se considera el prototipo de enfermedad autoinmune sistémica (EAS). Presenta una gran heterogeneidad en su presentación clínica, lo cual lleva a inmensos desafíos en el diagnóstico y tratamiento.¹

La incidencia varía entre 0,3 y 31,5 casos por 100.000 individuos por año en el mundo y ha aumentado en los últimos 40 años, probablemente debido a un mayor conocimiento de la enfermedad. La prevalencia a nivel mundial es de 20 a 150 casos cada 100.000 habitantes.² En Uruguay, si bien existe algún reporte departamental, no se dispone de datos como país de incidencia y prevalencia.

La ancestría y los factores raciales presentan un impacto importante en la frecuencia y características del LES. Poblaciones afroamericanas, asiáticas e hispanas, presentan mayor prevalencia y tienden a desarrollar LES a edades más tempranas, con mayor actividad, severidad y mortalidad que en otras poblaciones.³⁻⁵

El LES es más frecuente en mujeres en edad fértil, con una relación mujer hombre de 9:1, si bien puede presentarse a cualquier edad.⁶

La historia natural de la enfermedad se desarrolla en 3 fases. La **etapa preclínica**, se inicia por los factores predisponentes (genética, ambiente) los cuales determinan una desregulación del sistema inmune con formación de autoanticuerpos. Posteriormente se desarrolla inflamación que se perpetúa en el tiempo, generando compromiso orgánico, dando inicio a la **etapa clínica**, la cual puede presentar brotes que llevan a compromiso orgánico adicional y daño orgánico acumulado. Por último, ocurre la **etapa de comorbilidades** siendo las infecciones, los eventos cardiovasculares y las neoplasias las que determinan gran parte de la mortalidad de estos pacientes.⁷ (Figura 1)

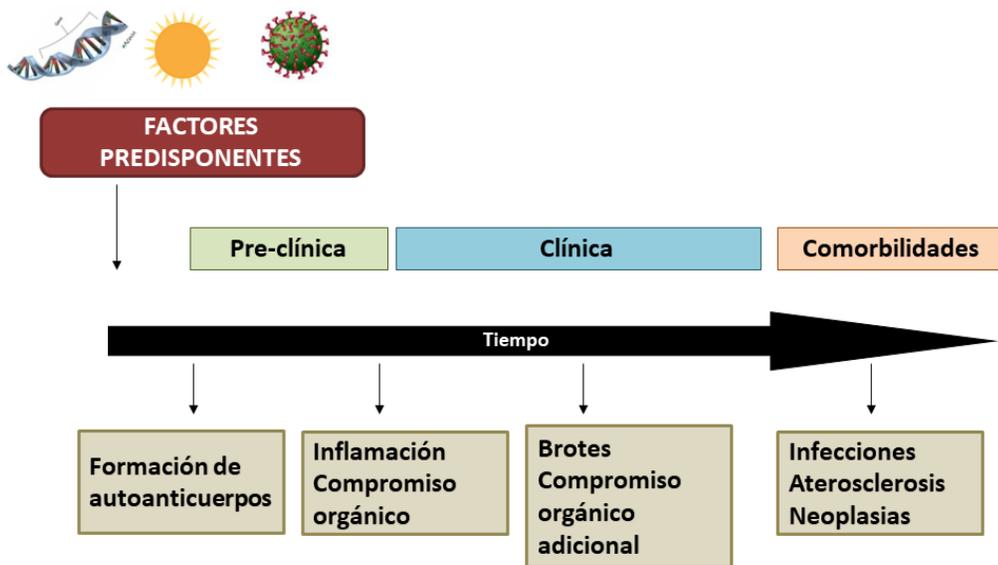


Figura 1. Etapas en la evolución del LES.

Estudios iniciales sobre los distintos patrones de actividad de la enfermedad a lo largo del tiempo, definen tres subgrupos diferentes de pacientes: inactivo prolongado, remitente-recurrente y crónicamente activo.⁸ Si bien algunos estudios refieren al patrón de enfermedad crónicamente activa como la más frecuente, un estudio realizado por Tselios, et al.⁹ muestra que aproximadamente el 70% de los pacientes con LES siguieron un curso remitente-recurrente, mientras que el 15% mostró una remisión prolongada y otro 15% un curso persistentemente activo.

La mortalidad por LES ha tenido una gran disminución a lo largo del tiempo, siendo aproximadamente un 50% en la era pre-corticoidea, situándose hoy en día entre el 5-15% en el curso de la evolución de la enfermedad.⁵

2) Manifestaciones clínicas de LES:

El LES presenta una gran heterogeneidad lo cual lleva a una amplia variedad de fenotipos clínicos. Estos pueden ir desde una enfermedad leve con afectación únicamente cutáneo-mucosa o articular, hasta una enfermedad muy severa con compromiso renal o neurológico. Se abordarán las principales manifestaciones de la enfermedad.

El **compromiso articular** es muy frecuente presentándose en hasta el 95%, puede llevar a grandes alteraciones del estilo de vida. Se manifiesta como una poliartritis inflamatoria, simétrica y no erosiva, que afecta predominantemente las pequeñas y medianas articulaciones. En ocasiones se puede evidenciar la artropatía de Jaccoud, la cual se caracteriza por ser más

severa, presentarse a mayor duración de la enfermedad, y originar deformaciones similares a la Artritis Reumatoide (AR) pero reductibles.¹⁰

Las manifestaciones **cutáneo-mucosas** son la segunda manifestación clínica más frecuente, ocurriendo en el 80% de los pacientes. Se describen lesiones cutáneo-mucosas específicas e inespecíficas de lupus.

Las lesiones cutáneas específicas como el lupus cutáneo, puede manifestarse únicamente en la piel o ser parte de un lupus sistémico. Se clasifican en: Lupus cutáneo agudo (LCA), Lupus cutáneo subagudo (LCSA) y lupus cutáneo crónico (LCC). La evolución a un LES es en el 95, 50 y 15% de los casos respectivamente.¹¹

Las lesiones inespecíficas de lupus son heterogéneas, se destacan la fotosensibilidad, alopecia, úlceras, urticaria, entre otras.¹² (Tabla 1)

Lesiones específicas	Lesiones inespecíficas
Agudas: <ul style="list-style-type: none"> - Eritema malar en vespertilio - Lesiones eritematosas generalizadas (dermatitis lúpica fotosensible) - Lupus ampoloso 	Piel: <ul style="list-style-type: none"> - Fotosensibilidad - Telangiectasias - Livedo reticularis - Vasculitis - Nódulos subcutáneos - Urticaria
Subagudas: <ul style="list-style-type: none"> - Lupus anular policíclico - Lupus psoriasiforme 	Mucosas: <ul style="list-style-type: none"> - Úlceras orofaríngeas - Úlceras genitales
Crónicas: <ul style="list-style-type: none"> - Lupus discoide clásico <ul style="list-style-type: none"> ✓ Localizado ✓ Generalizado - Lupus discoide hipertrófico - Lupus profundo (paniculitis lúpica) - Lupus pernio 	Faneras: <ul style="list-style-type: none"> - Alopecia difusa - Pelo lúpico (alopecia frontal) - Eritema (telangiectasia) periungueal - Distrofia ungueal

Tabla 1. Lesiones específicas e inespecíficas de lupus cutáneo-mucoso.¹³

Las **manifestaciones hematológicas** en el LES son frecuentes y pueden deberse a la propia enfermedad o a los tratamientos inmunosupresores utilizados. La anemia está presente en más del 50% de los casos. Puede deberse a inflamación crónica, deficiencia de hierro, anemia hemolítica autoinmune y anemia microangiopática, esta última mayoritariamente asociada al síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAF). La leucopenia secundaria a neutropenia o

linfopenia también es frecuente y puede ser en algunos casos grave. Las causas de neutropenia en estos pacientes pueden deberse a la propia actividad de la enfermedad, infecciones, o a los fármacos utilizados. La linfopenia es otra manifestación hematológica frecuente. Un estudio que valoró 158 pacientes lúpicos con enfermedad activa demostró que la linfopenia estaba presente en el 75% de los casos al momento del diagnóstico.¹⁴⁻¹⁵ La trombocitopenia en el LES presenta una frecuencia entre 7-30%, puede ir de leve a severa. Las causas de la misma pueden ser: trombocitopenia inmune, microangiopatía trombótica o secundaria a fármacos. La pancitopenia no es infrecuente, hay varias causas potenciales de pancitopenia: fármacos, destrucción periférica, mielofibrosis autoinmune y causas poco frecuentes pero graves como el síndrome de activación macrofágica.¹⁵

La trombosis es causa importante de morbi-mortalidad en pacientes con LES. En un estudio de cohorte prospectivo con seguimiento a 10 años realizado por Cervera y col. la trombosis fue la segunda causa de muerte más frecuente.¹⁶ Si bien el mayor riesgo de trombosis en LES se explica por la presencia de anticuerpos antifosfolípidicos (AAF), se ha evidenciado que incluso en ausencia de estos el riesgo trombótico es mayor que en la población general. Las complicaciones trombóticas se pueden hallar en más de un 10% de los pacientes y este riesgo aumenta a más del 50% en pacientes con anticoagulante lúpico positivo.¹⁵

Manifestaciones renales, la nefritis lúpica (NL) es una glomerulopatía frecuente en el LES, encontrándose en un 28% en el Euro- lupus Project.¹⁷ La prevalencia en Latinoamérica y EE.UU es más elevada que en otras regiones del mundo, probablemente debido a las diferencias raciales existentes. La NL lleva a un aumento de mortalidad en los pacientes. Un estudio que comparó pacientes con NL y sin NL con un seguimiento a 10 años, se observó una supervivencia de 88% y 94% respectivamente. La NL se clasifica en 6 tipos histológicos distintos que difieren en manifestaciones clínicas, severidad, tratamiento y pronóstico.¹⁸ Otras manifestaciones renales pueden incluir la microangiopatía trombótica y nefritis intersticial.

Manifestaciones neurológicas, los pacientes lúpicos pueden presentar compromiso a nivel del sistema nervioso central (SNC), sistema nervioso periférico (SNP), así como manifestaciones psiquiátricas. Se describen 19 manifestaciones neuropsiquiátricas en el LES. La manifestación más común del SNC es la cefalea (50%). Se pueden observar crisis epilépticas, meningitis aséptica, síndrome desmielinizante, trastornos del movimiento como corea, deterioro cognitivo, y ataques cerebrovasculares isquémicos. Las neuropatías craneales y periféricas, la mononeuritis múltiple, las neuropatías autonómicas, síndrome de Guillain-Barré y la miastenia gravis son las manifestaciones del SNP. Las manifestaciones psiquiátricas son de difícil diagnóstico y pueden variar desde depresión y ansiedad hasta psicosis.¹¹

Manifestaciones cardíacas y pulmonares: El compromiso seroso tanto a nivel pleural como pericárdico es frecuente en LES y puede presentarse con o sin derrame. La embolia pulmonar se asocia sobre todo en pacientes con AAF positivos. Otras manifestaciones pulmonares que se

presentan con menor frecuencia incluyen la hemorragia alveolar difusa con capilaritis, y la hipertensión arterial pulmonar. Dentro de las manifestaciones cardiovasculares la miocarditis es rara, pero las anomalías valvulares incluida la endocarditis de Libman-Sacks que afecta la válvula mitral, son más frecuentes y se asocian a AAF.

Los pacientes con LES presentan una aterosclerosis acelerada, teniendo un riesgo cardiovascular similar al que presenta un diabético, explicando el segundo pico de mortalidad que se presenta en estos pacientes. Esto se debe por un lado a la propia enfermedad (inflamación crónica) y por el otro a los tratamientos recibidos (en especial los corticoides).¹¹

Por último, los **síntomas constitucionales** tales como: la fatiga, la anorexia, el adelgazamiento, la fiebre (sin otra causa que lo explique), se observan en más del 90%. Si bien no implican compromiso de un órgano vital son de suma importancia dado que afectan la calidad de vida del paciente.¹¹ (Gráfico 1)

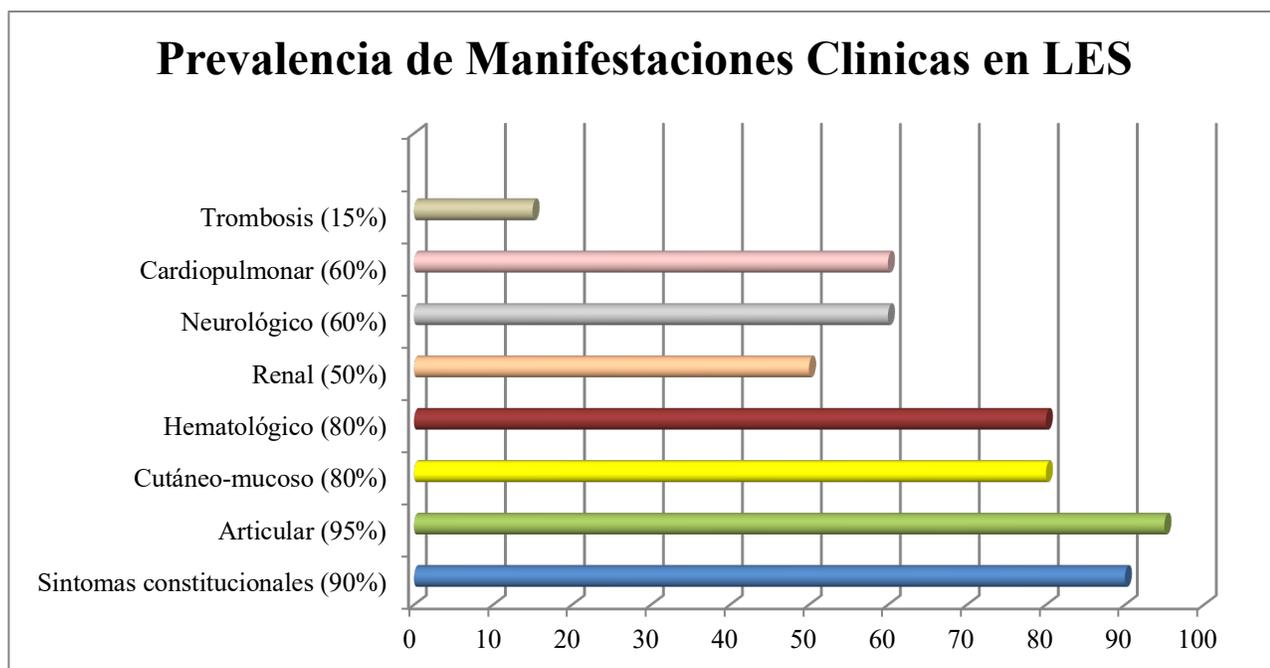


Gráfico 1. Frecuencia de manifestaciones clínicas en LES a nivel mundial.¹¹⁻¹⁵

3) Criterios Clasificatorios:

El LES puede afectar múltiples órganos y tejidos, siendo el patrón de manifestaciones heterogéneo entre los distintos pacientes e incluso puede cambiar con el tiempo en el mismo paciente. Los mecanismos que conducen a la inflamación y daño orgánico con su consecuente expresión clínica en el LES están vinculados a cambios epigenéticos, variantes genéticas, sexo

y ambiente. Esto puede explicar la heterogeneidad clínica de la enfermedad, lo que ha hecho difícil la elaboración de criterios diagnósticos para la práctica clínica diaria.

En este sentido y con el fin de homogeneizar las poblaciones de LES para realizar estudios epidemiológicos a lo largo del tiempo se han desarrollado múltiples criterios clasificatorios, los primeros fueron los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) de 1982 revisados en 1997, los cuales se han utilizado ampliamente durante más de 3 décadas.¹⁹ Luego, surgieron los criterios de la Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) del 2012, los cuales requerían como mínimo 4 de los 11 criterios propuestos e incluyeron un criterio "independiente" de nefritis lúpica; y/o al menos 1 manifestación clínica y 1 criterio inmunológico.²⁰ Los criterios de clasificación SLICC no se limitan a la investigación y se utilizan ampliamente para el diagnóstico, ya que presentan una alta sensibilidad. (Tabla 2) Por último, surgen los criterios EULAR de 2018, en los mismos se incluye como criterio obligatorio de entrada la determinación de anticuerpos anti-núcleocitoplasma (ANA) positivos a títulos de 1/80. Fueron creados dominios clínicos e inmunológicos ponderados con diferente puntuación (de 2 a 10), agrupados en 7 dominios clínicos (constitutivos, hematológicos, neuropsiquiátricos, mucocutáneos, serosos, musculoesqueléticos y renales) y 3 inmunológicos (anticuerpos antifosfolípidos, proteínas del complemento C3 y/o C4 bajas y anticuerpos anti-Smith o anti-ADN doble cadena). Los pacientes que acumulan ≥ 10 puntos, cumplen criterios clasificatorios para LES, con algunas puntualizaciones: solo se deben contar los puntos si no hay otra causa más probable, la aparición de un criterio en al menos una ocasión es suficiente, al menos debe contar con un dominio clínico, y no es necesario que ocurran en forma simultánea.²¹

Estudios que comparan los 3 criterios clasificatorios utilizando la cohorte de validación SLICC evidencian una sensibilidad y especificidad del 83% y 96% para la ACR, 97% y 84% para los criterios SLICC, 89% y 90% para el EULAR.²²

CRITERIOS CLÍNICOS	CRITERIOS INMUNOLÓGICOS
1. Lupus Cutáneo Agudo, incluyendo: eritema malar, lupus bulloso, eritema maculopapilar o fotosensible en ausencia de dermatomiositis o lupus cutáneo subagudo	ANA positivos
2. Lupus cutáneo crónico, incluyendo: eritema discoide (clásico, localizado, generalizado), lupus verrucoso hipertrófico, paniculitis lupus de mucosas (tumidus, chilblains y discoide/liquen plano overlap)	Anticuerpos anti-Sm (antígeno Smith) positivos
3. Úlceras orales (paladar, bucal, lengua) o úlceras nasales (en ausencia de otra causa)	Anticuerpos anti-fosfolípidos positivos:

	Anticoagulante lúpico, anti-cardiolipina o anti-beta2-glicoproteína)
4. Alopecia no cicatrizal (en ausencia de otros tipos de alopecia)	Hipocomplementemia
5. Sinovitis de dos o más articulaciones	Prueba de Coombs directa positiva en ausencia de anemia hemolítica
6. Serositis Pleuritis de más de un día, derrame pleural o roce pleural Pericarditis o derrame pericárdico o roce o pericarditis por ECG	
7. Renal: Cociente proteína/creatinina o proteinuria de 24 hs mayor a 0.5 grs o cilindros hemáticos	
8. Trastornos neurológicos: convulsiones, psicosis, mononeuritis múltiple, mielitis, neuropatía craneal o periférica, estado confusional agudo (en ausencia de otras causas)	
9. Anemia hemolítica	
10. Leucopenia <4000/mm ³ en dos o más ocasiones (en ausencia de Sind. De Felty, Hipertensión portal o farmacológica) Linfopenia < 1500/mm ³ en dos o más ocasiones (en ausencia de corticoides, fármacos o infección)	
11. Trombocitopenia <100.000/mm ³ sin la presencia de fármacos causales, hipertensión portal o púrpura trombocitopénicos)	

Tabla 2. Criterios Clasificatorios SLICC (Systemic Lupus International Collaborating Clinics).²⁰

Autoanticuerpos en LES:

Los autoanticuerpos son importantes biomarcadores en el LES. Se dirigen contra una amplia variedad de antígenos intracelulares que incluyen proteínas, ácidos nucleicos, nucleoproteínas, fosfolípidos, glicoproteínas y glicolípidos. Presentan múltiples funciones y una vasta

aplicación. La utilización en la práctica clínica diaria de los autoanticuerpos se basa en: 1) screening y diagnóstico precoz de EAS, 2) valorar brotes o actividad de la enfermedad, 3) predecir el fenotipo clínico de los pacientes, 4) evaluación pronóstica. Se han descrito más de 200 autoanticuerpos en LES, aunque menos del 10% de estos se pesquisan a nivel clínico. Es por esto que son necesarios más estudios prospectivos con cohortes de validación que incluyan autoanticuerpos, parámetros clínicos, y el conocimiento de la genómica, la epigenómica, la proteómica, y metabolómica que pueden agregar un gran valor en el poder de predicción de estos autoanticuerpos.²³

4) Autoanticuerpos y aplicación clínica:

Los autoanticuerpos pueden estar presentes muchos años antes de que la enfermedad se manifieste clínicamente. A continuación se detallan algunos de los autoanticuerpos más frecuentes en LES.

***ANA:** Presentan únicamente valor diagnóstico. Son sumamente sensibles (98%) pero poco específicos, pudiendo ser positivos en distintas enfermedades autoinmunes así como también en situaciones de infección, neoplasias y drogas. Valores mayores a una dilución de 1/80 se consideran resultados positivos débiles. Pueden agruparse en cuatro categorías: 1) anticuerpos contra ADN; 2) anticuerpos contra histonas; 3) anticuerpos contra proteínas diferentes a las histonas unidas al ARN; y 4) anticuerpos contra antígenos nucleolares. El método más ampliamente utilizado para detectar los ANA es la inmunofluorescencia indirecta (IFI), que puede identificar anticuerpos (Ac) que se unen a varios antígenos nucleares, como por ejemplo ADN, ARN y proteínas. Esto se expresa en distintos patrones de distribución de la señal (nuclear homogéneo, periférico, moteado, nucleolar, centromérico) siendo el patrón periférico el más específico de LES dado que es indicativo de anticuerpos frente a ADN bicatenario y a veces de proteínas de la envoltura nuclear.²⁴⁻²⁶

***Anticuerpos anti-ADN doble cadena.** Presentan valor en el diagnóstico y en el seguimiento de la enfermedad, dado que se elevan durante los períodos de actividad de la enfermedad. Son altamente específicos de LES. Se asocian con daño renal.²⁴⁻²⁶

***Anticuerpos anti-Smith (anti-Sm).** Presentan valor diagnóstico. Son poco sensibles pero muy específicos, su positividad se correlaciona con daño renal.²⁴⁻²⁶

***Anticuerpos anti-Ro y anti La.** Se asocian a lupus cutáneo, fotosensibilidad, lupus neonatal, y a síndrome de Sjögren (SS) asociado a LES.²⁴⁻²⁶

***Anticuerpos anti-fosfolípidicos (β 2-glicoproteína 1, anticardiolipina, anticoagulante lúpico).** Se dirigen contra epítopos de proteínas plasmáticas que se exponen cuando las proteínas forman complejos con los fosfolípidos. La positividad de estos anticuerpos junto con un fenómeno trombótico arterial o venoso y/o una alteración obstétrica hacen diagnóstico de síndrome de anticuerpo antifosfolípido (SAF). El SAF puede ser primario o secundario a LES. Están presentes en el 30 a 40% de los pacientes con LES.²⁴⁻²⁶

4.1) Técnicas de detección de autoanticuerpos en el laboratorio:

Los ANA tienen un papel no solo en el diagnóstico, sino también en el pronóstico y la actividad de la enfermedad de ciertas enfermedades autoinmunes como el LES. Se caracterizan por la presencia de autoanticuerpos, que reconocen antígenos altamente conservados contra componentes de las propias células del individuo. La mayoría de los targets diagnósticos se localizan en el núcleo, pero en algunos casos pueden estar en el citoplasma. Es de suma importancia destacar que la presencia de un ANA positivo no implica el tener una enfermedad autoinmune, y la solicitud de este estudio siempre debe acompañarse de la sospecha clínica de una enfermedad autoinmune sistémica (EAS).²⁷⁻³³

El primer paso para la búsqueda de los autoanticuerpos en el laboratorio es el screening mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Para las EAS se utilizan células Hep2 (células epiteliales derivadas del carcinoma de laringe), en el caso de las enfermedades autoinmunes órgano específicas se utiliza células de tejido de rata. El segundo paso, es la identificación y confirmación de especificidades, con test antígeno específicos (IFI, ELISA, DID, Dot- blot, etc) En la técnica de IFI se debe valorar dos aspectos: 1) Intensidad/título: por mediciones tradicionales, semicuantitativas, electrónica o semiautomática. 2) Patrón: lo cual sugiere la especificidad del autoanticuerpo.²⁷⁻³³

Para describir los distintos patrones se debe considerar todos los componentes de la célula. Las células Hep2 expresan más de 100 antígenos diferentes que se correlacionan con más de 35 patrones, nucleares y citoplasmáticos, lo que sugiere la posible presencia de autoanticuerpos específicos asociados con la enfermedad autoinmune sistémica.²⁷⁻³³

La IFI es altamente sensible, y se considera el gold standard para los ANA. Pero cuenta con algunas limitaciones tales como, gran variabilidad interobservador, especificidad más baja, sabiendo que un 25% de individuos sanos pueden tener ANA positivos. En un intento de estandarizar la evaluación e interpretación de los ANA, dos grupos de expertos formularon una serie de recomendaciones. Para resumir: a) la IFI en Hep-2 es el método de elección para la detección de ANA, b) es de suma importancia el definir patrones (nucleares, citoplasmáticos y mitóticos) los cuales son llamados ANA patterns, y c) la importancia del uso de pruebas específicas para anticuerpos anti-ENA (anticuerpos específicos). Los ANA patterns nos sirven para orientarnos a las distintas EAS, siempre en consonancia con la sospecha clínica. Algunos autoanticuerpos están asociados con más de una enfermedad autoinmune sistémica (áreas de superposición).²⁷⁻³³

Para la interpretación del estudio, en primer lugar, se debe describir si una muestra es negativa, débilmente positiva o positiva. Una vez que es positiva, se describe la tinción. ¿Dónde está? núcleo, nucléolo, citoplasma. ¿Cómo es?, homogéneo, moteado, puntillado. Los distintos patrones son los siguientes:

1) Un patrón nuclear: a) *homogéneo* puede corresponder a un anti-dsDNA (marcador de diagnóstico, pronóstico, de actividad del LES), anti-histona (lupus inducido por fármacos), anti-nucleosoma (marcador diagnóstico, más sensible y temprano). b) *Patrón moteado*: tinción

granular gruesa o fina del nucleoplasma en la interfase, con o sin tinción de los nucleolos. Tinción de cromatina negativa en metafase. El moteado fino/grueso, puede corresponder a un anti-Ro (Síndrome de Sjogren, LES, LCSA), anti-La (síndrome de Sjogren, LES, LCSA, lupus neonatal), anti-Smith (muy específico, marcador diagnóstico y pronóstico de LES), U1-RNP (enfermedad mixta de tejido conectivo, LES, Síndrome de Sjogren), anti-Mi-2 (dermatomiositis). Moteado pleomórfico: PCNA (LES), moteado con/sin nucleolar: SCL70 (Esclerosis sistémica difusa), Ku (LES, miositis). Moteado puntiforme: centromérico (Esclerosis sistémica limitada), Sp100 (Colangitis biliar primaria). *c) Patrón nuclear, membrana nuclear*: granular, gp120 (Colangitis biliar primaria) o laminina (SAF, LES). *d) Patrón Nucleolar*: PM-scl (Esclerosis sistémica difusa, miositis), NOR90 (ES difusa), U3-RNP (ES, Polimiositis).

2) Patrón citoplasmático: *a) homogéneo*: SRP (PM), ribosomal (LES), *b) Puntillado*: Jo-1, PL-7, PL12 (síndrome anti-sintetasa), *c) Granular* (Colangitis biliar primaria, SAF), HMGR (miositis por estatinas).²⁷⁻³³

5) Índices de Actividad de la enfermedad:

La herramienta más importante para evaluar la actividad de la enfermedad en la práctica clínica diaria es la valoración global por parte del médico. Pese a esto, la misma está sujeta a una gran variabilidad intra e interobservador. Es por esta razón que surgen los scores de actividad, cuya finalidad ha sido servir como herramientas objetivas para estudios de cohortes de pacientes con LES.³⁴

Entre los scores de la actividad del LES se encuentran los siguientes:

- European Consensus Lupus Activity Measurement (ECLAM)³⁵
- Systemic Lupus Activity Measure (SLAM)⁷⁸ - SLAM revisado (SLAM-R)³⁶
- Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Measure (SLEDAI)^{37,38}
- Mexican Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (MEXSLEDAI)^{38,39}
- SLEDAI modificado (SLEDAI-2K)³⁹
- Safety of Estrogens in Lupus Erythematosus National Assessment (SELENA)- SLEDAI⁴⁰
- British Isles Lupus Assessment Group (BILAG)^{37,41}
- BILAG revisado (BILAG-2004)^{42,43}
- Systemic Lupus Activity Questionnaire (SLAQ)⁴⁴
- Lupus Activity Index (LAI)⁴⁵
- PGA (Physician Global Assessment)⁴⁶

Todos estos índices fueron válidos para medir la actividad del LES, y son capaces de predecir daño y mortalidad. Todavía no hay acuerdo sobre el uso de un único índice de actividad. Según consenso de expertos de la sociedad española de reumatología, el SLEDAI en sus versiones

actualizadas, SLEDAI-2K o SELENA-SLEDAI que es un índice global numérico, breve y sencillo de aplicar, incluso para los no expertos, puede ser el instrumento de elección.

La aplicación de estos índices permiten estandarizar en el seguimiento del LES, valorar de forma más precisa la enfermedad, y facilitan la toma de decisiones terapéuticas. Es así que las últimas recomendaciones EULAR 2019 ⁴⁷ muestran a estos índices de suma importancia para lograr un objetivo terapéutico a tratar (treat to target), siendo la misión de los mismos lograr la remisión o la baja actividad de la enfermedad, definiendo a la remisión como ausencia de actividad clínica, sin uso de glucocorticoides (GC) ni inmunosupresores (IS). Por otro lado la baja actividad de la enfermedad se define como SLEDAI ≤ 3 con antimaláricos, o SLEDAI alternativo ≤ 4 , PGA ≤ 1 con GC ≤ 7.5 mg de prednisona y buena tolerancia a los IS.⁴⁷ (Tabla 3)

Puntuación	Descriptor	Definición
8	Convulsiones	De comienzo reciente. Excluir causas infecciosas, metabólicas y fármacos.
8	Psicosis	Habilidad alterada para la función diaria debido a alteración grave en la percepción de la realidad. Incluye alucinaciones, incoherencia, asociaciones ilógicas, contenido mental escaso, pensamiento ilógico, raro, desorganizado y comportamiento catatónico. Excluir I. renal y fármacos
8	Síndrome orgánico cerebral	Función mental alterada con falta de orientación, memoria, u otras funciones intelectuales, de comienzo rápido y manifestaciones clínicas fluctuantes. Incluye disminución del nivel de conciencia con capacidad reducida para focalizar, e inhabilidad para mantener la atención en el

		medio, más, al menos dos de los siguientes: alteración de la percepción, lenguaje incoherente, insomnio o mareo matutino, o actividad psicomotora aumentada o disminuida. Excluir causas infecciosas, metabólicas y fármacos.
8	Alteraciones visuales	Retinopatía lúpica. Incluye cuerpos citoides, hemorragias retinianas, exudados serosos y hemorragias en la coroides, o neuritis óptica. Excluir HTA, infección o fármacos.
8	Alteración de Pares Craneales	De reciente comienzo, motor o sensitivo.
8	Cefalea lúpica	Grave, persistente; puede ser migrañosa pero no responde a analgésicos narcóticos.
8	Ataque cerebro vascular	De reciente comienzo. Excluir arteriosclerosis.
8	Vasculitis	Ulceración, gangrena, nódulos dolorosos sensibles, infartos periungueales, hemorragias en astilla o biopsia o angiografía que confirme la vasculitis.
4	Miositis	Debilidad proximal/dolor asociado a elevación de las CPK/aldolasa o EMG sugestivo o miositis comprobada por biopsia.
4	Artritis	Más de dos articulaciones dolorosas y con signos inflamatorios.
4	Cilindros urinarios	Cilindros hemáticos o granulados.
4	Hematuria	Excluir litiasis, infección u otras causas.

4	Proteinuria	> 5 g/24 h. De reciente comienzo o aumento de la proteinuria ya conocida en más de 0.5 g/24 h.
4	Piuria	> 5 leucocitos/c. Excluir infección.
2	Exantema nuevo	Comienzo reciente o recurrente. Exantema inflamatorio.
2	Alopecia	De comienzo reciente o recurrente. Pérdida difusa o en placas.
2	Úlceras bucales	De comienzo reciente o recurrente. Úlceras bucales o nasales.
2	Pleuritis	Dolor pleurítico con roce o derrame, o engrosamiento pleural.
2	Pericarditis	Dolor pericárdico con al menos uno de los siguientes: roce, derrame, cambios electrocardiográficos o confirmación ecocardiográfica.
2	Complemento	Descenso de CH50, C3, C4 por debajo del límite inferior del laboratorio.
2	Anti DNA	> 25%. Técnica de Farr o por encima del valor habitual del laboratorio.
1	Fiebre	> 38°C. Excluir infección.
1	Trombopenia	< 100.000 plaquetas/mm ³ .
1	Leucopenia	< 3.000 células/mm ³ . Excluir fármacos.

Tabla 3. Puntuación SLEDAI. Nota de puntuación: puntúa en la escala SLEDAI si el descriptor está presente en el día de la visita o 10 días antes.

5.1) Índice de daño estructural:

Otro parámetro que debe considerarse en el paciente lúpico es el Índice de Daño, que establece el grado de daño tisular desde el inicio de la enfermedad. Para el análisis se consideran los

signos y síntomas que se manifiesten desde el momento de la evaluación a los seis meses previos.^{48,49}

El daño estructural se debe a lesiones irreversibles que puede ser el resultado de: la propia enfermedad, los tratamientos utilizados o a las complicaciones asociadas. Es entonces un índice que trata de medir secuelas.³⁴

Aunque la actividad y el daño no son iguales, la actividad acumulada o persistente puede originar daño tisular, es decir, los procesos inflamatorios en un tejido específico inducen daño progresivo, y a su vez puede agravarse con cualquiera de los factores mencionados. Por lo tanto, se puede decir que la actividad a largo plazo se traduce en daño, y el daño genera morbilidad y mortalidad.^{34,48}

El único instrumento disponible desarrollado y validado para medir daño estructural es el SLICC/ACR índice de daño (SDI), el cual se ha utilizado en estudios de morbilidad y mortalidad.^{34,50} Se ha evidenciado que el daño temprano en el LES medido con el SLICC/ACR SDI es de valor pronóstico y puntuaciones altas en el SLICC/ACR SDI se han asociado con la mortalidad.^{34,51}

Un estudio prospectivo con seguimiento a 10 años, de 263 pacientes realizado por Gladman et al., mostró que el daño temprano medido por SLICC/ACR SDI se asoció con una tasa más alta de mortalidad. Entre los casos que mostraron daño el 25% falleció vs el 7,5% de los que no lo mostraron ($p=0,0002$). A su vez, los pacientes con mayor índice de daño presentaban más probabilidad de tener compromiso renal ($p=0,013$) y una tendencia a más enfermedad cardiovascular ($p=0,056$).^{34,51}

Otro estudio de 80 casos con LES y un seguimiento de 5 años, evidenció un RR de mortalidad de 3,4 (IC: 95%: 1,5-14,4) para un SLICC/ACR SDI ≥ 2 .^{34,52}

En conclusión, el SLICC/ACR SDI es un instrumento que ha demostrado ser válido, fiable y reproducible, y que tiene poca variabilidad interobservador, con gran utilidad en investigación clínica multicéntrica.³⁴ (Anexo I)

6) Patogenia de EAS:

El sistema inmunológico tiene la capacidad de responder frente a los antígenos extraños y no desarrollar una respuesta inmune frente a los antígenos propios, propiedad esta última a la que denominamos **autotolerancia**. Esta es una característica que define al sistema inmunológico la cual se adquiere durante su desarrollo, existiendo mecanismos de mantenimiento posterior. El establecimiento y mantenimiento de la autotolerancia se produce a nivel de los órganos linfoides centrales (tolerancia central) y en los tejidos periféricos (tolerancia periférica). La tolerancia central induce la eliminación o inactivación de los linfocitos autorreactivos durante

su desarrollo, mientras que la tolerancia periférica asegura que los linfocitos autorreactivos que escapan de los puntos de control centrales no se activen en los tejidos periféricos. La pérdida de los mecanismos de autotolerancia conduce a la **autoinmunidad**.^{53,54}

La desregulación de múltiples componentes del sistema inmunológico incluyendo elementos de la inmunidad innata y adaptativa favorecen la pérdida de la autotolerancia con el consiguiente desarrollo de lesión tisular, siendo esta la base para el desencadenamiento de enfermedades autoinmunes.⁵³

En el proceso de tolerancia central, los linfocitos T autorreactivos capaces de reconocer antígenos propios en dichos tejidos durante su maduración, pueden tener dos caminos: ser eliminados por apoptosis (delección clonal) o convertidos en linfocitos supresores (linfocitos T reguladores) específicos del autoantígeno reconocido. La tolerancia periférica de los Linfocitos T se produce en los LT autorreactivos que maduraron y escaparon al proceso de selección negativa en el timo. Los mecanismos de tolerancia periférica son: la **anergia clonal** (inactivación funcional), la **supresión de la activación mediada por LTreg** y eliminación por **apoptosis**.⁵³

En lo que respecta a los mecanismos de tolerancia central de la células B, los LB inmaduros que reconocen antígenos propios en la médula ósea con alta avidéz cambiarán la especificidad de su receptor (edición del receptor) o morirán por apoptosis. Por el contrario, el reconocimiento de los antígenos propios con baja avidéz en la médula ósea conducirá a la anergia clonal. Por otro lado, en los mecanismos de tolerancia periférica de los LB maduros que reconocen autoantígenos en tejidos periféricos en ausencia de linfocitos T cooperadores, se vuelven anérgicos, van a la apoptosis o en algunas situaciones pueden activar receptores inhibitorios.^{53,54} (Figura 2)

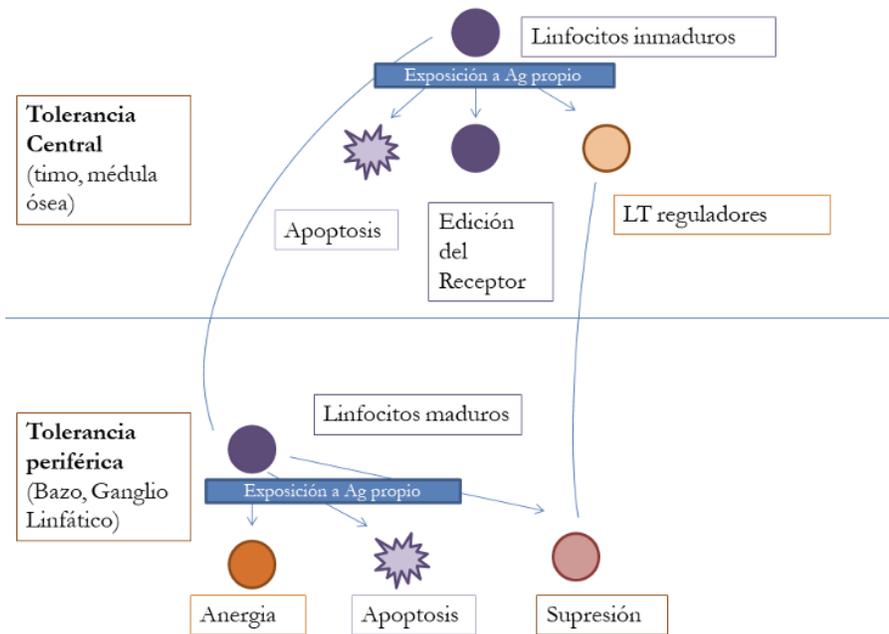


Figura 2. Mecanismos de tolerancia central y periférica de linfocitos B y T.⁵³

Al evidenciar los mecanismos fisiológicos de tolerancia central y periférica de los LT y LB queda de manifiesto la importancia de la **apoptosis** en la generación de autotolerancia. Siendo la **falla de los mecanismos de apoptosis de linfocitos autorreactivos uno de los mecanismos que conduce a autoinmunidad.**^{53,54}

6.1) Patogenia de LES y factores precipitantes:

No existe un único factor capaz de desarrollar autoinmunidad y LES por sí solo, sino que dicho desarrollo responde a la interacción de múltiples factores, entre los que destacamos: los genéticos, los epigenéticos, el ambiente, los hormonales, la lesión tisular local y factores inmunológicos. Para el desarrollo del LES, así como de cualquier EAS, es necesario la sumatoria de varios de estos factores. A continuación, analizaremos cada uno de ellos. (Figura 3)

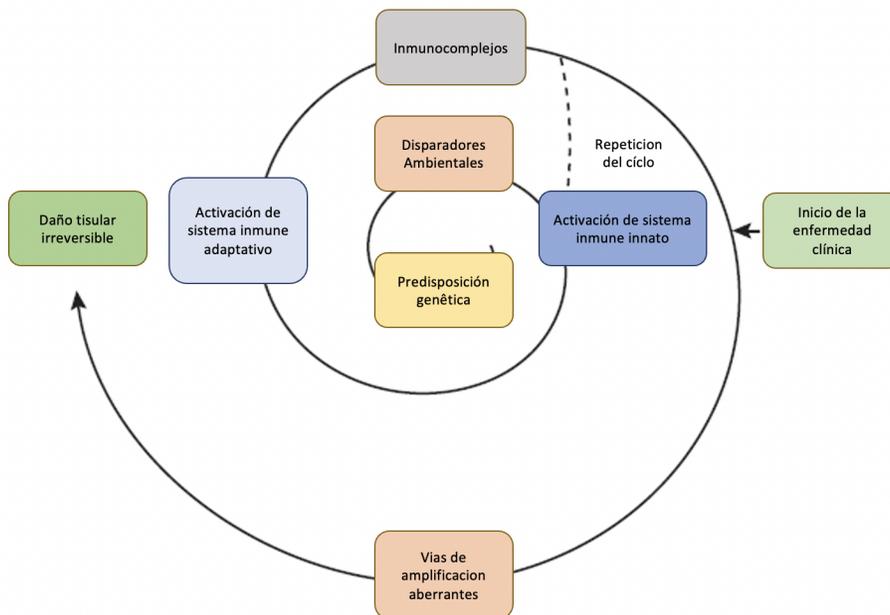


Figura 3. Espiral de la progresión de la enfermedad en el LES con sus factores precipitantes.⁵⁵

a) Factores Genéticos:

Hace muchos años se conoce que el LES presenta un fuerte componente genético. Este hallazgo se apoya dado que estudios evidencian que existe una mayor concordancia para gemelos monocigóticos (34%) que para dicigóticos (3%).⁵⁶

En general, el LES no se asocia a mutaciones puntuales de un solo gen, sino que se asocia a alteraciones en múltiples genes (poligénica), existiendo múltiples polimorfismos que pueden contribuir a su patogenia. Los genes mayormente caracterizados en la patogenia del LES son los genes HLA o del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), y aquellos no relacionados a HLA. La región HLA ubicada en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3) contiene cientos de genes, muchos de los cuales funcionan en el sistema inmunológico, incluido el MHC de clase I (HLA-A, -B y -C) y genes de clase II (HLA-DR, -DQ y -DP). Esta región es altamente polimórfica, no es sorprendente que esté asociado con enfermedades autoinmunes. Actualmente con el advenimiento de las técnicas de secuenciación masiva se han identificado más de 50 locis implicados en polimorfismos que predisponen a LES.^{56, 57}

Dentro de los genes de susceptibilidad al LES mencionaremos los más relevantes. El gen del interferón tipo I (IRF5) posiblemente sea uno de los más importantes en el LES, después del MHC.⁵⁸

El gen *PTPN22* (*protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22*) codifica para una fosfatasa de tirosina expresada sobre todo en tejido linfoide, e involucrada en múltiples vías de señalización asociadas a la respuesta inmune. En ocasiones, *PTPN22* presenta un polimorfismo de nucleótido único que genera una proteína nativa con un defecto funcional debido a una sustitución de una arginina por un triptófano en la posición 620 del polipéptido. Esto impide formar complejo con una tirosina quinasa, y conduce a una alteración en la respuesta de receptores de las células B y T, resultando en una activación excesiva de los mismos. Esta mutación se asocia a varias enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, *diabetes mellitus* tipo 1, lupus eritematoso sistémico, vitiligo, enfermedad de Graves Basedow). Dada la alta prevalencia de estas patologías, se ha planteado que *PTPN22* es el gen más frecuentemente implicado en la autoinmunidad.^{24,53}

Otros genes descubiertos fueron el gen *ITGAM*, o la integrina alfa-M (también denominada Mac-1, CD11b o CR3), que si bien se desconocen los detalles moleculares de los mecanismos patogénicos, se plantea tenga relevancia en la susceptibilidad genética para el desarrollo de LES. Por otro lado, se identificaron dos genes expresados exclusivamente en las células B (*BLK* y *BANK1*), los cuales podrían explicar la hiperactividad de las células B en el LES.⁵⁸ En el Anexo II se dejan algunos de los genes de susceptibilidad al LES reconocidos hasta el momento.⁵⁶

b) Factores Epigenéticos:

Los factores epigenéticos son aquellos capaces de provocar cambios en la expresión de la información genética, pero sin alteraciones en la secuencia original del ADN. Dentro de estos se destacan: la metilación del ADN, las modificaciones post-transcripcionales de histonas y los microARNs (miRNAs).⁵⁹

Es ya conocida la hipometilación global del ADN de los linfocitos T de los pacientes con LES, lo que conduce en una activación de la transcripción génica y se ha correlacionado con los períodos de actividad de la enfermedad. A su vez, la hipometilación de ciertas regiones reguladoras en el ADN está involucrada en la patogénesis y desarrollo de la enfermedad, como consecuencia de una sobreexpresión de genes asociados a autoinmunidad en células T CD4⁺, como por ejemplo CD11a, CD40L y CD70. Esta hipometilación también está asociada a la presencia de interleucinas inflamatorias en esta enfermedad (como IL-4 e IL-6). La metilación del ADN también juega un rol durante el proceso de activación y diferenciación de las células T. Por ejemplo, este mecanismo regula la expresión de *Foxp3*, una proteína relacionada al mantenimiento de la función de los linfocitos Treg. Pero ¿cómo se regula la metilación/demetilación del ADN? Uno de los mecanismos propuestos estaría mediado por *Gadd45a* (*Growth arrest and DNA damage-induced 45 alpha*), una proteína que aumenta sus niveles de expresión en respuesta a estímulos estresantes o daño al ADN. Ha sido reportado que la presencia de *Gadd45a* en linfocitos T CD4⁺ de pacientes con LES promueve la remoción de

la metilación, y en consecuencia estimula la expresión, de CD70 y CD11a. Otra proteína posiblemente involucrada en este proceso sería HMGB1 (*High mobility group box protein 1*), mediante su unión a Gadd45a.⁵⁹

La modificación post-transcripcional de histonas es otro mecanismo epigenético de regulación de la expresión génica. En este sentido, se sabe que en los linfocitos T CD4⁺ de los pacientes con LES existe una hipoacetilación global de las histonas H3 y H4. Un ejemplo de esto son las modificaciones a nivel del promotor de CD70 que llevan a su sobreexpresión en los linfocitos T. También se han descrito que los monocitos de los pacientes con LES presentan alteraciones globales en la acetilación de la histona H4.⁵⁹

Los miRNAs son pequeñas moléculas de ARN que no codifican para proteínas pero que cumplen funciones de regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional y post-traducciona, mediante su unión a los extremos 3'-UTR (*untranslated regions*) de los ARN mensajeros (ARNm) de genes blanco. La expresión aberrante de estas moléculas en pacientes con lupus se ha visto en varios tipos celulares diferentes (linfocitos B y T, células dendríticas) y en suero. Por ejemplo, en los linfocitos T miR-31 estimula la producción de IL-2, mientras que miR-142 inhibe la expresión de IL-4, IL-10 y CD40L. En linfocitos B de pacientes con LES, la sobreexpresión de miR-30a reduce los niveles de Lyn, una tirosín-quinasa miembro de la familia Src involucrada en la regulación de la activación celular.

Es de resaltar la interrelación existente entre distintos mecanismos epigenéticos. Por ejemplo, miR-21, miR-126 y miR-148a tienen como blanco el ARNm de DNMT1 (*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1*). En células T de pacientes con LES ocurre un incremento de miRNAs que lleva a un descenso en los niveles de DNMT1, y por lo tanto, a una disminución de la metilación del ADN en esas células. Algunos medicamentos como el micofenolato pueden interferir en la epigenética de la enfermedad. Este fármaco, produce modificaciones de las histonas a nivel de la región promotora de los miR-142 y miR-146a, conduciendo a un aumento de su expresión, logrando su efecto terapéutico.⁵⁹

c) Factores ambientales:

c.1) Infecciones y LES:

La relación entre infecciones y autoinmunidad se ha incrementado cada vez más en los últimos años, teniendo implicancias no solo los virus, sino que también los agentes bacterianos y parasitarios.

Uno de los virus mayoritariamente relacionados con la patogenia del LES es el virus de Epstein-Barr (VEB). Se ha demostrado que los pacientes presentan títulos circulantes de VEB mayores que los individuos sin LES, e incluso se ha evidenciado ADN viral en ciertos órganos.^{60,61}

Otro agente viral importante es el Citomegalovirus (CMV), perteneciente al grupo de los herpes virus. Este agente presenta una alta tasa de replicación, capacidad de inducir lisis celular y persistencia en el organismo por largos períodos de tiempo. Algunos estudios han revelado que

este virus sería también uno de los factores ambientales más relacionados con la inducción y desarrollo de las EAS, sobre todo en el LES, si bien se ha relacionado a otras EAS como la esclerosis sistémica y la AR. Son necesarios más estudios para establecer con mayor firmeza dicha relación.⁶²

En lo que respecta a las bacterias, el *Helicobacter Pylori* (HP) ha sido uno de los agentes más estudiados. Se plantea que puede tener un rol en la patogenia del LES, esto es debido a la infiltración mucosa por células inflamatorias y activación de citoquinas proinflamatorias que genera el HP.⁶³

Existen ciertos mecanismos moleculares por los cuales las infecciones favorecen el desarrollo de LES, a saber:

- Mimetismo molecular: los agentes infecciosos presentan antígenos con similar secuencias de aminoácidos que antígenos propios, por esta razón cuando el sistema inmune se expone a un antígeno propio lo puede reconocer como extraño, generando una respuesta inmune frente a este antígeno. Dicho proceso es lo que conocemos con el nombre de mimetismo molecular.⁶⁰⁻⁶²
- Aumento de la expresión de moléculas coestimuladoras: Muchas infecciones aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras en las células presentadoras de antígenos (APC). Si estas células están presentando antígenos propios, el resultado puede ser una pérdida de la anergia (inactivación funcional sin muerte celular) con la consiguiente pérdida de autotolerancia, produciéndose una activación de linfocitos T específicos frente a antígenos propios.^{24,53}
- Activación policlonal de linfocitos (superantígenos): Los superantígenos o activadores policlonales, como por ejemplo el lipopolisacárido (LPS) bacteriano, pueden estimular muchos clones de linfocitos B o T sin importar su especificidad antigénica ni la presencia del antígeno para el cual son específicos. Esto ocurre dado que los microorganismos presentan compuestos capaces de activar a los linfocitos de forma independiente de antígeno, y en caso de que estos sean autorreactivos se generará pérdida de la autotolerancia con el consiguiente desarrollo de autoinmunidad.⁶⁴

c.2) Microbiota y LES:

El cuerpo humano está colonizado por múltiples microorganismos que interactúan con los tejidos en una forma cooperativa y no patogénica, la denominada flora normal o microbiota. La microbiota se localiza a todo nivel en el organismo, pero ha sido más detenidamente estudiada a nivel de piel, tubo digestivo y tracto genital. La microbiota intestinal está compuesta por más de 2.000 especies de microorganismos. La gran diversidad está influenciada por varios factores asociados al huésped como ser: factores genéticos, género, edad, funcionamiento del sistema inmune, condición de salud o enfermedad, tratamientos recibidos, dieta, factores socio-económicos y geográficos.

Cuando existe un balance inter-especie en la microbiota (eubiosis), esta cumple importantes funciones relacionadas a ciertos requerimientos de nuestro organismo (funciones metabólicas, inmunológicas, de absorción, etc.). Cualquier perturbación de esta eubiosis (disbiosis), puede relacionarse con el desarrollo de distintas patologías, entre estas el LES.^{65,66}

A su vez, la microbiota intestinal tiene la capacidad de regular al sistema inmune innato y adaptativo, por lo que la pérdida del equilibrio a favor de bacterias patógenas (disbiosis), puede conducir a un estado de inflamación sistémica que predispone al desarrollo de autoinmunidad y enfermedades inflamatorias. En este sentido, en los últimos años se ha investigado el rol patogénico de la microbiota intestinal en el desarrollo de patologías inmunes. Sin embargo, aún faltan estudios que permitan definir la implicancia de las mismas para la prevención y el manejo terapéutico de estas enfermedades.^{65,66}

c.3) Exposición a luz UV y autoinmunidad:

Los rayos UV resultan en factores precipitadores del LES. Esto es debido a la capacidad de estos rayos de generar apoptosis de los queratinocitos, con la consiguiente exposición del material genético al sistema inmune, convirtiéndose de este modo en material inmunogénico. Esto conduce a producción de autoanticuerpos por parte de las células B y a una activación importante del sistema mononuclear fagocítico.⁶⁷

d) Factores Hormonales:

El LES se presenta mayoritariamente en mujeres, y sobre todo en aquellas en edad genital activa, siendo el embarazo y el postparto en muchos casos factores desencadenantes para el debut de estas enfermedades o la recaída de las mismas. Las hormonas juegan un rol en la patogenia de las enfermedades autoinmunes, sumado al hecho de que la homeostasis hormonal es fundamental en el mantenimiento funcional adecuado del sistema inmune.^{68,69}

En ese sentido, los estrógenos actúan como inmunoestimuladores, favoreciendo la maduración de los linfocitos T y conduciendo a un aumento en la supervivencia y activación de los linfocitos T autorreactivos. Presentan además un efecto inhibitorio en la producción de las citoquinas Th1 (IL-2, TNF-alfa, IFN-gamma), y por el contrario estimulan la producción de las citoquinas Th2 (IL-4, IL-10, TGF-beta). Esto último es la razón por la que el LES (principalmente mediadas por citoquinas Th2) tienden a presentar recaídas durante el embarazo.^{68,69}

Por otro lado, resultados de distintos estudios demuestran que habría una asociación entre la prolactina y ciertas manifestaciones clínicas LES (neurológicas, renales, hematológicas, serositis) así como paraclínicas (anticuerpos anti-ADN, complemento bajo).^{68,69}

e) Lesión Tisular local:

La lesión tisular en el LES se debe a un grupo de enfermedades que se denominan enfermedades producidas por anticuerpos. Estas enfermedades son causadas por la unión de anticuerpos a antígenos celulares o extracelulares o por el depósito tisular de complejos antígeno-anticuerpo, denominados estos últimos inmuno-complejos (IC). Estos dos tipos de respuesta inmune se conocen como hipersensibilidad (HS) tipo II (mediada por anticuerpos) y tipo III (mediada por IC).²⁴

La HS II y III están implicadas en la base de diferentes enfermedades. Los anticuerpos pueden estar dirigidos tanto contra antígenos propios (endógenos) o exógenos.

Mientras que las enfermedades causadas por reacciones de HS II afectan específicamente a los tejidos que expresan dichos antígenos, las que son consecuencia de reacciones de hipersensibilidad tipo III tienden a ser sistémicas y con escasa o nula especificidad por un órgano determinado. Esto último es debido a que las manifestaciones clínicas reflejan el sitio de depósito de los IC y no la fuente celular del antígeno.

El LES es un ejemplo clásico en donde se intrincan dentro de una misma patología reacciones de HS II y III.²⁴

En lo que respecta a las reacciones de Hipersensibilidad tipo II, ocurre la producción de anticuerpos que se dirigen contra antígenos de superficie de eritrocitos y plaquetas siendo responsable de la anemia hemolítica y la trombocitopenia inmune.²⁴

En las reacciones de HS tipo III se produce lesión en respuesta a la formación y depósito de IC. Los IC son complejos multimoleculares formados por antígenos unidos a anticuerpos específicos que activan el complemento. Los IC producen lesión tisular fundamentalmente induciendo inflamación a nivel de los sitios en que se depositan. La lesión tisular es consecuencia de la capacidad de los IC de activar a diferentes mediadores séricos, principalmente al sistema del complemento. Como los anticuerpos más frecuentemente implicados son las Inmunoglobulinas G y M esto lleva a que se active la vía clásica del complemento. Por otra parte, cuando los IC están formados por IgA se activa la vía alternativa del complemento. Las concentraciones bajas de complemento en estos pacientes se explican dado que este sistema es el encargado de depurar a los IC (presentes en altas cantidades). Esto explica que a nivel clínico el hallazgo de bajos niveles de componentes del sistema del complemento orienta a actividad de la enfermedad.²⁴

f) Factores inmunológicos:

Las alteraciones inmunitarias que pueden dar lugar a persistencia y activación incontrolada de los linfocitos autorreactivos en el LES son:

f.1) Falla en la autotolerancia de los linfocitos B:

Da lugar a una eliminación defectuosa de linfocitos B autorreactivos en la médula ósea o a defectos en los mecanismos de tolerancia periférica. Están muchas veces relacionados a defectos en la apoptosis de estas células, lo que prolonga la vida de estos linfocitos productores de autoanticuerpos.

f.2) Receptores Toll:

La activación de la respuesta inmune innata juega un rol importante en la promoción de la autoinmunidad mediante la activación de los receptores Toll 7 (TLR7, capaz de reconocer ARN) y Toll 9 (TLR 9, capaz de reconocer ADN). Estos receptores pueden estimular directamente a las células B para que produzcan autoanticuerpos así como también activar las respuestas vía IFN-alfa. La alta expresión del TLR9 en los LB está asociado a una mayor actividad de la enfermedad.^{24,53}

f.3) Los interferones de tipo I:

Intervienen en la activación del linfocito en el LES. En los pacientes con LES se han descrito cantidades elevadas de interferones de tipo I circulantes, que a su vez se correlacionan con la severidad de la enfermedad. Los interferones de tipo I son citocinas antivíricas que se producen normalmente durante las respuestas inmunitarias innatas a los virus. Los propios ácidos nucleicos imitan a sus correlatos microbianos. Estas citocinas pueden activar a las células dendríticas y linfocitos B, promoviendo las respuestas Th1 y estimulando la producción de autoanticuerpos patogénicos.^{24,53}

f.4) Factores de supervivencia de LB:

En pacientes lúpicos los plasmocitos generan auto-anticuerpos, teniendo una permanente activación, esto ocurre dado que se sobre expresan distintas moléculas. Existen dos factores de diferenciación y supervivencia de las células B, los mismos son: APRIL y BAFF o también conocido como BLyS (factor estimulador de linfocito B). Son dos citocinas de la superfamilia del TNF. BAFF puede unirse a 3 receptores distintos sobre la superficie del LB, que son el receptor de BLyS (BLySr o BR3), TACI (*transmembrane activator and calcium modulator ligand interactor*) y BCMA (*B cell maturation antigen*); por su parte APRIL puede unirse sólo a 2 de ellos: TACI y BCMA. Tanto BAFF como APRIL promueven la diferenciación de las células B y su supervivencia. De estos últimos, el mejor conocido hasta el momento actual es el BAFF, siendo el mismo esencial para la maduración de los LB en células plasmáticas secretoras de auto-anticuerpos. Se ha demostrado que los niveles séricos de BAFF son elevados en los pacientes con LES, lo cual lleva a un número mayor de células productoras de auto-anticuerpos. Se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal que bloquea a BAFF, llamado **Belimumab**. Este fármaco fue el primer anticuerpo monoclonal aprobado para el LES. Su mecanismo de acción consiste en evitar que BAFF ejerza su acción a nivel de su receptor (bloqueo de BAFF) lo que

conduce a una depleción de los LB, fundamentalmente por apoptosis, y a una disminución de la tasa de autoanticuerpos. ^{24,53}

f.5) Citoquinas:

La IL-17, que incluye 6 miembros denominados IL-17A a IL-17F, es producida por LTh17. Es una citoquina pro-inflamatoria entre cuyas funciones está la de participar en la respuesta inmunitaria contra bacterias extracelulares, hongos, y la activación de sistema inmunitario innato (monocitos, neutrófilos). La IL-17 está anormalmente elevada en los pacientes con LES. Además de su actividad pro-inflamatoria, ejerce otro efecto que es la estimulación de los LB, con mayor producción de auto-anticuerpos que sumado al daño local genera mas auto-antígenos, con la consiguiente formación de IC.

Se ha observado que en pacientes lúpicos existen niveles elevados de TNF alfa, que se relacionan con la actividad de la enfermedad y algunas manifestaciones clínicas como es la nefritis lúpica. ^{24,53}

f.6) Defectos en la apoptosis:

En pacientes con LES, existe un aumento de la apoptosis y/o una reducción en la eficiencia de la eliminación de los restos apoptóticos, lo que que conduce a la acumulación de estos, y a una biosíntesis de anticuerpos dirigidos contra antígenos nucleares. ^{24,53}

Comenzaremos a continuación, entendiendo de forma más detallada en qué consiste la apoptosis.

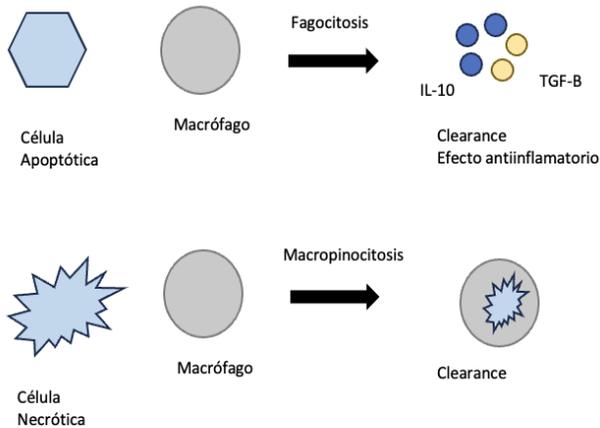
7) APOPTOSIS:

La apoptosis, muerte celular programada, es una forma silenciosa de muerte celular que está activa tanto en condiciones fisiológicas como patológicas y juega un papel crítico en la homeostasis de los tejidos que experimentan una alta tasa de recambio, como se observa durante la embriogénesis y el desarrollo. La apoptosis también juega un papel clave en el sistema inmunológico al eliminar las células T autorreactivas y las células B durante la selección positiva y negativa para evitar que se desencadenen mecanismos de autoinmunidad. Puede iniciarse mediante la unión a receptores de la superficie celular como Fas o el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) o debido al estrés celular ⁷⁰ y se desencadena por factores internos o externos tales como mutaciones del ADN, infecciones o exposición a los rayos UV. Es un proceso regulado, que requiere energía con consumo de ATP, activación secuencial de enzimas intracelulares con actividad proteasa (caspasas), digestión de la cromatina y el ADN por la enzima DNasa, y finalmente modificación del citoesqueleto con formación de micro-partículas de la membrana. Sin embargo, a diferencia de la necrosis, la integridad de la membrana celular durante la apoptosis está preservada y el contenido intracelular no se libera en el compartimento extracelular. De todos modos, es necesario un rápido aclaramiento de los

restos apoptóticos en circunstancias normales, lo cual es logrado por parte de los fagocitos y macrófagos, que reconocen, se adhieren, fagocitan y finalmente digieren los restos apoptóticos. En casos donde no se realice este aclaramiento determinará una necrosis secundaria a la apoptosis. Como consecuencia de la apoptosis ocurre la liberación de auto-antígenos crípticos (antígenos que no fueron expuestos previamente al sistema inmunológico), que son transitoriamente expresados en las membranas celulares de las células con apoptosis o en los restos apoptóticos mediante microvesículas.⁷⁰⁻⁷²

Probablemente la fosfatidilserina expuesta en la membrana externa durante las fases de apoptosis juega un papel principal para el reconocimiento fagocítico. El conocimiento de los receptores involucrados y sus mecanismos no han sido aún identificados. Cabe destacar que en situaciones normales existe una interacción entre los macrófagos y las células apoptóticas, la cual determina una respuesta tolerógena, caracterizada por la liberación en el microambiente de TGF-beta e IL-10 (citocinas inhibitorias), que previene el comienzo de la inflamación.^{71,72} Una función normal y eficaz de las células fagocíticas es fundamental para mantener un rápido y completo aclaramiento de las células apoptóticas, de lo contrario evolucionará a una necrosis secundaria. Esta última circunstancia determinaría la liberación de "señales de peligro" (normalmente liberadas al ambiente intracelular) hacia el ambiente extracelular, así comenzará una respuesta inflamatoria caracterizada por la liberación de citocinas proinflamatorias y la producción de autoanticuerpos.^{73,74} (Figura 4).

SANO:



LES:

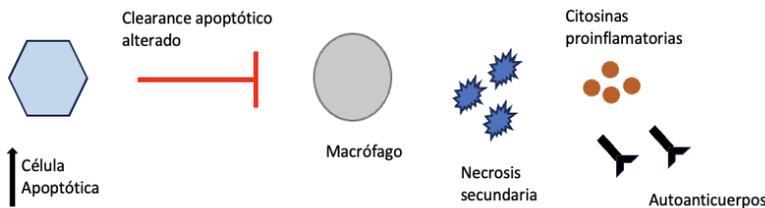


Figura 4. Apoptosis y necrosis en situaciones normales y en individuos con LES.⁷⁰

7.1) Apoptosis y LES:

En la patogenia del LES existe una alteración en la apoptosis o en las funciones relacionadas a la misma. Se debe destacar dos eventos claves, los mismos son: **1) apoptosis acelerada con incremento de los restos apoptóticos, 2) defectos en los mecanismos de depuración** o aclaramiento de las células apoptóticas por parte del sistema mononuclear fagocítico. Lo anterior, lleva a la persistencia de auto-antígenos en el organismo de estos pacientes. Como consecuencia, se evidencia ADN propio circulante, que se convierte en una diana antigénica para la inmunidad humoral y celular. Por otro lado, la apoptosis defectuosa de los linfocitos autorreactivos juega un importante rol en la patogenia del LES, ya que lleva a el desarrollo de autoinmunidad.^{70,75}

7.2) La apoptosis acelerada contribuye al desarrollo de LES

La apoptosis acelerada en el LES puede afectar los mecanismos de eliminación del huésped y dar como resultado una acumulación de los restos apoptóticos contribuyendo a una necrosis secundaria.

Las células necróticas secundarias pierden la integridad de la membrana plasmática y liberan autoantígenos que pueden conducir a la formación de IC, a su depósito a nivel de los distintos parénquimas, entre estos a nivel glomerular y al desarrollo de nefritis.⁷⁰

También se ha observado apoptosis acelerada en el LES en células de la inmunidad innata claves, incluidos fagocitos (monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas inmaduras) que son importantes en el aclaramiento. Las células T autorreactivas en pacientes con LES inducen apoptosis en monocitos autólogos a través de ligandos relacionados con TNF. Se ha evidenciado que los pacientes con LES tienen un mayor número de neutrófilos apoptóticos circulantes en comparación con controles sanos y esto se correlaciona positivamente con actividad de la enfermedad y niveles de anti-dsDNA. El suero de pacientes con LES puede inducir apoptosis en células presentadoras de antígeno (APC) y linfocitos y está asociado con consumo del complemento.⁷⁰

7.3) Los defectos en los mecanismos de depuración contribuyen a LES:

Si bien la apoptosis se considera una forma silenciosa de muerte, defectos en el aclaramiento de células apoptóticas pueden resultar en necrosis secundaria y conducir a autoinmunidad. El programa de aclaramiento apoptótico es un programa altamente redundante, de varios niveles y defectos en los receptores de células apoptóticas y se han observado moléculas puente en la patogenia del LES.⁷⁰

Además de la exposición de la fosfatidilserina por parte de las células apoptóticas, para lograr un correcto aclaramiento es necesario también la opsonización por proteínas séricas, incluida la proteína C reactiva (PCR), proteína amiloide sérica (SAP), proteína relacionada con pentaxina (PTX3), IgM, la unión a manosa-lectina (MBL) y el complemento C1q. PCR y SAP son pentaxinas cortas producidas por el hígado en respuesta a la interleucina 6 (IL-6) y PTX3 es una pentaxina larga que se genera de una variedad de tejidos después de la estimulación de los TLR y en respuesta a citocinas inflamatorias. La PCR interactúa con polisacáridos y fosfocolina expuestos en células apoptóticas y media la activación de la vía clásica del complemento. Asimismo opsoniza las células y media su eliminación al interactuar con el receptor Fc de células fagocíticas. Se han observado anomalías en la función y expresión de la PCR en el LES. Los pacientes con LES producen autoanticuerpos contra la PCR y esto se ha relacionado con la actividad de la enfermedad, los niveles de anti-dsDNA y con la nefritis lúpica.⁷⁰

Por otro lado, la presencia del C1q y de la fracción C4 del complemento mejoran la opsonización y el aclaramiento de restos apoptóticos. Estudios evidencian que pacientes con LES presentan niveles bajos de estos componentes.⁷⁰

7.4) Genes implicados en la apoptosis:

La apoptosis es un mecanismo que intenta evitar la acumulación de células no funcionales en los tejidos. Si la apoptosis se altera, se acumulan mutaciones que pasan de células progenitoras a células hijas, y esto lleva a el desarrollo de ciertas enfermedades, tales como cáncer, EAS, y trastornos neurodegenerativos, entre otras.

La apoptosis está regulada por una gran familia de genes, que conducen a los cambios morfológicos y bioquímicos de las células durante este proceso. Entre estos genes se destacan: BCL-2, TNF, FAS y FAS ligando, TRAIL, y el TP53, siendo este último uno de los reguladores más importantes. (Tabla 4) Abordaremos más en detalle al TP53.⁷⁶

Gen	Proteína codificada	Via de muerte celular	Fenotipo Mutante
FAS or FASLG	Fas or FasL	Apoptosis	Linfadenopatía, esplenomegalia, autoanticuerpos, hipergammaglobulinemia, glomerulonefritis
BCL2	Bcl-2	Apoptosis	Respuesta prolongada de anticuerpos, ANA, depósito de inmunocomplejos, enfermedad renal
BCL2L11	Bim	Apoptosis	Esplenomegalia, linfadenopatía, daño glomerular, proliferación interglomerular
TNFSF13B	BAFF	Apoptosis	Expansión de células B maduras y células T efectoras, anti-ADN, depósito glomerular
TNFRSF13B	TACI	Apoptosis	La eliminación de TACI en las células B previene la enfermedad renal inducida por BAFF, pero los ratones TACI ^{-/-} desarrollan glomerulonefritis fatal
PTEN	PTEN	Apoptosis	Anti-ADN, ANA, depósito de IgG glomerular
TP53	P53	Apoptosis	Glomerulonefritis con depleción de células Treg esplénicas
C1QA	C1q	Apoptosis y necrosis	Disminución de la supervivencia, formación de autoanticuerpos, glomerulonefritis, cuerpos celulares apoptóticos glomerulares
CYBB	NOX2	NETosis	Esplenomegalia, ANA, proteinuria, patología renal

Tabla 4. Genes relacionados a apoptosis y autoinmunidad.⁷⁰

8) GEN TP53:

El gen **TP53**, también conocido como “guardián del genoma”, codifica para la proteína P53 que está situada en el núcleo y tiene capacidad de unión al ADN. Está localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13). Presenta una masa molecular de 43,7 kDa, ocupa 19.200 pares de bases (pb), incluidos 11 exones. Existen varias isoformas de TP53 basadas en el splicing alternativo de TP53; algunos de los cuales juegan roles opuestos en comparación con TP53, mientras que otros tienen funciones similares como TP53 de longitud completa.⁷⁶

8.1) Estructura y función de TP53:

El gen TP53 codifica para una familia de factores de transcripción que interactúan directamente con el ADN y con múltiples proteínas, además de ser el blanco de variadas vías de señalización, a través de las cuales se regula su actividad.

El gen TP53 es una fosfoproteína que se compone de 393 aminoácidos y tiene cinco dominios con importantes funciones (Figura 5):^{76,77}

- Dominio de transactivación: se encuentra ubicado entre los aminoácidos 1 y 42 del extremo amino-terminal, a través del cual interactúa con la proteína MDM2.
- Dominio rico en prolina: conservado en la mayoría de las especies. Localizado entre los aminoácidos 40 y 92, contiene a su vez un segundo dominio de transactivación.
- Dominio de unión al ADN: entre los aminoácidos 101 y 306. Comprende las regiones de alta conservación evolutiva (HCD) II, III, IV y V, lo que explica similaridad de funciones entre especies. Es el sitio de ocurrencia del 90% de las mutaciones halladas en los tumores cancerosos humanos.
- Dominio de oligomerización: entre los aminoácidos 307 y 355. Contiene una región llamada TET, con secuencias de aminoácidos señalizadoras que tienen localización nuclear (NLS) o citosólica (NES) de la proteína. Su estructura secundaria corresponde a una lámina, seguido por una hélice, necesaria para la dimerización de TP53.
- Dominio carboxi-terminal: extendido entre los aminoácidos 356 y 393. Con tres señales NLS y un dominio que reconoce sitios de daño del ADN, este dominio también está implicado en la actividad de regulación negativa del dominio de unión con el ADN localizado entre los aminoácidos 101 y 306.^{76,77}

Otros autores, dividen a TP53 humana en 3 dominios: dominio de unión al ADN, el dominio trans-activacional N-terminal, y el dominio de oligomerización C-terminal.^{76,78}

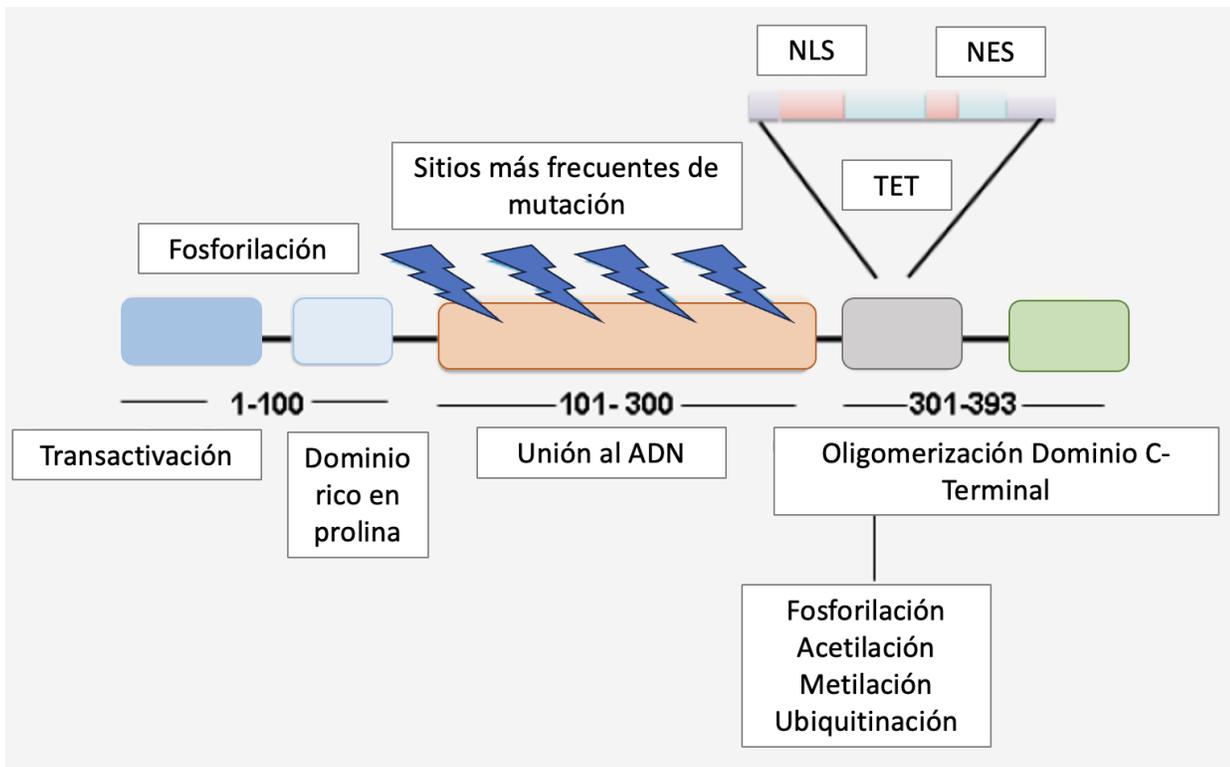


Figura 5. Estructura de TP53. ⁷⁷ Modificado de: Chuaire-Noack L, Sánchez-Corredor MC, Ramírez-Clavijo S. TP53 y su papel en el epitelio superficial del ovario. Revisión. Investigación Clínica 2008; 49 (4): 561-593.

El gen TP53 es un supresor tumoral, por esto se entiende a aquellos genes normales que inhiben el crecimiento, la división y la diferenciación celular.

Se considera que se comportan como genes recesivos, ya que se requiere una mutación o un cambio epigenético que inhiba la función de los dos alelos del gen para perder su actividad y favorecer la transformación maligna de la célula. TP53 juega un papel emergente en varios procesos fisiológicos y coordina diversas respuestas celulares al estrés y al daño. En condiciones normales, se expresa a bajas concentraciones en varios tejidos, mientras que presenta una regulación en más en tejidos dañados, en tumores o durante la inflamación. Es un reconocido factor de transcripción con importantes efectos reguladores sobre el genoma. Presenta acción sobre varios genes que regulan el ciclo celular, la reparación del ADN, la apoptosis, la autofagia, la necroptosis, la senescencia, el desarrollo de células madre, y la regulación inmune.⁷⁹

Es el gen más frecuentemente mutado en tumores humanos, pudiendo originarse de mutaciones somáticas o germinales. La frecuencia con la que se presentan las mutaciones somáticas en los cánceres humanos supera el 50%. Por otro lado, las mutaciones en la línea germinal son

menores en frecuencia y pueden originar un síndrome de predisposición hereditaria al cáncer llamado Li Fraumeni. Los individuos que portan dicha mutación presentan elevado riesgo de presentar una serie de neoplasias en las que se incluyen cáncer de mama, leucemia, sarcomas, tumores del SNC y cáncer de la corteza suprarrenal. ^{76,77}

La regulación negativa efectuada por TP53 en respuesta al daño del ADN, consiste en detener el ciclo celular para que ocurran los procesos de reparación del ADN. De esta manera se evita la proliferación de células con el ADN dañado, activándose el proceso de apoptosis en la célula afectada cuando la reparación no es posible. ^{76,77}

En condiciones normales el nivel de degradación de TP53 es mayor que el de formación de la proteína. Su degradación está mediada por la interacción con enzimas ubiquitín E3 ligasas HDM-2 (homólogo humano de murine double minute 2), también conocida como MDM2; pirh2 (proteína inducida por TP53, con un dominio dedos de zinc llamado RING-H2); COP1 (fotomorfogénico 1 constitutivo) y ARFBP17HectH9, con las que forma complejos estables, lo que bloquea su acción como factor de transcripción, impidiendo su unión con las secuencias blanco de ADN y favoreciendo su ubiquitinación y posterior proteólisis. ^{76,77}

La **proteína MDM2** tiene 90 kilodaltons (kD), es codificada por un oncogén cuya sobreexpresión inhibe la activación de genes supresores tumorales asociados a TP53. Numerosas proteínas con función inhibidora o activadora pueden actuar sobre MDM2 para modificar su afinidad por TP53 y llevar por tanto a su degradación o a su estabilización. Ejemplos de esto son la actividad quinasa de ATM, ATR, ChK1, ChK2 o ADN-PK que fosforilan a la proteína en las serinas 15 y 20 y en la treonina 18 del extremo N-terminal. Como resultado, TP53 cambia su conformación espacial, lo que hace que pierda afinidad por la proteína MDM2 y se disocie de esta. Otro ejemplo es la peptidilprolilisomerasa (PIN1) que también facilita la disociación de MDM2 cuando TP53 es fosforilada en la serinas 33 y 315 y en la treonina 81. ^{76,77}

Los reguladores más importantes de la interacción TP53-MDM2 pueden ser inhibidores o activadores. Dentro de las proteínas inhibidoras destacamos a ARF y las proteínas ribosomales L5, L11 y L23 que realizan una regulación negativa sobre MDM2 y por ende promueven la estabilidad de TP53. Por otro lado la oncoproteína gankyrina, la proteasa específica asociada al herpes virus (HAUSP) y la proteína asociada a queratina KAP1, actúan como reguladores positivos sobre MDM2, de esta forma potencian la ubiquitinación y subsiguiente degradación de TP53. ^{76,77} (Figura 6)

Hay una atención creciente para desarrollar diferentes estrategias que pueden modular las vías apoptóticas dependientes de TP53, tales como la inhibición de la interacción TP53-MDM2, usando inhibidores de MDM2. ^{76,77}

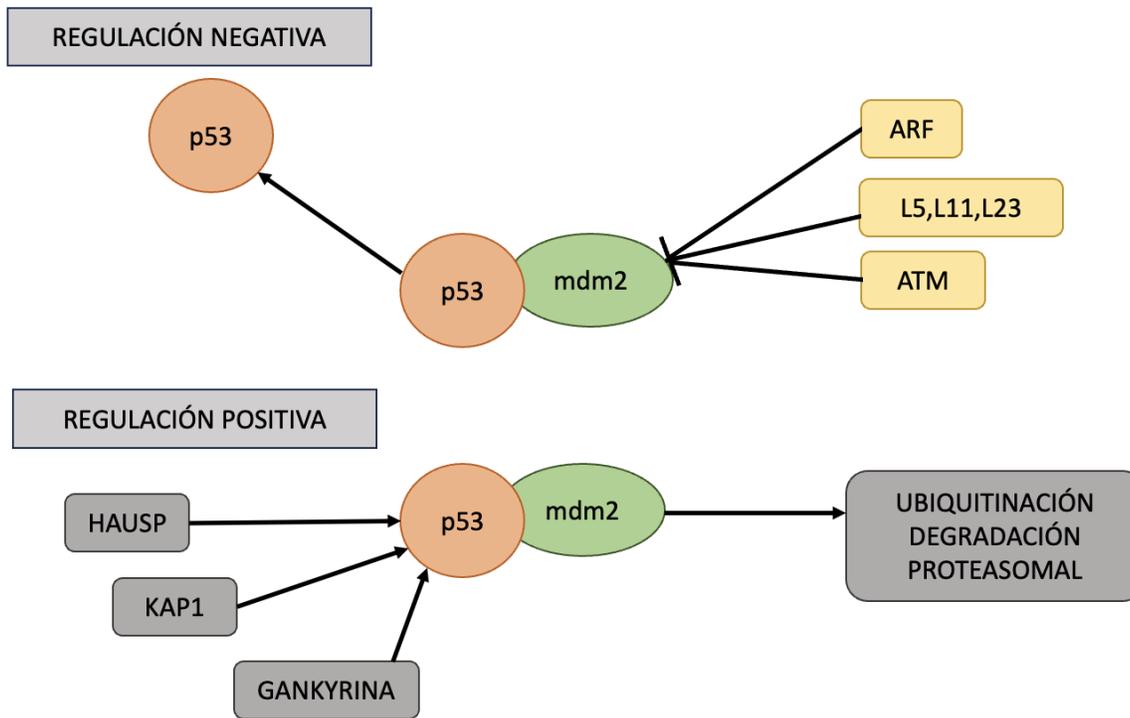


Figura 6. Reguladores de la interacción TP53-MDM2. ⁷⁷ Modificado de: Chuaire-Noack L, Sánchez-Corredor MC, Ramírez-Clavijo S. p53 y su papel en el epitelio superficial del ovario. Revisión. Investigación Clínica 2008; 49 (4): 561-593

8.2) Estabilización y Activación de TP53:

Existen diversos agentes que pueden ocasionar daño en el ADN, a saber: agentes físicos como la radiación ionizante (rayos X y ultravioleta), químicos (hipoxia, aumento de la concentración de radicales libres), o cambios metabólicos o en el pH.

Estos daños en el ADN generan señales de estrés que conducen al aumento en la cantidad y de la estabilidad de TP53 (siendo el aumento proporcional a la magnitud del daño). ^{76,77}

En los casos donde el daño se debe a una ruptura de doble cadena del ADN, se activan proteínas que son sensores de este daño, entre las que destacamos 3 de ellas las cuales son quinasas nucleares de serina-treonina: ATM (gen mutado en la ataxia-telangiectasia), ATR (gen mutado en la ataxia-telangiectasia, relacionado con Rad 3) o ADN-PK. ^{76,77} (Figura 7)

- 1. ATM-ChK2-TP53:** esta vía se activa en respuesta a el daño en ADN y a la presencia

de errores durante la replicación del ADN en el ciclo celular. El producto de ATM (miembro de la familia de las PI3 kinasas(PI3K)), actúa fosforilando directamente a TP53 en la serina 15 y de manera indirecta, en las serinas 15 y 37, mediante la fosforilación de la proteína kinasa ChK2(checkpoint kinase 2). La fosforilación lleva a un cambio de conformación estructural de TP53, lo cual facilita la disociación del complejo TP53-MDM2. ^{76,77}

2. **ATR-ChK1-TP53:** se desencadena luego de que el ADN sufre un daño, la proteína ATR lo reconoce e interactúa con él, aumenta su actividad kinasa, y en conjunto con ATM favorece la formación de un complejo de mayor peso molecular con proteínas presentes en el núcleo, entre las que se encuentra el BRCA-1. ^{76,77}

3. **ADN-PK-TP53:** participa en la reparación de la ruptura de la doble cadena del ADN, mediante la unión de los extremos homólogos o no homólogos. TP53 establece una estrecha relación con la ADN-PK, que tiene como función formar un complejo para detectar la interrupción de la replicación del ADN o actuar como regulador en la vía de apoptosis mediada por TP53, en este caso es fosforilado en la serina 15, lo que favorece la disociación del complejo TP53-MDM2. ^{76,77}

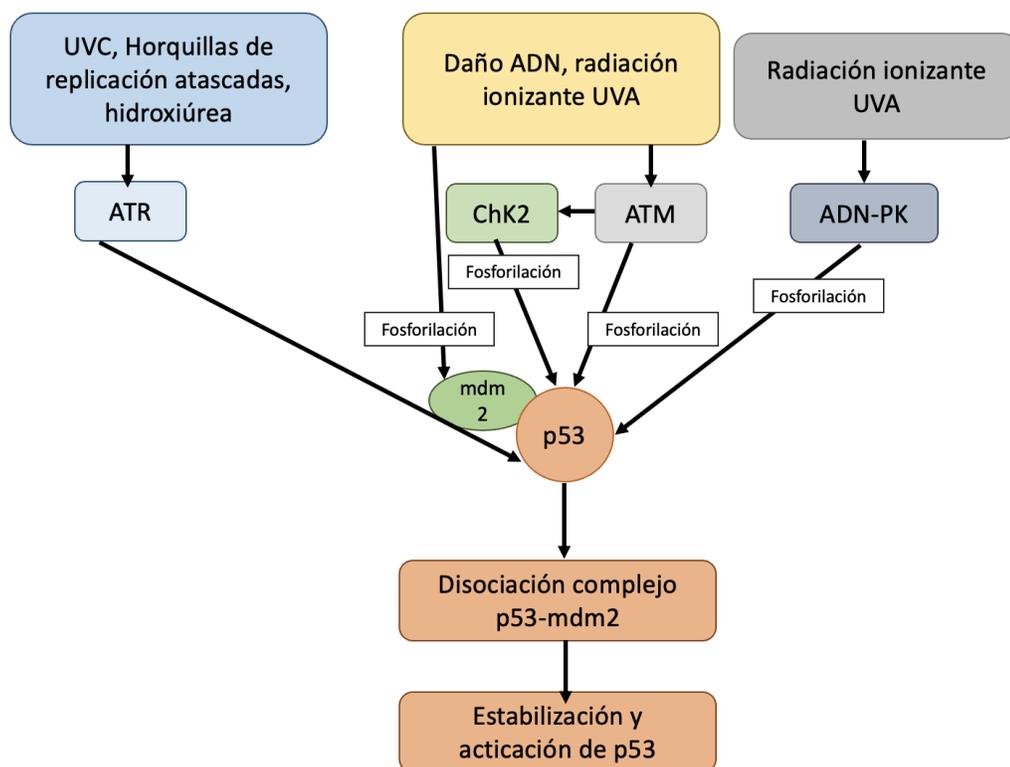


Figura 7. Estabilización de TP53 a través de las vías de señalización ATM, ATR y ADN-PK. ⁷⁷

Otra proteína que interviene en la estabilización y activación del TP53 es **ARF**, p14ARF es un gen al que se le atribuyen diversas funciones tales como regulación de la transcripción, respuesta al daño del ADN, apoptosis, autofagia, supresión tumoral e inducción de senescencia. Cuando se produce estrés o senescencia, ARF estabiliza y aumenta la actividad transcripcional de TP53, generando una regulación negativa sobre MDM2. (Figura 6). Además de actuar sobre MDM2, ARF también puede activar la vía ATR/ChK1, evento fundamental para la efectividad de su función como supresor tumoral, dado que genera la represión transcripcional de genes antiapoptóticos (Bcl-xl), sensibilizando a la célula a la apoptosis. (Figura 7). Por otra parte, ARF puede actuar sobre ATR, e induce la formación del complejo entre ATR y BRCA1. Mediante la fosforilación de serina 15 este complejo lleva a la estabilización y activación de TP53, generando detención del ciclo celular en la célula dañada y apoptosis. ⁷⁷

8.3) Detención del ciclo celular:

Con la estabilización de TP53, su vida media aumenta, lo que lleva a una mayor concentración celular de la proteína, activando la transcripción de genes que participan en los puntos de control del ciclo celular como G1/S o G2/M. Dentro de estos genes debemos destacar a: p21^{WAF-1}, GADD45 (gen 45 de detención del crecimiento e inducible por daño del ADN), que analizaremos a continuación. ⁷⁷

p21^{WAF-1}:

La activación transcripcional de p21^{WAF-1} por parte de TP53 detiene el ciclo celular en el punto de control G1, el producto es una enzima inhibidora universal de las kinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Esta enzima se asocia con ciclinas y con CDKs, así como con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) para formar complejos cuaternarios que impiden la progresión del ciclo y detienen la propagación de mutaciones (Figura 8). Cuando las CDKs están inhibidas, la célula no puede avanzar a lo largo del ciclo celular, lo cual genera el tiempo necesario para lograr reparar el ADN dañado. ⁷⁷

GADD45:

El producto de este gen actúa en el ciclo celular en los puntos de control G1 y G2. En G1 detiene el ciclo mediante su interacción con PCNA, mientras que en G2 inhibe al complejo ciclina B1-CDC2, impidiendo el pasaje a la fase M. GADD45 contribuye además a la estabilidad genómica, participa en los procesos de apoptosis, supervivencia celular e inmunidad innata. ⁷⁷

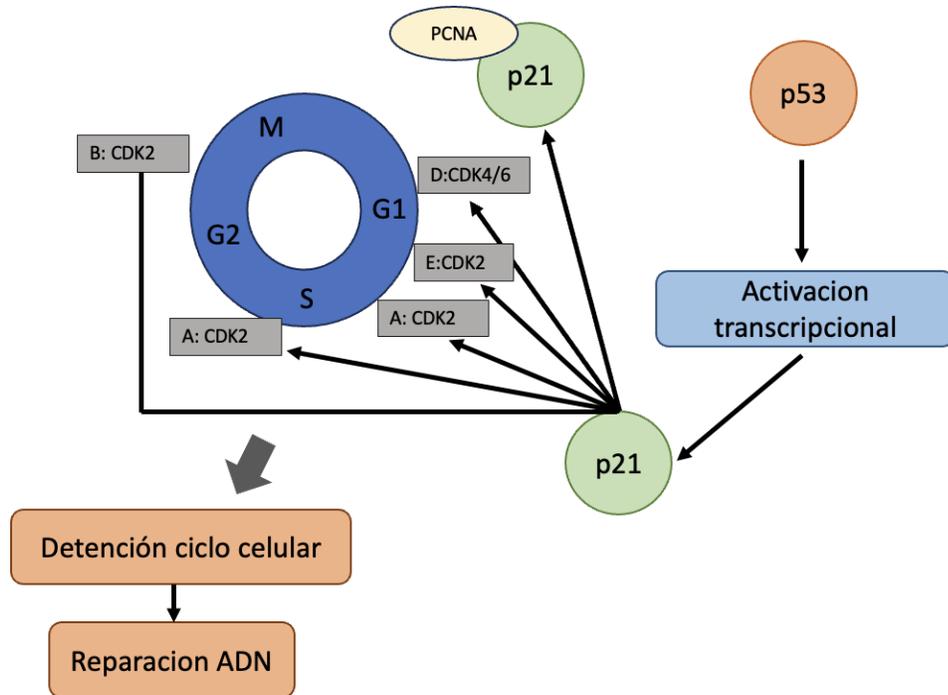


Figura 8. Regulación del ciclo celular por TP53 y P21. ⁷⁷

8.4) Inducción de la apoptosis:

TP53 es un importante inductor de la apoptosis, participa en **mecanismos transcripcionales**, y también en **mecanismos no transcripcionales** que involucran a la vía intrínseca mitocondrial. En ambos casos, se produce permeabilización de la membrana externa de la mitocondria a través de la activación de proteínas proapoptóticas de la familia BCL-2, como BAX y BAK. ^{77,80,81}

Mecanismos Transcripcionales:

Como factor de transcripción, TP53 actúa como promotor de genes tales como: PUMA, NOXA, BCL-2, BAX, Apaf-1, TP53A1P1, IGF-BP3, DR5/KILLER, Fas/Apo-1, PIG, PAG608, PERP, PIDD, DRAL y Scotin. ^{77,80,81}

NOXA y PUMA: pertenecen a la subfamilia de genes BCL-2 (codifican para proteínas proapoptóticas). NOXA y PUMA se unen a las proteínas BCL-2 y BCL-xl respectivamente. Esto causa la inhibición de Bcl-2 y BCL-xl, y genera que BAX y BAK puedan ejercer su efecto proapoptótico. BAX y BAK a su vez, se unen a la membrana mitocondrial externa, llevando a la formación de poros que permiten la liberación de proteínas al citosol. Esto genera una alteración en el potencial transmembranal y la liberación del citocromo c. ^{77,80,81} (Figura 9)

BCL-2 y BAX: TP53 puede regular en forma directa la transcripción de BCL-2, actuando como transrepressor de este gen. En relación a BAX, cuando TP53 interactúa con este, la proteína generada promueve la liberación del citocromo c, desde el espacio intermembranoso de la mitocondria hacia el citosol, lo que lleva a la activación de la cascada proapoptótica de las caspasas.^{77,81} (Figura 9)

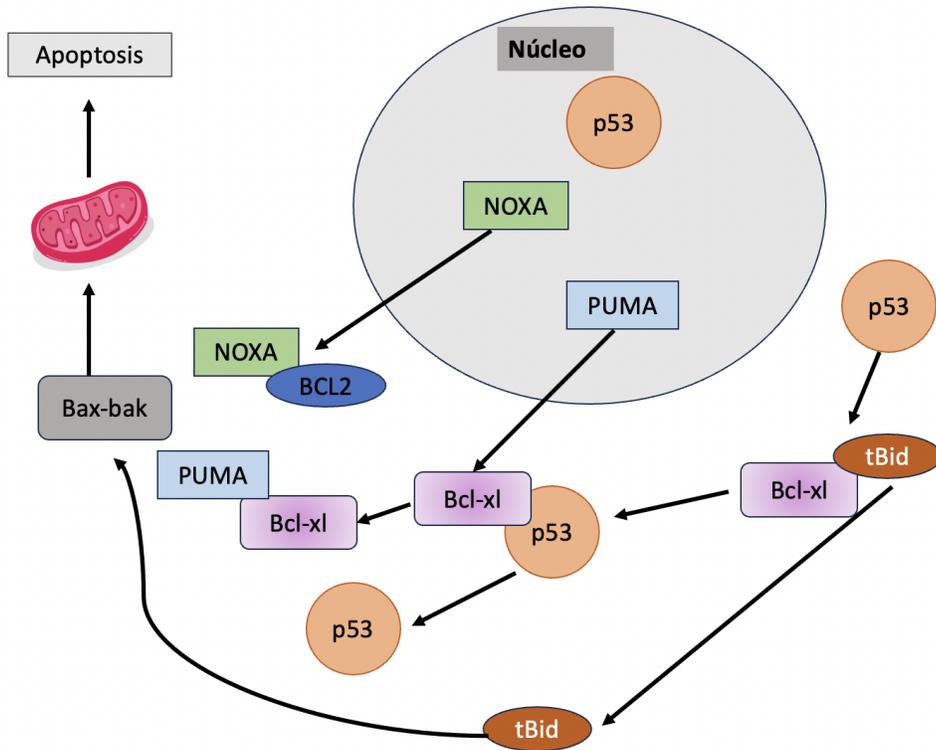


Figura 9. Participación de TP53 en la vía intrínseca de la apoptosis⁷⁷

Mecanismos no transcripcionales:

TP53 a su vez puede ser translocado a la membrana mitocondrial, donde interactúa con la proteína BAK, generando una disociación de un complejo formado por BAK y una proteína antiapoptótica del grupo BCL-2, llamada MCL1 (inhibidor de BAK). BAK entonces liberado de su inhibición induce a la muerte celular programada.⁸²

En la membrana mitocondrial, TP53 provoca además la liberación rápida de citocromo c y se une por medio de su dominio central con regiones específicas de las proteínas BCL-2 y BCL-xl antiapoptóticas. Esto explica por qué las mutaciones del gen en esa región alteran la unión con BCL-xl, aunque la translocación a la mitocondria permanezca intacta.

Se ha demostrado que la localización mitocondrial de TP53 depende de un polimorfismo de este gen localizado en el codón 72. La presencia de arginina en dicho polimorfismo hace que TP53 tenga mayor afinidad por la proteína MDM2, y una mayor eficiencia para inducir la apoptosis.⁷⁷

8.5) Gen TP53 y LES:

TP53 está localizado en la región del cromosoma 17p13.1 que se encontró tendría asociación con la susceptibilidad de desarrollar LES.^{85,86} Basándonos en las importantes funciones de este gen y en su importante localización, podría ser considerado uno de los genes que contribuyen a la patogénesis del LES.⁸⁷ Se han desarrollado algunos estudios en distintas poblaciones, que describen la asociación entre LES y TP53.⁸⁵⁻⁸⁸

Estudios previos han demostrado que existe un aumento en la expresión de TP53 y de los anticuerpos anti-TP53 en pacientes con LES. Así mismo, se encontró una correlación significativa entre los niveles de TP53 y el índice de actividad de la enfermedad.^{83,84}

9) POLIMORFISMOS DEFINICIÓN Y NOMENCLATURA:

El Proyecto del Genoma Humano evidenció que el genoma humano contiene 20.000 genes y que únicamente un 5% participa en la codificación de información, mientras que la función del resto es hasta ahora desconocida. Por otra parte, se reveló la existencia de aproximadamente 10 millones de polimorfismos de nucleótido único.^{89,90}

Los polimorfismos son cambios en la secuencia de ADN que generan una alteración genética no letal para una célula y se estima en más de un 1% de la población. Se distinguen terminológicamente de las mutaciones únicamente por su frecuencia.^{89,90}

Los polimorfismos los podemos dividir en aquellos de nucleótido único o polimorfismos de secuencias repetidas, entre otros. Estos últimos, tienen una mayor aplicación en el diagnóstico genético y son conocidos como VNTR (variable number of tandem repeats) minisatélites y VNTR-microsatélites o STR (short tandem repeats). En ambos casos presentan un número variable de repeticiones en tándem. En esta tesis nos centraremos en los Polimorfismo de nucleótido único (SNP).^{89,90}

Polimorfismo de nucleótido único (SNP):

Los SNP son el tipo de polimorfismo más frecuente en el ADN, ya que se registran aproximadamente cada 1.000 nucleótidos en el genoma. La gran mayoría de los SNP presentan dos alelos los cuales están representados por una sustitución de base por otra. En las

poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en alelo principal o “silvestre” y alelo raro o mutante, clasificación basada en la frecuencia observada en las poblaciones. Debido a que los humanos son diploides, un individuo puede tener uno de tres genotipos: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto, u homocigoto para el alelo menos frecuente.

Los SNPs pueden estar presentes en **regiones codificantes**, pudiendo afectar la función de la proteína, a este tipo de SNPs se los conoce como “**no sinónimos**”. Por otro lado, los SNPs “sinónimos”(o silenciosos) no alteran la conformación de la proteína, pese a esto, se ha descrito que algunos de estos pueden intervenir en la regulación de la expresión génica.^{89,90}

Según su localización en el genoma, los SNPs se clasifican en: iSNP, si están localizados en regiones intrónicas; cSNP, en regiones codificantes (exones); rSNP, en regiones reguladoras, y gSNP, localizados en regiones intergenómicas. Los cSNP pueden estar representados por SNPs sinónimos (sSNP) o no sinónimos (nsSNP).^{89,90}

La variabilidad fenotípica de cada individuo, así como la susceptibilidad o el no desarrollo de ciertas enfermedades radica en gran parte en los SNPs, el ADN está expuesto a un sin número de alteraciones que pueden dar como resultado el riesgo de desarrollo de una enfermedad.^{89,90}

9.1) Estudio de polimorfismo en la práctica clínica:

El campo del diagnóstico molecular surgió en la segunda mitad del siglo XX. Primero surgieron las técnicas para determinación de cariotipo y posteriormente las pruebas basadas en el ADN, como la inmunotransferencia de Southern. En la evolución surgen otras técnicas como la secuenciación de ADN Sanger (1977), y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en 1983. Estas últimas dos técnicas, empleadas conjuntamente, permitieron la secuenciación sistemática de cualquier segmento conocido de ADN, llevando al desarrollo de diagnósticos dirigidos.

En la actualidad, con la conclusión del Proyecto Genoma Humano y con el desarrollo de nuevas técnicas, cada vez más potentes, de análisis genético y genómico, los análisis basados en ácidos nucleicos están empezando a adquirir una función cada vez más importante en el diagnóstico y tratamiento de numerosas enfermedades.

El número de técnicas y de indicaciones para realizar pruebas diagnósticas de genética molecular es cada vez más extenso, tanto para las anomalías genéticas hereditarias como adquiridas. Debido a esta gran oferta, la elección de la técnica más adecuada, muchas veces resulta difícil.

Para elegir la técnica diagnóstica apropiada, es esencial, en primer lugar, conocer el espectro de

las anomalías genéticas responsables de una enfermedad en la población de pacientes en estudio. Las anomalías genéticas causantes de enfermedad pueden variar desde sustituciones de una sola base hasta pérdida o ganancia de cromosomas enteros, siendo también muy variable la frecuencia según los grupos étnicos.

El análisis mediante PCR, ha constituido la base del diagnóstico molecular en las últimas décadas. Consiste en la síntesis de fragmentos de ADN relativamente cortos a partir de un ADN molde. Utilizando polimerasas de ADN termoestables adecuadas y ciclado térmico (termociclador), el ADN diana situado entre dos cebadores o primers designados, se amplifica exponencialmente a partir de una copia original. Para dicho análisis posterior existen numerosas opciones, entre las que destacamos la secuenciación Sanger, el Análisis de longitud de fragmentos de restricción, la Pirosecuenciación, PCR en tiempo real, entre otras. Cada una de estas técnicas tiene diferentes ventajas e inconvenientes. Nos referiremos a las dos primeras ya que son las que utilizamos en este proyecto de investigación.

Secuenciación de Sanger: el ADN amplificado se combina con una ADN polimerasa, un cebador de ADN, nucleótidos y cuatro nucleótidos terminales (terminadores didesoxi) (A, T, G y C), con fluorocromos. La consiguiente reacción produce una serie de moléculas de ADN de todas las longitudes posibles, de hasta en torno a 1 kb, cada una con un marcador que corresponde a la base en la que la reacción se detiene, por incorporación de uno de los nucleótidos terminales. Luego se realiza separación de tamaños por electroforesis capilar con detección automatizada de los fragmentos de ADN marcados fluorescentemente, proporcionando la secuencia ordenada de los fragmentos en cromatogramas. La secuencia del ADN inicial a partir de los fragmentos de ADN secuenciados, se deduce bioinformáticamente por análisis de secuencias solapadas de los fragmentos de ADN. (Figura 10).

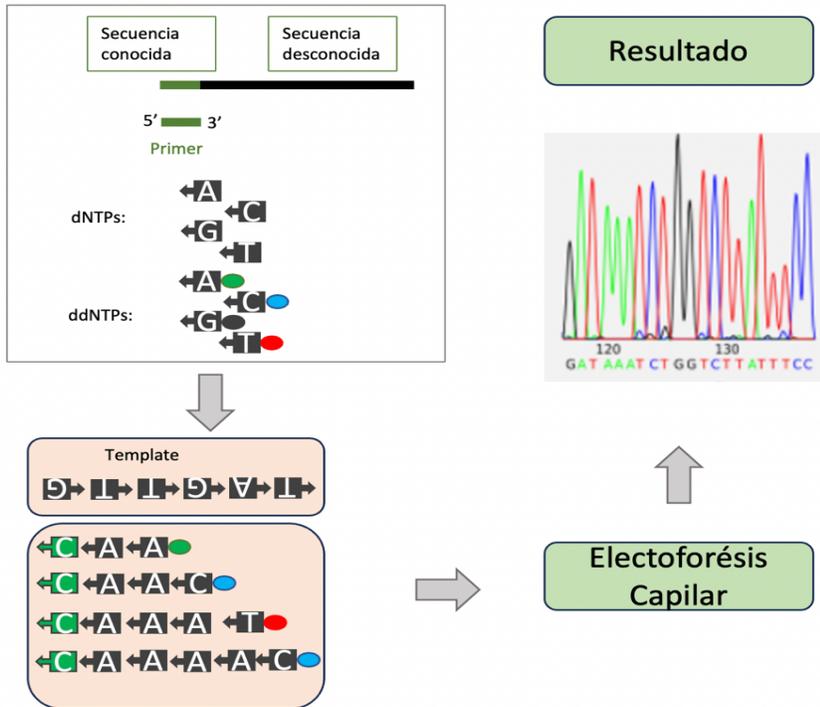


Figura 10. Secuenciación Sanger.

Análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP): esta técnica presenta la ventaja de la digestión por enzimas de restricción. Las enzimas de restricción son endonucleasas que cortan los enlaces fosfodiéster del ADN en secuencias específicas denominadas secuencia diana. Esta secuencia tiene una longitud de entre 4 a 8 pares de bases presentes en el interior de una molécula de ADN, por lo general es palindrómica. Una secuencia palindrómica es aquella que se lee de la misma manera en un sentido y en el otro, por ejemplo: **5'AATTCGAATT3' 3'TTAAGCTTAA5'**.

La secuencia diana puede a su vez presentar extremos romos o extremos cohesivos. (Figura 11). Por lo tanto, los RFLP son secuencias dianas (o secuencias de restricción), que son reconocidas y cortadas por enzimas de restricción, que varían en los distintos individuos, por lo que se dice que la población es polimórfica para estos fragmentos de restricción.

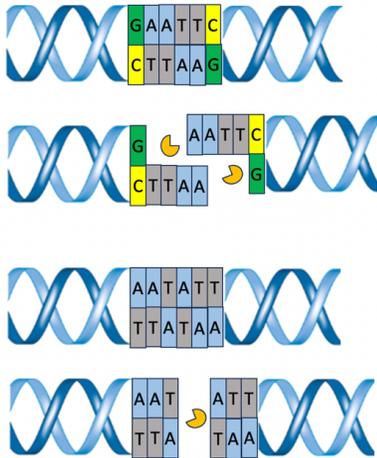


Figura 11. Secuencias de restricción palindrómicas con extremos cohesivos (arriba), con extremos romos (abajo).

Luego de realizar la extracción del ADN y la PCR de gen en estudio, que va a dar lugar a un fragmento amplificado (amplicon) que se evidenciará mediante electroforesis, se debe realizar la digestión del producto amplificado por PCR con la enzima de restricción que cortan formando fragmentos de distintas longitudes. Posteriormente los fragmentos de restricción se separan mediante electroforesis en geles de agarosa a través del cual corren debido a un campo eléctrico y su disociación obedece a la masa de las muestras. Por último, se generan fragmentos de tamaños diferentes que se identifican como bandas distintas en la electroforesis, pudiendo los individuos ser: homocigotas para un alelo o heterocigotas.

Esta técnica es de aplicación menos amplia que la secuenciación directa, pero es útil para el diagnóstico molecular de aquellas mutaciones o polimorfismos que se registran en una posición nucleotídica invariable. (Figura 12)

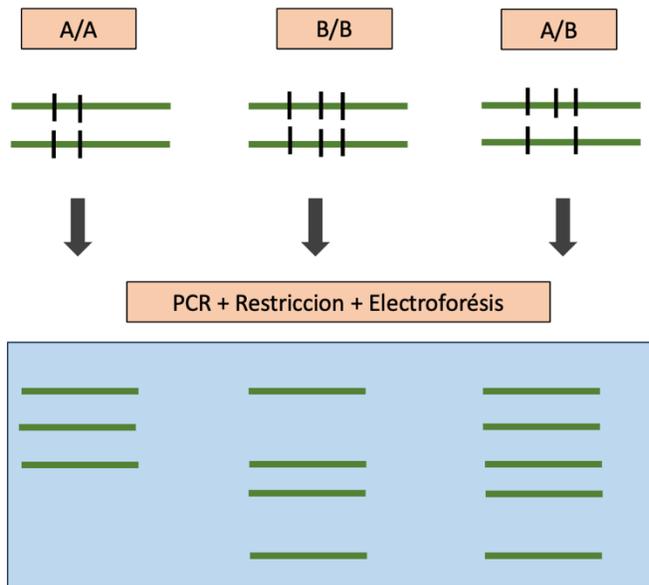


Figura 12. Gel de electroforesis. Genotipo A/A: presenta en ambos alelos 2 sitios de restricción, por lo que genera 3 fragmentos de restricción de distinta longitud. Este individuo es homocigota para A. Genotipo B/B: presenta en ambos alelos 3 sitios de restricción, por lo que genera 4 fragmentos. Este individuo es homocigota para B. Genotipo A/B: presenta en un alelo 3 sitios de restricción y en el otro alelo 2 sitios de restricción, se generan 5 fragmentos. Este individuo es heterocigota A/B.⁹¹

10) POLIMORFISMOS DE CODÓN 72 DE TP53:

Se describieron múltiples polimorfismos del gen TP53, dentro de estos, el más frecuente es la variación de G/C en la segunda posición del codón 72 en el exón 4, conocido como **polimorfismo del codón 72** (rs1042522). El mismo es una isoforma de los productos de TP53 que genera dos variantes que se originan por el reemplazo del aminoácido codificado en dicha posición, pudiendo ser arginina (CGC) o prolina (CCC).^{93,94}

La frecuencia de dicho polimorfismo, varía en las distintas poblaciones. Es así como la variante Arg72 es más común en individuos afroamericanos, mientras que la variante Pro72 se detecta con mayor frecuencia en eurodescendientes. (Tabla 5). La población uruguaya es de mestizaje, no hay estudios de frecuencia de dicho polimorfismo en el país.

Población	Tamaño muestral	Alelo Ref	Alelo Alt
Total	105516	G=0.285663	C=0.714337
Europeo	90388	G=0.26336	C=0.73664
Africano	2988	G=0.6854	C=0.3146
Africanos otros	132	G=0.841	C=0.159
Africano-Americano	2856	G=0.6782	C=0.3218
Asiático	3230	G=0.4152	C=0.5848
Este Asiático	2594	G=0.3774	C=0.6226
Asiaticos otros	636	G=0.569	C=0.431
Latino-Americanos 1	668	G=0.421	C=0.579
Latino-Americanos 2	390	G=0.341	C=0.659
Sur Asiáticos	198	G=0.566	C=0.434

Tabla 5. Frecuencia de alelos en distintas poblaciones. ⁹² Extraído de: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1042522#frequency_tab

Pro72 se encuentra dentro de una región rica en prolina y puede causar cambios en la estructura del dominio de unión al ADN en TP53. La variante Pro72 induce la detención del ciclo celular y la reparación del ADN. También se ha informado que la variante Arg72 es más eficiente para inducir apoptosis debido a su mayor capacidad para interactuar con MDM2 que la variante Pro72. A su vez, debido a que TP53 puede ser translocado a la membrana mitocondrial, donde interactúa con la proteína BAK (proapoptótico) (Figura 9), se cree que el homocigoto para el alelo Arg72 es más eficaz para inducir apoptosis que el alelo Pro72. ^{93,94}

10.1) Polimorfismos de codón 72 de TP53 y cáncer:

Las células tumorales sufren cambios morfológicos y funcionales. Estos últimos, confieren a las células características esenciales para el crecimiento y desarrollo tumoral, uno de estos cambios es la capacidad de evasión de la apoptosis. Esto podría explicar la asociación del alelo Pro72 con la menor propensión a inducir apoptosis que el alelo Arg72 y por ende con el mayor riesgo de carcinogénesis.^{93,94}

Investigadores como Toyama et al. en el 2007 reportaron a la **variante pro72** con un papel crucial en la **susceptibilidad y la progresión del cáncer**. Posteriormente, cada vez más científicos han asociado la variante Pro72 de este polimorfismo con aumento de riesgo de distintas neoplasias como son cáncer de mama, cuello uterino, estómago, colonrecto, ovario, entre otras.⁹⁵⁻⁹⁸

El grupo de trabajo de Toyama et al. evidenciaron que el polimorfismo no solo predispondría a riesgo de cáncer de mama, sino que también el mismo podría predecir la mortalidad. Tal es así que informaron que el genotipo Pro/Pro del codón 72 de TP53 puede ser un factor pronóstico independiente para pacientes con cáncer de mama. En este estudio, el genotipo Pro/Pro se asoció con una supervivencia libre de enfermedad disminuida en comparación con otros genotipos.⁹⁹

10.2) Polimorfismo del Codón 72 y riesgo de desarrollo de enfermedades autoinmunes:

Como hemos descrito previamente la apoptosis interviene en múltiples procesos a nivel del sistema inmunitario. En los mecanismos de tolerancia central y periférica de los LB y LT los defectos en la apoptosis pueden llevar a la pérdida de autotolerancia y conducir a autoinmunidad. La apoptosis depende de múltiples procesos siendo TP53 un regulador clave de esta. El polimorfismo del codón 72 como hemos evidenciado, interviene en la patogenia de distintas neoplasias malignas.

¿Existe relación entre cáncer y autoinmunidad?

Probablemente exista una interrelación entre el cáncer y la autoinmunidad, sabiendo que estas dos patologías comparten mecanismos patogénicos en común, siendo los defectos en la apoptosis probablemente uno de los mecanismos centrales. Esto lleva a plantear: *¿el polimorfismo de codón 72 influirá en el riesgo de desarrollo de enfermedades autoinmunes?* Es así, como ciertos investigadores demostraron que este polimorfismo no solo tendría participación en el riesgo de cáncer, sino que también participaría en el riesgo de desarrollo de enfermedades autoinmunes órgano-específicas (Diabetes Mellitus 1, colitis ulcerativa, Tiroiditis Autoinmune) así como también sistémicas (LES y AR).

Dentro de las órgano-específicas se destaca la asociación de genotipo Arg/Arg y la Diabetes Mellitus 1 (DM1).¹⁰⁰ Otros estudios indican que el polimorfismo del codón 72 de TP53 podría considerarse un marcador genético para predecir el aumento de la susceptibilidad a algunas complicaciones y comorbilidades de la DM 1. Destacando al genotipo Pro/Pro asociado con un mayor riesgo de complicaciones microvasculares.¹⁰⁰

Un estudio en una población coreana mostró asociación entre variante Pro72 y LES.⁸⁷ En este estudio, se evidenció que el sitio donde se genera el polimorfismo es necesario e importante para iniciar la apoptosis. Es así que, las dos variantes resultantes del polimorfismo de TP53 se ha demostrado son funcionalmente distintas y de esta forma generan distinta susceptibilidad a LES. La variante Arg72 induce apoptosis más eficientemente que la variante con Pro72. Por el otro lado, la variante Pro72 induce mayor pasaje de células a la fase G1 del ciclo celular.¹⁰¹ Por lo tanto, la variante Pro72 presenta menor capacidad de inducir apoptosis y esta desregulación de la apoptosis se ha considerado que contribuye a la patogenia de LES. De esta forma, se ha sugerido que aquellos individuos que sean portadores del polimorfismo de TP53 de la variante Prolina tendrán mayor riesgo de desarrollo de LES que aquellos con la variante de arginina.⁸⁷ Por el contrario, estudios en otras poblaciones africanas, asiáticas y españolas no encontraron diferencias significativas entre ambas variantes.^{85, 102, 103}

Un metanálisis publicado en el 2012 por Lee et al. de 10 estudios con 1.500 pacientes con LES y/o AR y más de 3000 controles, demostró que la variante prolina en el polimorfismo del codón 72 de TP53 puede conferir susceptibilidad al LES en los asiáticos, pero no en los europeos.⁸⁷

DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION E HIPOTESIS:

La etiología del LES es desconocida, pese a esto múltiples factores intervienen en su desarrollo entre los que se destacan los factores genéticos y los inmunitarios, teniendo dentro de estos últimos un rol fundamental la apoptosis.

La apoptosis juega un rol primordial en el LES por tres mecanismos: 1) existe un aumento en la actividad apoptótica que lleva a una mayor expresión de autoantígenos, lo que conduce a la inducción de respuestas autoinmunes en LES; 2) defectos en la apoptosis en los mecanismos de tolerancia central y periférica de los LB y LT que llevan a pérdida de autotolerancia. 3) Alteración en la depuración de los restos apoptóticos.

La apoptosis depende de múltiples procesos siendo TP53 un regulador clave de esta. Son pocos y controversiales los estudios relacionados a las variantes del polimorfismo del codón 72 y el riesgo de desarrollo de LES. Actualmente es desconocida la frecuencia de las distintas variantes del polimorfismo, así como su probable asociación con la actividad y el

daño acumulado. Hasta el momento no se han realizado estudios en nuestra población que demuestren asociación entre polimorfismos del codón 72 y el riesgo a desarrollo de LES.

Esta fue la motivación para desarrollar este proyecto. El conocimiento de estos aspectos, nos permite profundizar en la patogenia del LES, el hallazgo de nuevos biomarcadores de riesgo y eventuales nuevos blancos terapéuticos.

La hipótesis de nuestro estudio, es que la presencia de la variante Pro72 relacionada con una apoptosis defectuosa, podría conducir a un mayor riesgo de desarrollo de LES.

OBJETIVOS:

El Objetivo General del presente estudio es contribuir al conocimiento de mecanismos moleculares implicados en la patogenia del LES, valorando la existencia de asociación entre polimorfismo del codón 72 de TP53 y el desarrollo de LES en la población uruguaya.

Los Objetivos específicos son:

1. Poner a punto de la técnica PCR-RFLP para el análisis del polimorfismo del codón 72 de TP53.
2. Describir características de la población en cuanto a: datos demográficos, comorbilidades, manifestaciones clínicas, fenotipo serológico, actividad y daño acumulado de la enfermedad.
3. Valorar la frecuencia con la que se presenta el polimorfismo en los casos y en los controles y comparar con datos de genomas uruguayos.
4. Correlacionar los hallazgos moleculares con el fenotipo clínico.
5. Valorar si existe relación entre el polimorfismo y la actividad y/o daño acumulado del LES.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Se realizó un estudio analítico, observacional, longitudinal y retrospectivo, estudio de casos – controles, en el periodo comprendido entre Junio del 2018 y Diciembre del 2020. La población de casos fueron pacientes con LES, asistidos en consulta ambulatoria de EAS o durante su internación en el Hospital Maciel, Montevideo, Uruguay. La población de controles fueron personas que concurrieron a policlínica de medicina interna o pacientes internados en el Hospital Maciel.

Se seleccionaron un total de 92 participantes (46 casos y 46 controles).

Se consideró caso a aquellos pacientes que cumplían con criterios de clasificación para LES basados en ACR/EULAR SLICC del 2012.²⁰ Se consideró controles a aquellos pacientes sin antecedentes de LES.

En lo que respecta a los métodos de muestreo, se realizó un muestreo por conveniencia. No se realizó cálculo de tamaño muestral.

Los **criterios de inclusión** fueron: edad mayor de 18 años, nacionalidad uruguaya, que acepten formar parte del estudio y firmen el consentimiento informado. Población A (casos): pacientes que cumplan con criterios clasificatorios de LES. Población B (controles): personas que no cumplan con criterios clasificatorios de LES.

Los **criterios de exclusión** fueron: pacientes que presenten neoplasias malignas.

El enrolamiento de participantes, solicitud de consentimiento informado, registro de datos clínicos y obtención de las muestras fue realizado por un único médico que realiza asistencia en dicha consulta. Se le asignó un código aleatorio para el resguardo de la confidencialidad.

Se definieron las siguientes **variables**:

- Manifestaciones cutáneo-mucosas específicas de LES: lupus cutáneo agudo, lupus cutáneo subagudo, lupus cutáneo crónico.
- Manifestaciones osteoarticulares: mono, oligo o poliartritis confirmada por un médico
- Manifestaciones hematológicas: trombocitopenia inmune (recuento plaquetario menor a 100.000), leucopenia (menos de 4.000 glóbulos blancos), neutropenia (menos de 1.000 neutrofilos), linfopenia (menos de 1.000), anemia hemolítica (hemoglobina descendida para la edad y sexo con coombs positivo, sin otra causa que lo explique)
- Manifestaciones renales: Nefropatía lúpica confirmada por punción biópsica renal
- Anticuerpos anti-nucleocitoplasmáticos (ANA): por técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en células Hep2 (células epiteliales derivadas del carcinoma de laringe)²⁷
- Anticuerpos anti-antígeno nucleares extraíbles (anti-ENA): anti-DNA, anti-Smith (anti Sm), antinucleosoma, anti-ribonucleoproteínas (anti-RNP), anti-histona.
- Antifosfolípidos: anticardiolipina IgM e IgG, B2glicoproteína 1 IgM e IgG por técnicas de ELISA, inhibidor lúpico (Test de screening: prolongación de test dependientes de fosfolípidos: appT o test de veneno de víbora de Russel), Test de mezcla con plasma normal y test confirmatorios: normalización del tiempo de prolongación de la coagulación aumentando la concentración de fosfolípidos.¹⁰⁴

Se confeccionó un **formulario de recolección** de datos y se obtuvieron datos del registro de historias clínicas electrónica tales como: datos demográficos (sexo, edad, fecha de diagnóstico, fecha de inicio de síntomas), fenotipo clínico (manifestaciones cutáneo-mucosas, osteoarticulares, hematológicas, renales, serosas, neuropsiquiátricas, cardíacas, otras), fenotipo

serológico (ANA con título y patrón, anti-DNA, anti-Ro, anti-La, anticardiolipina, anticoagulante lúpico, B2glicoproteína, otros anticuerpos específicos de enfermedad autoinmune, complementemia), solapamiento con otra EAS, actividad del LES (SELENA-SLEDAI), daño acumulado (criterios SLICC/ACR-SDI de daño acumulado),^{20,34,37-38,47} comorbilidades (Asma, HTA, Tabaco, Diabetes Mellitus 2).

Metodología:

Obtención del material biológico:

Se llevó a cabo en el Hospital Maciel. A la población a estudiar se le realizó extracción de 10 ml de sangre periférica por punción venosa, colectados en tubos con anticoagulante (K2-EDTA).

Transporte:

Se transportó la sangre obtenida hacia el Hospital de Clínicas, Laboratorio de Oncogenómica del Departamento Básico de Medicina dirigido por la Dra. Nora Artagaveytia.

Se centrifugaron las muestras de sangre periférica a una temperatura de 23°, 1.200 RCF, por 20 minutos. Se extrajo la capa rica en leucocitos y plaquetas (Buffy Coat) compuesta de células nucleadas. Por otro lado, se descartó la capa de eritrocitos (células no nucleadas) y el plasma. Posteriormente se congelaron las muestras de Buffy Coat en un freezer a -80° hasta la extracción de ADN.

Extracción y evaluación del ADN:

Se descongelaron las muestras a temperatura ambiente y luego se realizó la homogeneización de la misma. El ADN se obtuvo utilizando kit comercial de extracción de ácidos nucleicos a partir de sangre periférica Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit. La extracción consistió de 4 pasos definidos: 1) Lisado celular; 2) Unión a la membrana de sílica de la columna; 3) Lavado; 4) Elución del ADN.

Se valoró la **calidad, concentración y pureza** del ADN extraído. La calidad se chequeo mediante visualización por electroforesis en gel de agarosa 0.8%. La concentración y la pureza mediante técnicas de espectrofotometría (relación absorbancia 260/280). Las muestras con relación 260/280 entre 1.8 a 2.0 se interpretaron con una pureza aceptable. Para esto se utilizó el Nanodrop ubicado en DBM, en el laboratorio de Biología Molecular. Se utilizaron 2ul de cada muestra.

Almacenamiento:

Se almacenaron las muestras de ADN genómico en 100-200 µl de Buffer de elución a -20°.

Amplificación del codón 72 de TP53

Las **reacciones de PCR** se realizaron con MangoMIX™ (BIOLINE), en un volumen final de 50 µL que contiene mango Mix 25ul (2 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 1X tampón de PCR y 1,5 U de *Taq* ADN polimerasa), 1 µM de cada cebador (primer) (ambos primers a una concentración de 10pM/ul), ADN (150 ng) y H₂O.

Se utilizaron los cebadores específicos, con las siguientes secuencias: forward 5'-ATCTACAGTCCCCCTTGCCG-3' y reverse 5'-GCAACTGACCGTGCAAGTC-3', que dieron lugar a un amplicón de 296 pb. (Figura 13)

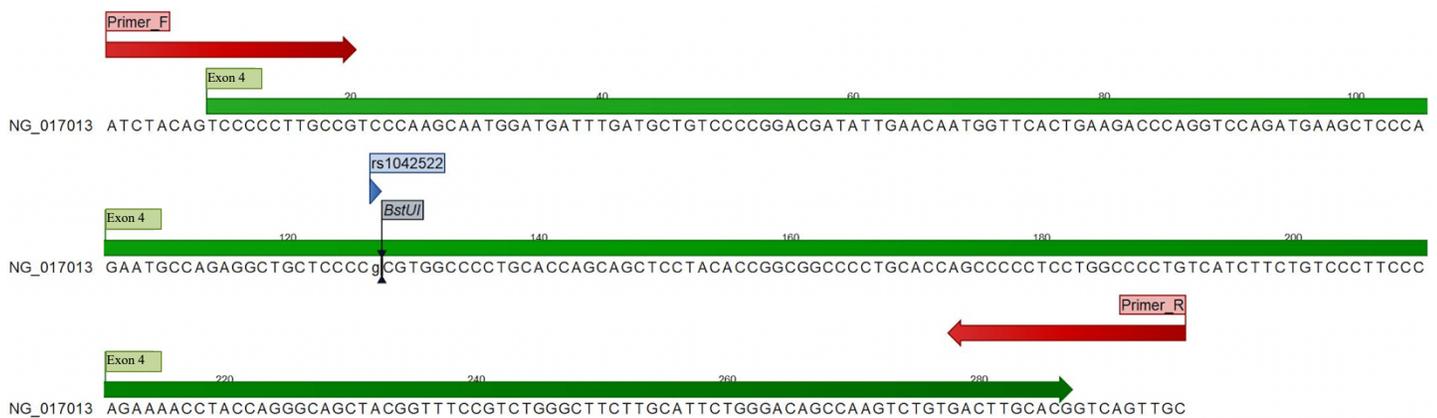


Figura 13. La figura muestra la región amplificada, la ubicación del SNP y el sitio de unión de los primers.

Condiciones de amplificación de la PCR:

Se realizó una desnaturalización de 15 minutos a 95° C, seguido de 35 ciclos (60 segundos a 95°C, 60 segundos a 55°C, 60 segundos a 72°C), y una extensión final de 7 minutos a 72°C.

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% y posteriormente se chequeo la calidad de productos de PCR mediante la visualización UV del gel, se descartó la contaminación con un blanco sin adición de molde. Se obtuvo un amplicón con un producto de 296 pb.

Análisis del polimorfismo del codón 72:

Los productos de PCR que se obtuvieron, fueron digeridos con la enzima de restricción BstUI. (figura 13 y figura 14)

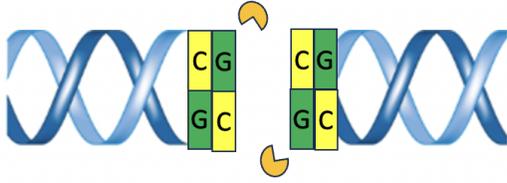


Figura 14. Sitio de restricción de la enzima BstUI (New England Biolabs)

Para determinar el genotipo del codón 72 de TP53, una alícuota del producto de PCR (10 ul), se incubó durante la noche (16 horas) a 60°C con 1ul de la enzima de BstUI (New England Biolabs 10U/ul) y Buffer correspondiente, en un volumen final de 25µl .⁹⁵

Se realizó la separación electroforética de los productos de PCR en geles de agarosa al 3% para poder visualizar los fragmentos originados por la digestión. Los geles fueron teñidos con sybr green o gel red y visualizados en luz UV.

La identificación de la variante alélica del codón 72 de TP53 se realizó mediante el análisis de las bandas generadas por la digestión enzimática del amplicón. La variante homocigota de la prolina tiene una única banda, no digerida de 296pb, el fragmento homocigoto de arginina presenta dos bandas de digestión una de 169pb y la otra de 127pb y por último, el fragmento heterocigoto tiene tres bandas de 296, 169 y 127 pb.⁸⁷

Secuenciación Sanger:

La especificidad de la amplificación se comprobó mediante secuenciación Sanger del amplicón obtenido. Se realizó la purificación del producto de PCR mediante kit comercial de Zymo *Quick-DNA Kits*. Se enviaron 4 muestras al exterior del país (Macrogen, Korea) para realizar la secuenciación. Posteriormente se comparó el resultado de las muestras obtenidas por PCR-RFLP y Sanger.

Autoanticuerpos:

Los datos de título, patrón y tipo de autoanticuerpo fueron proporcionados por el Laboratorio Clínico del Hospital Maciel. En dicho laboratorio la determinación de los anticuerpos ANA se realiza por IFI (inmunofluorescencia indirecta) sobre el sustrato de células Hep-2 (células epiteliales humanas), con el kit Kallestad HEp-2 (Bio-rad) y se tomó como positivo un valor mayor o igual a 1/80.

Los anticuerpos específicos (anti-ENA) incluyeron: anti-DNA doble cadena, anti-nucleosoma, anti-Sm, anti-ribosomal, anti-histona, anti-RNP, anti-Ro 60 kDa, anti-Ro 52 kDa, Anti-La, anti-Scl-70, CENP-B y anti-Jo-1. Se determinaron mediante inmunoensayo lineal ANA 12 line Generic Assays que determina anticuerpos tipo IgG. (Figura 15)

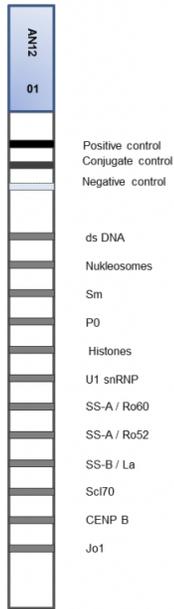


Figura 15. ANA 12-line Generic Assays

Análisis estadístico:

Las variables cuantitativas se expresaron en mediana y rango intercuartílico y las variables cualitativas en frecuencia absoluta y frecuencia relativa porcentual.

Para la comparación de las medianas entre casos y controles se utilizó el test de U de Mann Withney mientras que para la comparación entre múltiples grupos se usó el test de Kruskal-Wallis.

Se valoró asociación entre variables mediante test de chi cuadrado o test exacto de fisher en caso de valores esperados menores a 5. Se calculó el riesgo mediante Odds Ratio. Se consideró significativo un valor p menor a 0.05. Los datos fueron analizados con el software SPSS (IBM, inc) v25.0.

Para determinar si los polimorfismos se encontraban bajo el Equilibrio de Hardy Weinberg (EHW) se utilizó gPLINK v1.07. Se construyeron archivos MAP y PED. Se determinó mediante pruebas de asociación el mejor modelo para el equilibrio a utilizar, sabiendo que estas pruebas son: modelo alélico básico, Cochrand Armitage (TREND), modelo genotípico, modelo alélico dominante o acción de gen recesivo. Se eligió el modelo alélico o el TREND (Cochrand Armitage).

Datos nacionales del polimorfismo:

Se valoró frecuencias alélicas de prolina y arginina de 50 genomas uruguayos de población sana, incluidos en el proyecto URUGENOMES. Esto se pudo realizar gracias a la colaboración

de su investigadora principal, L. Spangenberg. Dicho proyecto presentó como uno de sus objetivos caracterizar los genomas de uruguayos seleccionados al azar, en los que se identificó su ascendencia y algunos aspectos relacionados con enfermedades raras.

Aspectos éticos:

La investigación se realizó respetando el marco uruguayo legal vigente, según las normas éticas concordantes con la Declaración de Helsinki actualizada en 2013. Se sometió el trabajo al comité de ética del Hospital de Clínicas y fue aprobado por el mismo. A los participantes se les entregó información por escrito, lo cual explicaba los objetivos del estudio y riesgos potenciales de los procedimientos, formulario de consentimiento informado y un teléfono de contacto. Asimismo, se garantizó la confidencialidad de los resultados y un proceso asistencial adecuado aunque no otorgaran su consentimiento para participar del estudio.

La sangre periférica extraída de los participantes una vez realizados los estudios correspondientes, fue desechada de acuerdo a normas de desecho biológico del Hospital de Clínicas.

Se realizó registro en base de datos y archivo en el Depto. Básico de Medicina (DBM). Solamente pudieron acceder a este material las personas responsables y directamente vinculadas al proyecto. Las muestras se mantuvieron en forma confidencial adjudicándoles un número y registrando la fecha, sin ser identificadas con el nombre, por lo que los datos personales del paciente no serán utilizados en ninguna instancia de la investigación ni en la difusión de los resultados. Los resultados fueron utilizados con objetivo formativo y académico.

RESULTADOS:

Se realizó la extracción de ADN de 92 participantes (46 pacientes lúpicos y 46 controles). Se excluyó una paciente con LES dado que se le realizó el diagnóstico de cáncer de mama. No se excluyó ningún control. Se incluyeron en el estudio 45 lúpicos y 46 controles.

1) Puesta a punto de la técnica PCR-RFLP para el análisis del polimorfismo del codón 72 de TP53

Se realizó el Buffy Coat de la totalidad de las muestras y posteriormente se extrajo el ADN. Se valoró la calidad, concentración y pureza del ADN extraído. La calidad se chequeo mediante

visualización por electroforesis en gel de agarosa 0.8%. Para valorar la concentración y la pureza se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop™, colocando 2ul de cada muestra.

En la Tabla 6 se muestran los resultados de la concentración y pureza de las 45 muestras de los casos y los 46 controles.

Controles	Concentración de ADN ng/ul	260/280	Lúpicos	Concentracion de ADN ng/ul	260/280
1	19,0	1,97	1	129,0	1,91
2	44,0	1,81	2	48,0	1,24
3	27,0	2,19	3	49,9	0,86
4	31,6	2,35	4	36,9	2,23
5	14,6	1,88	5	23,0	2,09
6	15,8	1,91	6	16,5	2,57
7	23,5	1,88	7	21,7	1,35
8	6,7	2,05	8	55,1	1,04
9	14,1	1,92	9	33,3	1,22
10	13,3	1,89	10	21,2	1,50
11	16,2	1,42	11	8,8	2,43
12	11,2	1,86	12	43,0	2,04
13	14,5	1,85	13	11,0	3,0
14	41,8	1,79	14	29,3	2,03
15	37,9	1,81	15	38,3	2,06
16	24,2	1,86	16	17,4	1,69
17	72,7	1,81	17	25,5	1,41
18	64,6	1,85	18	20,3	1,85
19	52,3	1,88	19	25,4	2,0
20	29,5	1,46	20	11,8	1,8
21	44,8	1,82	21	14,4	1,51
22	32,9	1,78	22	16,5	1,59
23	40,6	1,84	23	25,4	1,58
24	46,4	1,84	24	38,1	1,78
25	42,1	1,70	25	60,9	1,90
26	32,0	1,78	26	35,1	1,86
27	34,9	1,72	27	28,9	1,97
28	93,0	1,81	28	64,3	1,87
29	64,0	1,81	29	16,9	1,68
30	77,6	1,83	30	36,6	1,83
31	112,0	1,83	31	70,8	1,86
32	102,0	1,82	32	54,9	1,86
33	47,8	1,72	33	66,3	1,83

34	57,2	1,74	34	49,8	1,8
35	55,7	1,73	35	8,9	1,72
36	43,5	1,75	36	8,1	1,60
37	34,3	1,72	37	12,4	1,81
38	38,8	1,90	38	53,6	1,79
39	12,0	1,83	39	47,4	1,78
40	9,2	1,83	40	137,8	1,85
41	14,8	1,76	41	35,9	1,78
42	13,6	1,74	42	32,8	1,64
43	11,8	1,72	43	34,8	1,68
44	37,3	1,60	44	72,0	1,77
45	22,3	1,66	45	13,1	1,72
46	12,3	1,70	46		

Tabla 6. Concentración y pureza en muestras de lúpicos y controles medidas por Nanodrop.

Condiciones de amplificación de la PCR:

Para calcular la temperatura óptima de annealing o hibridación se realizó la PCR a distintas temperaturas en un termociclador de gradiente marca AxygenTM Maxygene. Se eligió una muestra con buena calidad y concentración de ADN (control 2) y realizó la amplificación a distintas temperatura de annealing, a saber: T1: 52°, T2: 53°, T3: 54°, T4: 55°, T5: 56°, T6: 57°, T7: 58°, T8: 60°, T9: 61°, T10: 62°. En los carriles de las muestras 1-8 se evidencia un amplicón de 296 pb que corresponde al tamaño esperado.

Evidenciamos que las temperaturas de annealing óptimas eran las de las muestras 1-5. La muestras 6 y 7 si bien se veían bandas nítidas, tenían menor intensidad que las anteriores. La muestra 8 mostraba una banda tenue, y las muestras 9 y 10 no amplificaron a esas temperaturas. Por esta razón optamos por elegir una temperatura de annealing de 55°. Los resultados se muestran en la Figura 16.

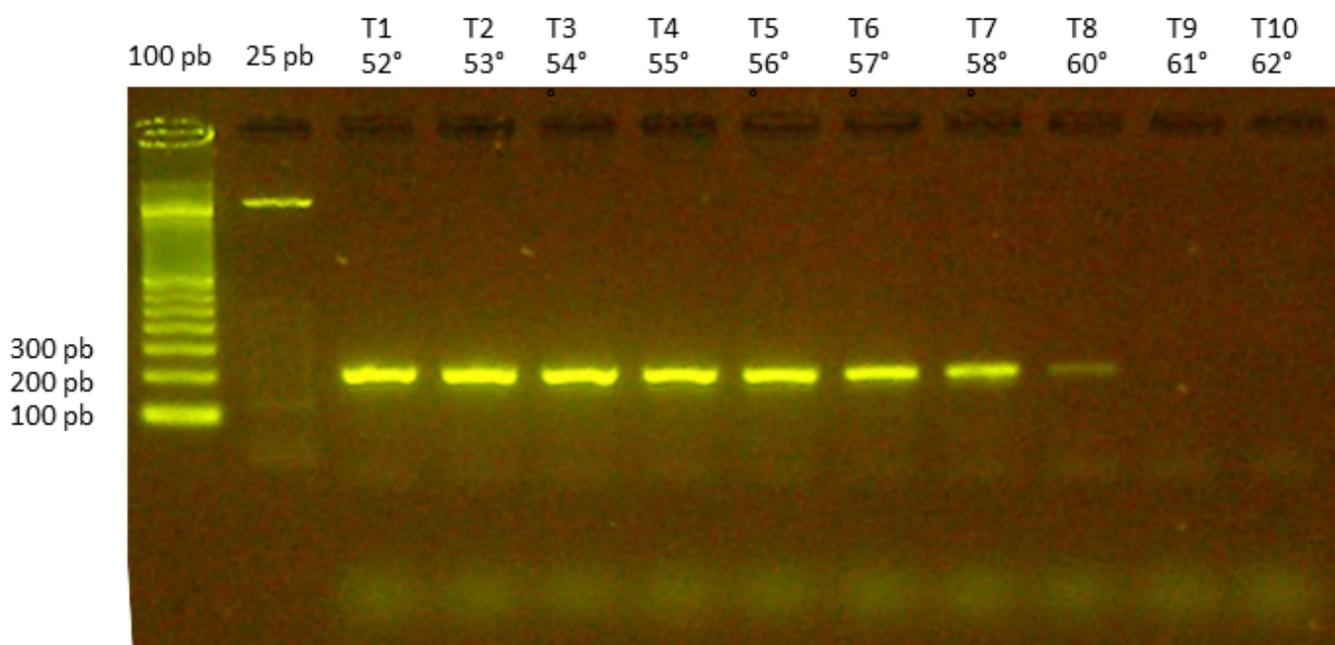


Figura 16. PCR de gradiente a distintas temperaturas.

Gel de agarosa 2%. Corrida electroforética a 100mV, 30 minutos.

En los dos primeros carriles: marcadores de peso moleculares (100 pb y 25 pb que se encuentra degradado). Se señalan 100pb, 200pb, 300pb. Carriles 3 a 10: se observan las muestras a distintas temperaturas.

Puesta a punto RFLP:

Luego de optimizar la amplificación, se realizó la puesta a punto de la RFLP. Para esto se utilizó el control 2, se probó dos concentraciones distintas (10 Unidades y 20 Unidades) de la enzima New England Biolabs. Para la digestión se tomó una alícuota de 10 ul de producto de PCR en un volumen final de 25 ul conteniendo buffer, H₂O y 1 o 2 ul de la enzima BstUI (10 U/ul, New England Biolabs), según correspondiere.

Los resultados se muestran en la Figura 17. En ambos carriles se observan dos bandas de digestión una de 169 pb y la otra de 127 pb lo cual corresponde a un genotipo homocigota para la arginina (arg/arg).

En lo que respecta a las distintas concentraciones de la enzima en las muestras analizadas, luego de la electroforesis, se observó que con 10 U se obtiene una adecuada digestión y bandas nítidas. Por lo cual, se optó por realizar la RFLP con 10U de la enzima de restricción.

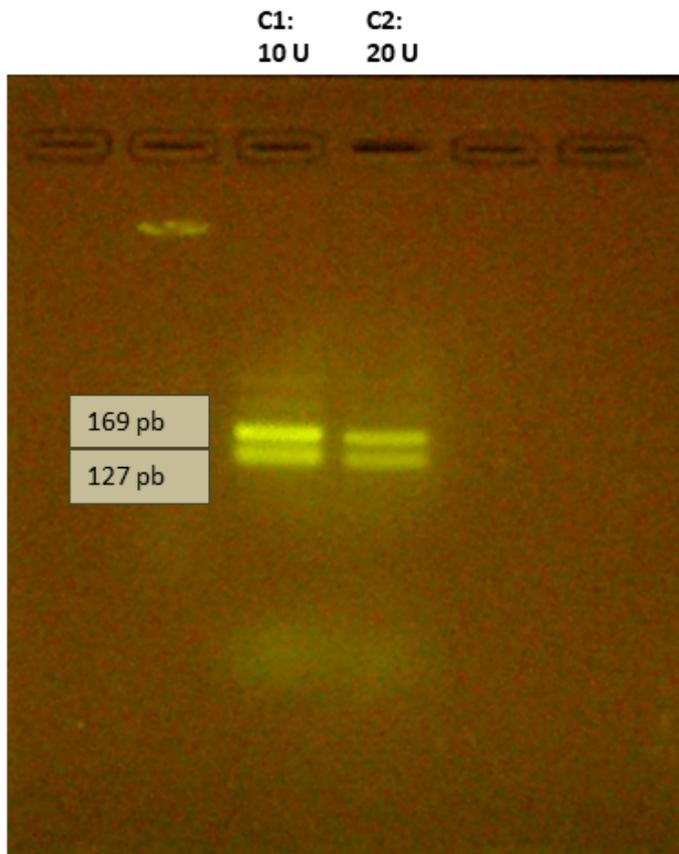


Figura 17. PCR-RFPL con distintas concentraciones de la enzima de restricción. Gel de agarosa 3%. Corrida electroforética a 100mV, 30 minutos. Carril 1 (C1): enzima de restricción a 10 U. Carril 2 (C2): enzima de restricción a 20 U. Se observan dos bandas de digestión una de 169 pb y la otra de 127 pb (genotipo homocigota arg/arg).

2) Descripción de la población:

Se incluyeron 91 participantes, de los cuales 45 fueron pacientes lúpicos y 46 controles. Se excluyó una paciente lúpica dado que fue diagnosticada de neoplasma de mama.

Características de la población control:

La mediana de edad fue 28 con un Rango intercuartílico (RIC) 11,0 años. Mínimo 21, máximo 81 años. Predominó el sexo femenino 40 casos (87,0%) y 6 casos (13,0%) de sexo masculino.

Las comorbilidades fueron: 10 (21,7%) tabaquistas, 6 (13,0%) HTA, 3 (6,5%) asma y 1 (2,2%) diabetes mellitus. (Tabla 7)

Características de población de pacientes Lúpicos:

La mediana de edad fue de 50,0 con un RIC 11,0 años. Mínimo 23, máximo 73 años. 43 pacientes (95,6%) de sexo femenino y 2 (4,4%) de sexo masculino.

La mediana de edad al diagnóstico fue de 34 años con un RIC de 17. Mediana años de evolución de la enfermedad al momento del estudio fue de 12 con un RIC de 8 años.

Las comorbilidades fueron: 18 (40,0%) HTA, 4 (8,9%) tabaquistas, 4 (8,9%) ex tabaquistas, 3 (6,7%) asma y 2 (4,4%) diabetes. (Tabla 7)

En la comparación en los datos demográficos entre lúpicos y controles se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a: la edad (p:0,0001), frecuencia de HTA en los lúpicos (p: 0,004), frecuencia de tabaquismo activo en los controles (p: 0,017). (Tabla 7)

Controles (n: 46)	LES (n: 45)
Mediana edad: 28 (RIC 11 años) *	Mediana edad: 50 (RIC 11 años) *
87%  13% 	95,6%  4,4% 
-	Mediana de edad al diagnóstico: fue de 34 (RIC 17 años)
-	Mediana años de evolución de la enfermedad: 12 (RIC de 8 años)
Tabaquistas * 21,7%	Tabaquistas * y ex tabaquistas 8,9%
HTA 13%*	HTA 40% *
asma 6,5%	asma 6,7%
DM 2,2%	DM 4,4%

Tabla 7. Características demográficas de lúpicos y controles. Se señala con * los valores p<0.05.

Los solapamientos con otras EAS se evidenciaron en 25 (55,6%) pacientes. Los mismos fueron: LES-SAF 12 (26,7%), LES-AR 3 (6,7%), LES-SS 3 (6,7%), LES-SAF-AR 2 (4,4%), LES-ES 1 (2,2%), LES-Enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC) 1 (2,2%), LES-AR-SS 1 (2,2%), SAF-SS 1 (2,2%), LES-AR-SS-EMTC 1 (2,2%).

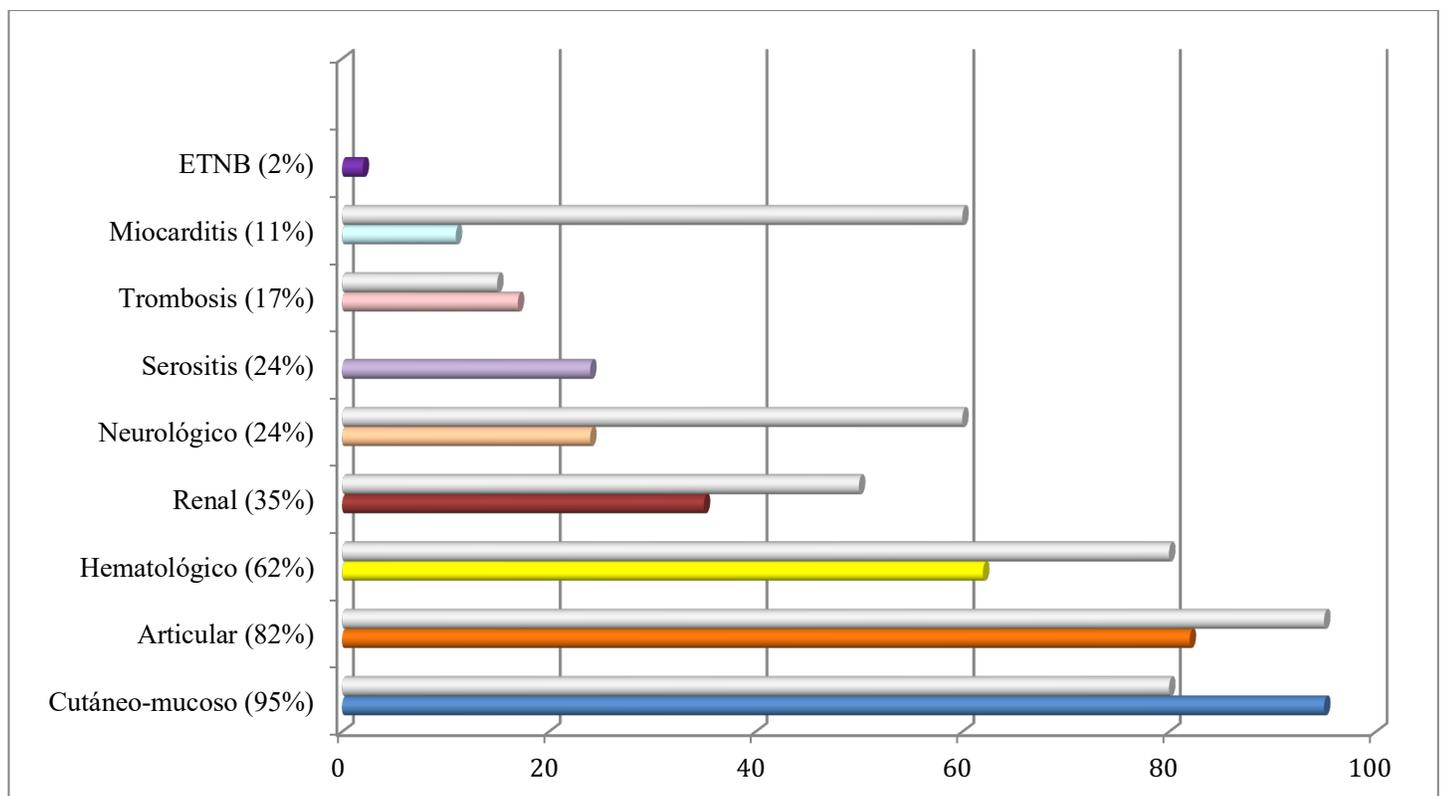
Las manifestaciones clínicas de los pacientes con lupus fueron las siguientes:

a) manifestaciones cutáneas, observadas en 43 pacientes (95,6%) con la siguiente distribución: 30 (75,0%) LCA, 3 (7,5%) LCC, 1 (2,5%) LCSA.

b) Compromiso articular en 37 (82,2%) casos.

c) Manifestaciones hematológicas en 28 (62,2%) pacientes con la siguiente distribución: 16 (59,3%) trombocitopenia inmune, 14 (51,9%) neutropenia, 7 (25,9%) anemia hemolítica autoinmune.

d) otras manifestaciones clínicas: manifestaciones renales en 16 (35,6%) pacientes, serositis 11 (24,4%), compromiso neuropsiquiátrico en 11 (24,4%), trombosis en 8 (17,8%), miocarditis 5 (11,1%), 1 (2,2%) endocarditis trombótica no bacteriana (ETNB), 1 (2,2%) presentó vasculitis lúpica. (Gráfica 2)



Gráfica 2. Manifestaciones clínicas de pacientes lúpicos. Comparación de frecuencia entre este estudio y lo reportado a nivel mundial. Gráficas de colores: frecuencias reportadas en este estudio. Gráficas grises: frecuencia reportada a nivel mundial.¹¹⁻¹⁵

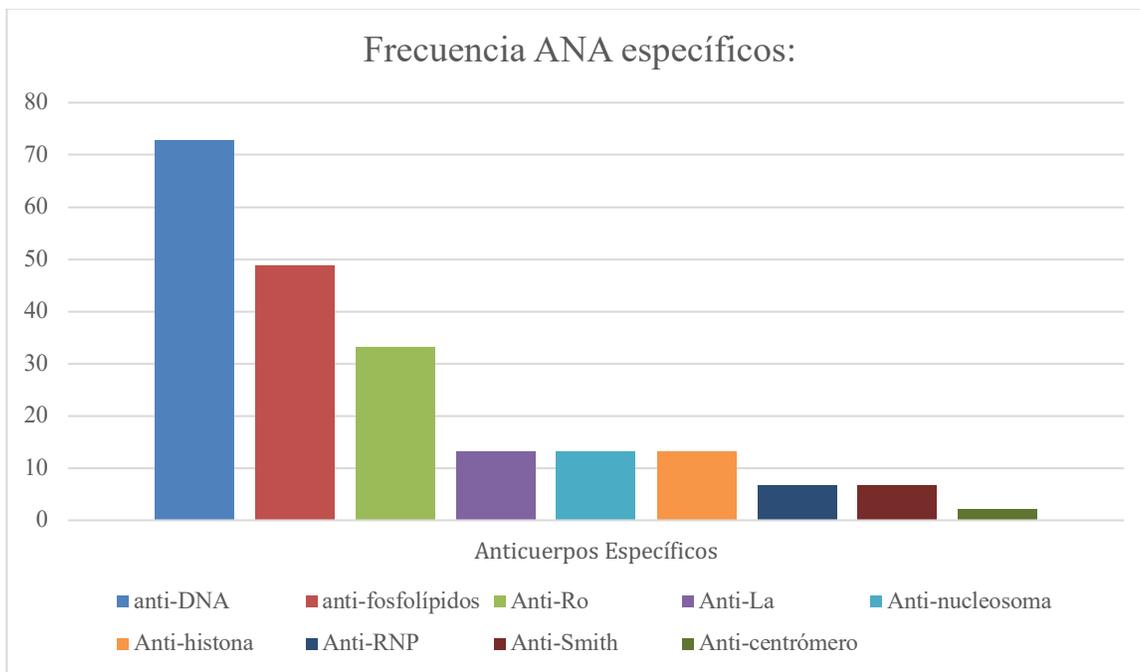
Fenotipo Serológico:

Todos los pacientes presentaron ANA positivo. Al analizar el patrón del ANA se obtuvieron los siguientes resultados: 16 (45,7%) presentaron patrón homogéneo, 13 (37,1%) nuclear puntillado, 3 (8,6%) moteado, 2 (5,7%) nucleolar, 1 (2,9%) citoplasmático.

En cuanto a los ANA específicos: 32 (72,7%) presentaron anti-DNA, seguido de 15 (33,3%) con anti-Ro. Seis (13,3%) pacientes presentaron autoanticuerpos anti-La, anti-nucleosoma y anti-histonas. En 3 (6,7%) casos se evidenciaron anti-RNP, en 2 (4,5%) anti Smith, y en 1 (2,2%) paciente se constató anticentrómero.

En 22 (48,8%) casos se hallaron anticuerpos anti-fosfolípidos, con siguiente distribución: anticuerpos anticardiolipinas en 18 (81,8%) pacientes, seguido del inhibidor lúpico y la beta dos glicoproteína 1 que se presentaron ambos con la misma frecuencia, 16 (72,7%) casos. Once (50%) pacientes presentaron triple positividad. (Gráfica 3)

La hipocomplementemia se observó en 33 (73,3%) de los lúpicos, 27 (90,0%) presentaron hipocomplementemia a predominio de C3 y 23 (76,7%) a C4.



Gráfica 3. Frecuencia de ANA específicos

Actividad de la Enfermedad y daño acumulado:

La actividad de la enfermedad se evaluó mediante el score SLEDAI. 25 pacientes (55.6%) presentaron una actividad leve (0 -3 puntos), 7 (15.6%) actividad moderada (3-12 puntos) y 13 (28.8%) alta actividad (12 o más puntos).

El daño de la enfermedad se valoró mediante el SLICC/ACR-SDI considerándose: Sin daño (0 punto), leve a moderado (1 punto) y daño acumulado severo (2 o más puntos). Se evidenció 29 (64.4%), 14 (31.1%), 2 (4.5%) respectivamente para dichas categorías.

3) Frecuencia del polimorfismo en casos y controles:

Para el análisis del polimorfismo y las distintas variantes se realizó la PCR-RFLP de las 91 muestras. En la Figura 18 se observan los resultados de una corrida electroforética en gel de agarosa 3% (100mV, 30 minutos) en donde se evidencian los 3 genotipos del polimorfismo.

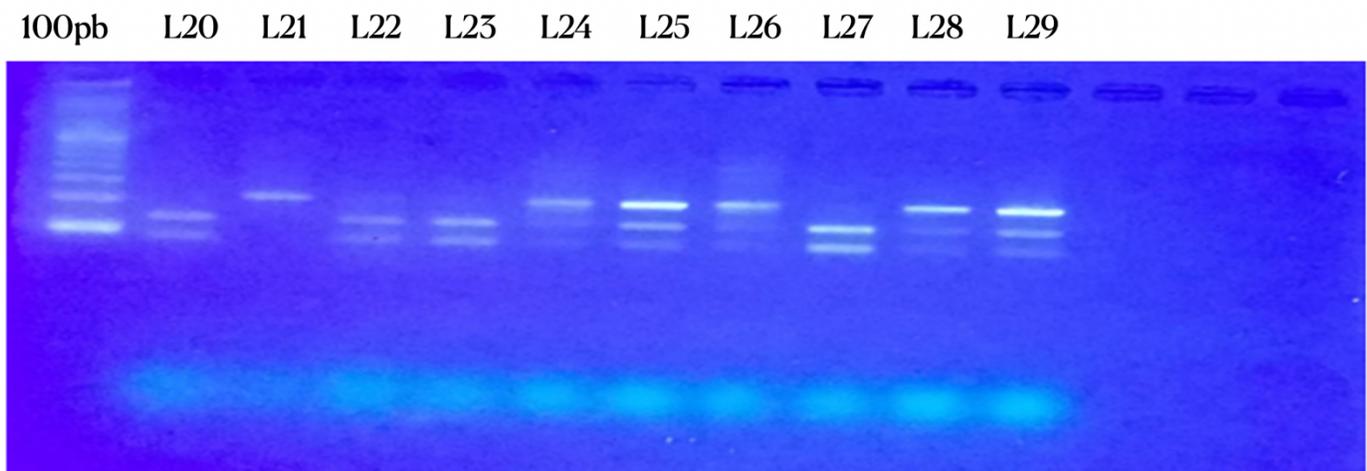


Figura 18. PCR-RFLP. Gel de agarosa 3%. Corrida electroforética a 100mV, 30 minutos. Se observan 10 muestras (L20-L29) de pacientes lúpicos en donde se puede diferenciar las distintas variantes del polimorfismo luego de la digestión con la enzima de restricción. En las muestras L20, 22, 23, 27 se evidencian 2 bandas de digestión una de 169pb y la otra de 127pb que corresponde al fragmento homocigoto de arginina (arg/arg). En la muestra L21 se evidencia una sola banda, no digerida de 296 pb que corresponde a la variante homocigota de la prolina (pro/pro). Por último, en las muestras L24, 25, 26, 28, 29 se evidencian tres bandas de 296, 169 y 127 pb respectivamente, lo cual corresponde con el fragmento heterocigoto (pro/arg).

Secuenciación Sanger:

Se realizó la secuenciación Sanger de 4 muestras obtenidas por PCR y analizadas por RFLP. Las secuencias se correspondieron a la región esperada del gen. Posteriormente se compararon las secuencias obtenidas con la secuencia genómica de referencia (TP53 RefSeqGene, LRG_321), las mismas fueron concordantes con los resultados obtenidos en la PCR-RFLP por lo cual se demostró la especificidad de la técnica utilizada. (Figura 19)

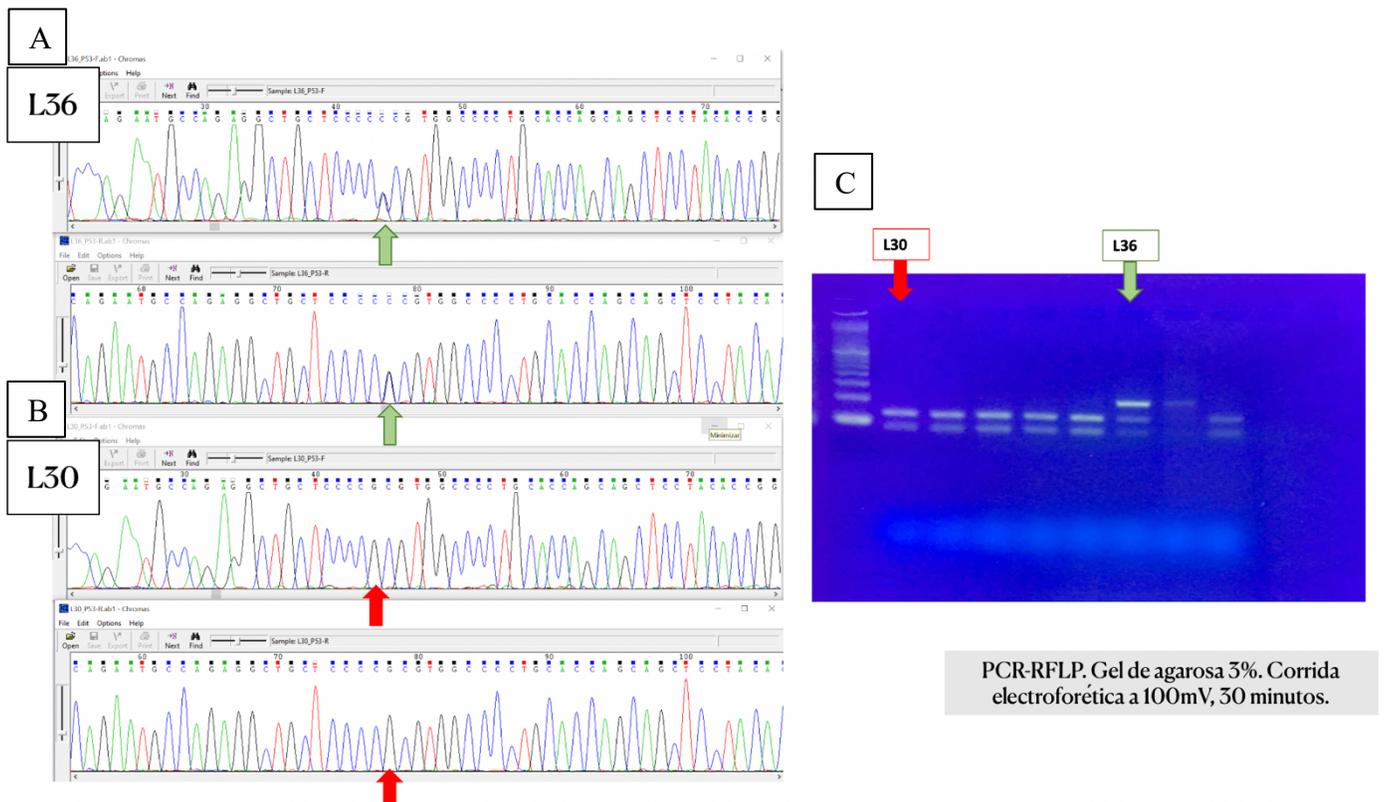


Figura 19. A: Secuenciación Sanger muestra de Lúpica número 36 (L36) forward y reverse, Heterocigota pro/arg (CCC/CGC). B: Secuenciación Sanger muestra de Lúpica número 30 (L30), forward y reverse, Homocigota arg/arg (CGC/CGC). C: PCR-RFLP. Gel de agarosa 3%. Corrida electroforética a 100mV, 30 minutos. En el primer carril: marcador de 100 pb. Las flechas rojas señalan: L30, se observan 2 bandas de digestión una de 169pb y la otra de 127pb que corresponden al fragmento homocigoto de arginina (arg/arg). Las flechas verdes señalan: L36, se evidencian tres bandas de 296, 169 y 127 pb respectivamente, lo cual corresponde con el fragmento heterocigoto (pro/arg).

Se valoró si el polimorfismo del codón 72 se encontraba bajo el equilibrio de Hardy- Weinberg. Para esto previamente se testeó en gPLINK v1.07, el mejor modelo a utilizar siendo los modelos posibles el alélico o el TREND (Cochran-Armitage).

El polimorfismo rs1042522 se encontraba en equilibrio de HW tanto para la cohorte completa, así como también para los casos y los controles como se observa en la Tabla 8.

SNP	MUESTRA	A1	A2	O (HET)	E (HET)	P
rs1042522	Todos	C	G	0.4286	0.4034	0.7943
rs1042522	Casos	C	G	0.3696	0.375	1
rs1042522	Controles	C	G	0.4889	0.4286	0.4939

Tabla 8. Equilibrio de Hardy- Weinberg para el polimorfismo rs1042522

Muestra: indica si se analizaron todas las muestras (todos), la de los casos (pacientes) o la de los controles (controles). A1: Alelo minoritario. A2: Alelo mayoritario. O (HET): Frecuencia de heterocigotos observados. E (HET): Frecuencia de heterocigotos esperada. P: valor p

Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para comparar las frecuencias genotípicas entre los grupos estudiados no habiendo diferencias estadísticamente significativas (p: 0.597) entre casos y controles.

La frecuencia genotípica con la que se presentó el polimorfismo del codón 72 de TP53 en los controles fue la siguiente: pro/pro 3 (6,5%), arg/arg 21 (45,7%) y pro/arg 22 (47,8%). Se observó el alelo prolina en 28 casos (30,4%) y el alelo arginina en 64 casos (69,6%).

En los pacientes lúpicos se observó la siguiente frecuencia genotípica: pro/pro 3 (6,7%), arg/arg 25 (55,5%) y pro/arg 17 (37,8%), así como frecuencia alélica de prolina en 23 casos (25,6%) y de arginina en 67 casos (74,4%). No se encontraron diferencias significativas entre casos y controles. (Tabla 9)

	LES n=45	Controles n=46	Valor p
Pro/pro	3 (6.7%)	3 (6,5%)	0,449
Arg/arg	25 (55,5%)	21 (45,7%)	
Pro/arg	17 (37,8%)	22 (47,8%)	
Alelo pro	23 (25,6%)	28 (30,4%)	0,570
Alelo arg	67 (74,4%)	64 (69,6)	

Tabla 9. Datos demográficos y frecuencia alélica del polimorfismo en casos y controles. Test estadísticos utilizados para frecuencias genotípicas: test Cochran Armitage, para frecuencias alélicas: chi cuadrado.

A los efectos de evaluar si la frecuencia alélica de esta cohorte era similar a la de la población Uruguaya, se analizaron las frecuencias alélicas de 50 genomas uruguayos tomados de una base de datos del Instituto Pasteur de población sana, provenientes de diferentes regiones del país. Se encontró una frecuencia alélica para Arginina de 66% y para Prolina de 34%.

4) Hallazgos moleculares y fenotipo clínico

Cuando se relacionó el polimorfismo con el fenotipo clínico, se evidenció una asociación estadísticamente significativa entre las manifestaciones cutáneo-mucosas y el genotipo pro/arg ($p=0,044$), OR 2.867 (IC 95%, 1.906-4.312). La manifestación LCA presentó una asociación estadísticamente significativa con 2 genotipos arg/arg ($p=0,016$), OR 0.111 (IC 95%, 0.012-0.989), pro/arg ($p=0,002$) OR 1.765 (IC 95%, 1.291-2.413).

Se evidenció una asociación significativa entre LCA y alelo pro ($p=0,011$), OR 6.67 (IC 95%, 1.224-36.665)

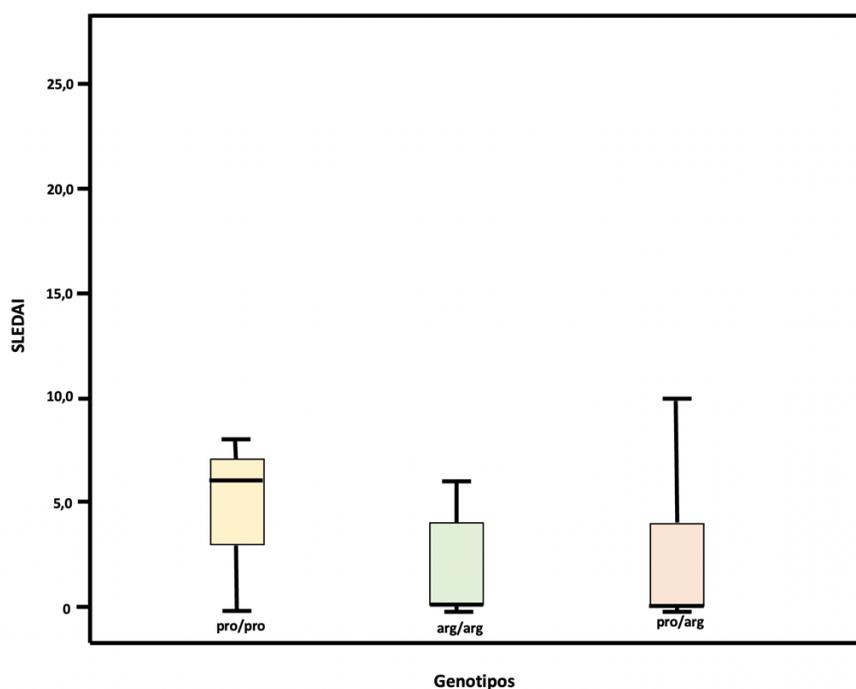
No se encontraron otras asociaciones entre polimorfismo y fenotipo clínico, así como tampoco se relacionó con la presencia de hipocomplementemia. (Tabla 9)

	pro/pro	pro/arg	arg/arg	Alelo pro	Alelo arg
	valor p	valor p	valor p	valor p	valor p
LCA	0,589	0,002* OR: 1.765	0,016* OR: 0.111	0,011* OR: 6.67	0,879

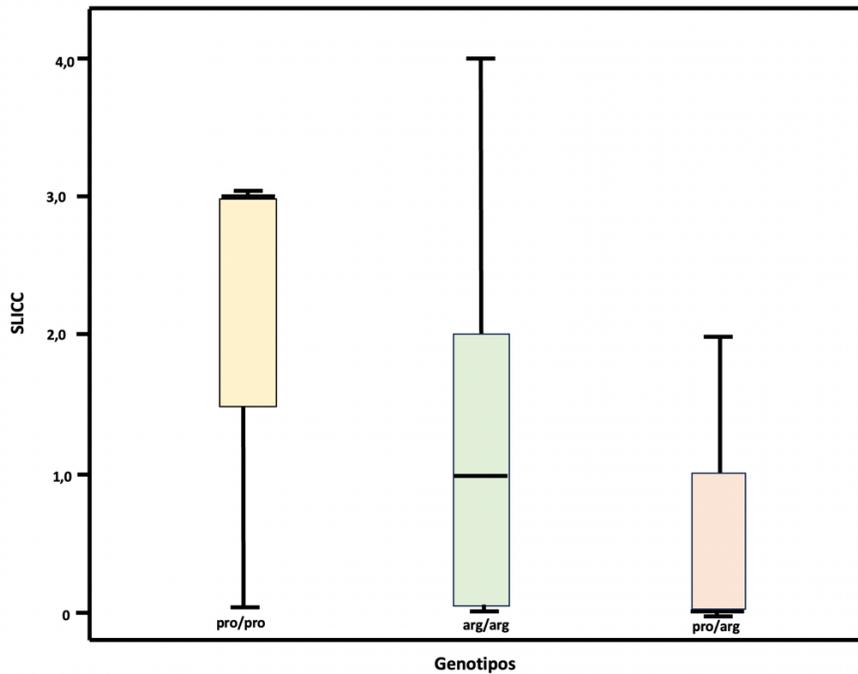
Tabla 9. Asociación entre la manifestación LCA y variantes genotípicas y alelos.

5) Relación entre polimorfismo y la actividad y/o daño acumulado del LES

No se encontraron diferencias en las medianas de SLEDAI ni de SLICC/ACR-SDI entre los diferentes genotipos del polimorfismo (pro/pro; pro/arg y arg/arg) ni entre los alelos. Mediana de SLEDAI: pro/pro 6,0; arg/arg 0,0; pro/arg 0,0 (p 0,489). Mediana de SLICC/ACR-SDI: pro/pro 3,0; arg/arg 1,0; pro/arg 0,0. (p 0,236). Test estadísticos utilizados para comparación de medianas U de Mann Withney, para SLEDAI y SLICC/ACR-SDI Kruskal Wallis. (Gráfica 4 y 5).



Gráfica 4. SLEDAI y genotipos pro/pro, arg/arg, pro/arg.



Gráfica 5. SLICC/ACR-SDI y genotipos pro/pro, arg/arg, pro/arg

DISCUSIÓN:

En primera instancia se implementó y optimizó la técnica de PCR-RFLP para detección de las variantes del codón 72 de TP53, identificándose los alelos esperados, lo que fue verificado mediante secuenciación Sanger.

En la población de pacientes con lupus hubo una mayor frecuencia de mujeres con respecto a los hombres, esto se debe a que las hormonas juegan un rol importante en la patogenia del LES, predominando según series internacionales el sexo femenino en una relación 9 a 1.

Es de destacar que la mediana de edad de los controles fue menor que la de los lúpicos. Esta diferencia se debió a la dificultad de encontrar controles pareados por edad, dado que la mayoría de los controles se obtuvieron en época de Pandemia COVID-19, habiendo menos consultas e internaciones de pacientes añosos.

Otros datos demográficos que presentaron diferencias significativas entre lúpicos y controles fueron la HTA y el tabaco. El bajo índice de tabaquismo entre las pacientes lúpicas probablemente se atribuye a la enfatización en la cesación del consumo de tabaco, por su

interferencia con los efectos terapéuticos de la hidroxicloroquina, piedra angular en el tratamiento del LES.

En relación con la HTA es previsible que se manifieste con mayor frecuencia en estos casos debido a su origen multifactorial, que incluye: tratamiento corticoideo (siendo un efecto adverso la HTA), la propia enfermedad inflamatoria sistémica (factor de riesgo cardiovascular independiente), presencia de nefropatía lúpica (pudiendo determinar enfermedad renal crónica que contribuye a la HTA).

Más de la mitad de los pacientes presentaron solapamiento con otra EAS. Dentro de estos el solapamiento más frecuente fue con SAF como era esperable, dado que muchos autores consideran al SAF como un espectro dentro del LES, compartiendo dentro de los criterios clasificatorios de ambas enfermedades los anticuerpos antifosfolipídicos.²¹ Los solapamientos que le siguieron fueron la AR y el SS.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron las cutáneas, articulares, hematológicas y renales siendo esto comparable con la bibliografía internacional.^{11,15-18}

Entre las manifestaciones hematológicas, se observa un porcentaje más alto de trombocitopenia inmune en comparación con lo que se registra a nivel internacional. Esta diferencia se podría explicar por la inclusión en el estudio tanto las trombocitopenias severas como las no severas. El menor porcentaje de compromiso neuropsiquiátrico en nuestra serie probablemente se deba que no incluimos a la cefalea dentro del mismo. También se observó una menor frecuencia de compromiso cardíaco en comparación con las series internacionales. Esta discrepancia se podría atribuir a la exclusión del compromiso seroso dentro de las manifestaciones cardíacas, ya que se registró como un ítem separado en forma de compromiso seroso.

Si bien el ANA no era un requisito imprescindible en los criterios clasificatorios SLICC 2012, actualmente se considera un criterio de entrada en los últimos criterios clasificatorios de LES.²⁰⁻

²¹ El ANA presenta en el LES una sensibilidad cercana al 98% y una especificidad del 60%.¹⁰⁶ En lo anterior queda de manifiesto que el 100% de los pacientes del estudio presentó ANA positivo.

En lo que respecta al patrón del ANA, casi la mitad presentó un patrón homogéneo, más de 1/3 fue nuclear puntillado, en concordancia con estudios internacionales que evidencian que son los patrones más frecuentes. El patrón moteado, si bien se ha demostrado que está asociado con el LES, en nuestro estudio observamos una baja frecuencia, menor al 10%.³⁰

Los ANA específicos predominantes de la cohorte fueron el anti-DNA seguido del anti-Ro. Al comparar la frecuencia del anti-DNA con series europeas y africanas, se observa una mayor frecuencia de este autoanticuerpo en nuestra serie.¹⁰⁷

El anti-DNA positivo se considera dentro de los criterios SELENA-SLEDAI, siendo uno de los parámetros serológicos que marcan actividad de la enfermedad. Por consiguiente, el mayor porcentaje en nuestra serie se puede deber a que el LES en poblaciones afroamericanas es más

severo que en otras poblaciones como las europeas. Una posible explicación adicional podría radicar en el hecho de que la mayoría de nuestros pacientes presentaron una duración de la enfermedad superior a 5 años (mediana de evolución de la enfermedad de 12 años). Según la bibliografía internacional, a más años de enfermedad mayor riesgo de positivizar los anticuerpos anti-DNA. Un estudio de 298 pacientes con LES reveló que a los 5 años de la enfermedad, aumenta significativamente el porcentaje de pacientes con resultado positivo para el anti-DNA.¹⁰⁸

El anticuerpo anti-Ro fue el segundo anticuerpo específico en frecuencia, siendo similar que en otras series hispanas y afroamericanas.¹⁰⁹, pero menor que en Asiáticos los cuales muestran porcentajes entre un 44-64%.¹¹⁰ Esta diferencia poblacional, probablemente esté en estrecha relación a la exposición de radiación UV que presentan las distintos grupos poblacionales. Existe evidencia de la asociación entre los anticuerpos anti-Ro y el Lupus cutáneo. Por tanto, se podría haber esperado un porcentaje más elevado en nuestra serie, considerando el alto número de casos de lupus cutáneo registrados.

Los anticuerpos antifosfolípidos se hallaron en la mitad de los pacientes lúpicos. Estudios internacionales muestran una frecuencia que oscila entre un 20-50%. La anticardiolipina fue el más frecuente en nuestra cohorte.^{111, 112}

La activación del complemento se evalúa mediante la determinación de niveles individuales de C3 y C4 que refleja la interacción secuencial de todos los componentes de las vías clásica y alternativa. Es una herramienta clínica importante en el manejo de algunas EAS como el LES, en la cual la hipocomplementemia marca la actividad de la enfermedad y se ha asociado a algunas manifestaciones clínicas como son la nefropatía. Las $\frac{3}{4}$ partes de los pacientes de nuestra cohorte presentaron hipocomplementemia en algún momento de su enfermedad, predominando la hipocomplementemia C3. Al comparar con otras investigaciones se destaca un porcentaje mayor de hipocomplementemia en nuestro estudio, esta diferencia se podría explicar al igual que en los anti-DNA, por LES más severos que en las poblaciones caucásicas.¹¹³

La medición de la actividad de la enfermedad es de suma importancia en la práctica clínica, dado que nos permite cuantificar la enfermedad con el fin de lograr un objetivo terapéutico. La alta actividad se asocia a una reducción de la calidad de vida, a un mayor daño acumulado y a una mayor mortalidad. La actividad de la enfermedad en nuestra investigación se evaluó mediante el score SLEDAI, se obtuvo una media de 2,8, lo que se corresponde con una baja actividad. Varios investigadores han valorado factores asociados a los niveles de actividad. En general, la actividad de la enfermedad en pacientes con LES disminuye con la duración de la enfermedad y la edad avanzada, lo cual puede explicar los hallazgos en nuestro estudio.¹¹⁴

Los niveles de complemento y la presencia de anti-DNA se encuentran entre los dominios paraclínicos del SLEDAI. Es importante destacar la discordancia observada en nuestro estudio entre la baja actividad en los pacientes y la alta positividad de anti-DNA e

hipocomplementemia. Esta discrepancia puede explicarse por la inclusión de la detección de anti-DNA y el descenso del complemento en algún momento del curso evolutivo de la enfermedad, mientras que el SLEDAI utilizado se basó en la evaluación en el momento de la recolección de la muestra.

El daño de la enfermedad en el estudio se valoró mediante el índice SLICC/ACR-SDI, siendo bajo en nuestro estudio. El daño acumulado ocurre lentamente, según distintos estudios aumenta con los años de la enfermedad, con la mayor actividad y está estrechamente relacionado al uso de corticoides.¹⁰⁸ En este estudio no se evaluó cuántos pacientes recibieron corticoides ni dosis media de los mismos. Probablemente el bajo índice de daño se podría explicar a un seguimiento oportuno, a una menor actividad de la enfermedad y a un uso racional de los corticoides.

Se determinó que el polimorfismo del codón 72 se encontraba bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg. Al encontrarse los genotipos en equilibrio, los resultados no perdieron validez.

En los controles, predominó el genotipo heterocigota, si bien la proporción fue muy similar a los homocigotas para arginina. El porcentaje de homocigotas para prolina fue bajo. En el LES predominó el genotipo homocigota para arginina, seguido del heterocigota y con menor proporción el homocigota para prolina. La mayor proporción de arg/arg observada en lúpicos se encuentra en discrepancia con respecto a estudios previos que muestran asociación entre variante prolina y LES.⁸⁷ Lee et al. estudiaron a 90 lúpicos y 114 controles, observaron una mayor frecuencia de la variante heterocigota arg/pro, seguida de pro/pro en LES, a diferencia de los controles en los cuales predominó la variante heterocigota seguido de la homocigota de arginina.⁸⁷ Por el contrario, un estudio español que incluyó más de 1.000 pacientes obtuvo resultados similares a los nuestros, no encontrando diferencias significativas entre lúpicos y controles, con una mayor proporción de arg/arg en lúpicos.⁴ En el 2017 Yang J y col. realizaron un estudio que incluyó más de 4000 pacientes los cuales evidencian una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo heterocigota (pro/arg) y el alelo arginina con el LES.¹¹⁵

A pesar de la asociación inicial del LES con la variante de prolina, debido a su menor capacidad para inducir apoptosis, investigaciones más recientes sugieren que la variante arginina podría ser la de mayor riesgo. En nuestro estudio, se observó que el genotipo arg/arg estaba en mayor proporción en casos que en controles, esto podría estar mostrando que en individuos lúpicos hay una mayor actividad apoptótica celular que se expresa por un aumento de la exposición de autoantígenos lo que genera inmunogenicidad, predisponiendo al desarrollo de LES.¹¹⁵

La poderosa capacidad de arginina para inducir la apoptosis puede ser debido a que TP53 tendría una interacción directa con BAX, de esta forma, la proteína generada promueve la liberación del citocromo c desde el espacio intermembranoso de la mitocondria hacia el citosol, lo que lleva a la activación de la cascada proapoptótica de las caspasas.¹¹⁵

Hubo una amplia proporción del alelo arginina tanto en controles como en lúpicos. Al comparar nuestros resultados con registros internacionales se observa una gran variación según grupos poblacionales. Bases de datos latinoamericanas que incluyen 668 pacientes muestran una frecuencia alélica para prolina de 58% y para arginina de 42%. Un registro europeo con un tamaño muestral de 90.388, evidencia una mayor frecuencia para el alelo prolina (74%). Pese a los registros internacionales de datos nombrados anteriormente, bases de datos afroamericanas evidencian una mayor frecuencia del alelo arginina (84%).⁹² A su vez, un estudio español evidencia frecuencias alélicas mayores de arginina tanto en lúpicos (84%) como en controles (81%), siendo más similar a nuestro estudio.¹⁰³

La población uruguaya es mestizada, lo cual hace difícil predecir el comportamiento de la misma. Las frecuencias en nuestro estudio fueron similares a los registros en poblaciones afroamericanas con una predominancia del alelo arginina. No existen datos publicados en nuestro país sobre la frecuencia genotípica ni alélica del polimorfismo de TP53. Pese a esto, pudimos comparar las frecuencias alélicas de este estudio, con los únicos datos de genomas uruguayos que existen en nuestro país (Instituto Pasteur). En estos registros se evidencia una mayor proporción del alelo arginina en la población uruguaya, en consonancia con los datos encontrados en esta investigación.

Las diferencias entre frecuencias alélicas son otra evidencia que respalda el hallazgo de que los alelos específicos de la enfermedad (para al menos algunos genes de susceptibilidad), varían entre diferentes grupos étnicos.

Cuando se relacionó el polimorfismo con el fenotipo clínico, se evidenció una asociación estadísticamente significativa entre las manifestaciones cutáneo-mucosas y el genotipo pro/arg. El LCA se asoció con diferentes genotipos. El genotipo arg/arg se mostró como protector para el desarrollo de LCA y pro/arg de riesgo. Un estudio realizado por Jie Yang y cols. evidenció que los pacientes con LES que portaban el alelo prolina tenían alto riesgo de padecer lupus cutáneo.¹¹⁵ Esto puede deberse a que el alelo pro es menos eficaz en inducir apoptosis y niveles disminuidos de apoptosis puede contribuir a la autoinmunidad, al disminuir la delección de los linfocitos autorreactivos, que dan lugar a inmunocomplejos que se acumulan en la piel. No se encontraron otras asociaciones entre polimorfismo y fenotipo clínico al igual que en otros estudios internacionales.¹¹⁵

Si bien normalmente la presencia del C1q y el C4 mejoran la opsonización y el *clearance* de restos apoptóticos, muchos pacientes con LES presentan niveles bajos de estos componentes. En nuestro trabajo, la hipocomplementemia no presentó asociación con ninguno de los polimorfismos.

En cuanto a la relación entre el polimorfismo y la actividad (SLEDAI) y/o daño acumulado (SLICC) no se encontraron diferencias significativas. Pese a esta observación, la mediana de ambos scores fue mayor para el genotipo pro/pro, lo cual nos lleva a preguntarnos ¿el tener el genotipo pro/pro induce una mayor actividad del LES y daño acumulado? Probablemente para contestar esta interrogante se deba hacer otros estudios con mayor tamaño muestral.

En cuanto al daño acumulado, es probable que intervengan múltiples factores confusores, ya que este se relaciona no solo con la actividad de la enfermedad, sino también con la duración de los años de enfermedad y los tratamientos recibidos.

Nuestro trabajo tuvo debilidades, por un lado las derivadas al diseño del estudio, dado que es un trabajo retrospectivo, lo cual puede llevar indefectiblemente a un sesgo de información. Como hemos analizado los distintos grupos poblacionales probablemente juegan un rol preponderante en los resultados. Por tanto, hubiera sido relevante llevar a cabo un análisis detallado de la ancestría de los individuos que participaron en el estudio. Es de destacar que la mediana de edad de los controles fue menor que la de los lúpicos teniendo diferencias significativas. Esto podría ser una limitación del estudio llevando a un sesgo de selección, dado que los controles incluidos tienen una edad menor, existe la posibilidad de que se encuentren en una etapa preclínica de la enfermedad.

Además, considerando la heterogeneidad del LES, sería más apropiado enfocarse únicamente en los casos de LES puros con el objetivo de garantizar que ninguna otra EAS pueda influir como un factor confusor en la asociación entre el LES y el polimorfismo.

Por último dentro de las limitaciones no podemos dejar de mencionar el bajo tamaño muestral del estudio, si bien el LES es una patología de baja prevalencia.

En cuanto a las fortalezas destacamos que es el primer estudio en el país y en sudamérica en valorar el polimorfismo del codón 72 de TP53 y riesgo de LES. Todo esto constituye una motivación para la profundización del conocimiento en este tema, dado que aún queda mucho por dilucidar en la patogenia del LES. Aunque el LES es una enfermedad en la que los factores ambientales desempeñan un papel crucial, con el paso del tiempo, los aspectos genéticos y epigenéticos cobran cada vez mayor relevancia. Es de suma importancia intentar realizar una correlación clínico molecular que ayude a potenciar los conocimientos clínicos en nuestra práctica habitual.

CONCLUSIONES:

Nuestros hallazgos sugieren que existe una predominancia del alelo arg en la población uruguaya a diferencia de lo evidenciado en otras poblaciones. A su vez, existe una mayor proporción de homocigosis para arginina en pacientes lúpicos, lo cual podría estar asociado a un mayor riesgo de desarrollo de LES. Por otro lado, el genotipo heterocigoto y el alelo pro serían de riesgo para el desarrollo de LCA, siendo el arg/arg protector.

Por lo tanto, la arginina podría estar relacionada con el riesgo de desarrollo de LES, pero la prolina se vincularía a riesgo de desarrollo de lupus cutáneo y probablemente a mayor actividad de la enfermedad y daño acumulado.

Son necesarias futuras investigaciones a realizarse sobre asociaciones entre el polimorfismo de TP53 y susceptibilidad a LES, así como también relacionarlo con los diferentes grupos étnicos.

Perspectivas futuras:

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, consideramos a futuro realizar otros análisis para continuar caracterizando a la población uruguaya en lo que respecta al lupus eritematoso sistémico.

En primer lugar, sería importante continuar estudiando el polimorfismo del codón 72 en controles y lúpicos, para de esta forma aumentar el tamaño muestral y conocer mejor la expresión del mismo en la población uruguaya.

Sería interesante completar el estudio con otros SNP de susceptibilidad al LES reconocidos hasta el momento, tales como los relacionados con la firma interferón y receptores toll (TLR). La medicina genómica está adquiriendo un rol fundamental en el continuum que presenta la clínica: desde el asesoramiento genético a un individuo sano, hasta el tratamiento personalizado a pacientes con enfermedades complejas. El LES presenta gran heterogeneidad, con variadas manifestaciones clínicas, siendo una enfermedad poligénica, existiendo genes de susceptibilidad conocidos hasta el momento en la extensión en el genoma y otros no conocidos. Se podría plantear como estrategia a futuro, realizar el estudio del exoma completo de pacientes lúpicos y compararlo con individuos controles. De esta forma, se valoraría las variantes genómicas que puedan asociarse a la enfermedad, comparando además las frecuencias observadas de las variantes conocidas, tanto en la población objetivo como en la población general de nuestro país.

Hemos visto que el polimorfismo presenta una frecuencia muy variable en las distintas poblaciones a nivel mundial, por lo cual es de suma importancia contar con datos de nuestro país. La población uruguaya es una población de mestizaje, por lo cual genes de riesgo para otras poblaciones, pueden no serlo en nuestra población y viceversa. Estudiar SNP de ancestralidad para poder caracterizar la población de estudio, podría ayudar a caracterizar la cohorte y correlacionarlo con la patogenia del LES.

En nuestro estudio observamos que los lúpicos presentaban mayor proporción de arg/arg que los controles, la explicación patogénica aún no la sabemos, planteamos se pueda deber a una mayor actividad apoptótica celular que lleva a un aumento de la exposición de autoantígenos predisponiendo al LES. Para confirmar esta hipótesis se podría medir la apoptosis de pacientes lúpicos y compararlos con controles. Hoy en día, existen distintas técnicas que permiten medir la apoptosis celular, desde la valoración de alteraciones citomorfológicas, fragmentación del ADN, detección de caspasas, alteración en membranas celulares, hasta los ensayos mitocondriales. La medición de la apoptosis y posterior correlación con los distintos genotipos y alelos sería una buena técnica a futuro para complementar nuestro estudio.

Por último, el estudio de las *omicas* viene tomando terreno en estos últimos años. Cada vez existe mayor evidencia que la clasificación del LES se basará en un enfoque más holístico, el cual no solo involucre la genómica, sino que también tome en cuenta el fenotipo clínico, serológico, el genotipo, transcriptoma y el metaboloma. De esta forma se establecerán distintos Clusters en el LES. Esto será clave en el futuro para realizar un tratamiento individualizado, basado en patrones moleculares específicos y perfiles de expresión génica, evitando fracasos en los tratamientos de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Kiriakidou M, Lee Ching C. Systemic Lupus Erythematosus. *Ann Intern Med.* 2020 Jun 2;172(11):ITC81-ITC96. doi: 10.7326/AITC202006020.
2. George C, Tsokos MD. Mechanisms of Disease, Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med* 2011; 365:2110-21
3. Lewis MJ, Jawad AS. The effect of ethnicity and genetic ancestry on the epidemiology, clinical features and outcome of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2017; 56 (suppl 1): i67–77
4. Pons-Estel BA, Bonfa E, Soriano ER, et al. First Latin American clinical practice guidelines for the treatment of systemic lupus erythematosus: Latin American Group for the Study of Lupus (GLADEL, Grupo Latino Americano de Estudio del Lupus)-Pan-American League of Associations of Rheumatology (PANLAR). *Ann Rheum Dis* 2018; 77: 1549–57
5. Dörner T, Furie . Novel paradigms in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 2019; 393: 2344–58
6. Abul K, Abbas MD. Enfermedades de la inmunidad, en: Robbins y cotran, Patología estructural y funcional. Barcelona, Elsevier, 7ma edición, 2005, capítulo 6, p 232-239

7. Fanouriakis A ,Tziolos N, Bertsias G, Boumpas DT. Update on the diagnosis and management of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2020;0:1–12. doi:10.1136/annrheumdis-2020-218272
8. Barr SG, Zonana-Nacach A, Magder LS, Petri M. Patterns of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999;42: 2682–2688
9. Tselios K, Gladman DD, Touma Z, Su J, Anderson N, Urowitz MB. Disease course patterns in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2019;28(1):114-122. doi: 10.1177/0961203318817132
10. Ceccarelli F, Perricone C, Cipriano E, Massaro L, Natalucci F, Capalbo G, et al. Joint involvement in systemic lupus erythematosus: From pathogenesis to clinical assessment. *Arthritis and Rheumatism* 2017;47(1):53-64. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.semarthrit.2017.03.022
11. Justiz Vaillant AA, Goyal A, Bansal P, Varacallo M. Systemic Lupus Erythematosus. 2020 Nov 20. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 January. PMID: 30571026.
12. Fava A, Petri M. Systemic Lupus Erythematosus: Diagnosis and Clinical Management. *J Autoimmun.* 2019; 96: 1–13. doi:10.1016/j.jaut.2018.11.001
13. Estramil N, Díaz C, Monteghirfo R. Manifestaciones cutáneas de las enfermedades autoinmunes: Lupus cutáneo. *Arch Med interna* 2013; 35 (Supl 3): S44- 48
14. Rivero SJ, Díaz-Jouanen E, Alarcon-Segovia D. Lymphopenia in systemic lupus erythematosus. Clinical, diagnostic, and prognostic significance, *Arthritis Rheum.* 1978;21(3):295-305
15. Velo-García A, Guerreiro Castro S, Isenberg D. A Practical Perspective of the Hematologic Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Autoimmunity.* 2016 ;74:139-160. doi: 10.1016/j.jaut.2016.07.001
16. Cervera R, Khamashta M.A, Font J, Sebastiani JD, Gil A, Lavilla P, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore).* 2003;82(5):299-308.
17. Cervera R, Khamashta MA, Hughes GRV. The Euro-lupus project: epidemiology of systemic lupus erythematosus in Europe. *Lupus.* 2009;18(10):869-74
18. Anders HJ, Saxena R, Zhao M, Parodis I, Salmo JE, Mohan . Lupus nephritis. *Nature Reviews* 2020 6(1): 1-25. doi: 10.1038/s41572-019-01419.
19. Hochberg MC, Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40(9):1725. doi: 10.1002/art.1780400928.
20. Petri M, Orbai A-M, Alarcón GS, et al., Derivation and validation of the systemic lupus international collaborating clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012 Aug;64(8):2677-86. doi: 10.1002/art.34473.
21. Tedeschi SK, Johnson SR, Boumpas D, Daikh D, Dörner T, Jayne D, Kamen D, Lerstrøm K, Mosca M, Ramsey-Goldman R, Sinnette C, Wofsy D, Smolen JS, Naden RP, Aringer M, Costenbader KH, Developing and Refining New Candidate Criteria for Systemic Lupus Erythematosus Classification: An International Collaboration. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2018;70(4):571-581. doi: 10.1002/acr.23317.
22. Petri M, Goldman D, Magder LS. Validation of Proposed EULAR/Acr SLE Classification Criteria Versus SLICC SLE Classification Criteria [abstract]. *Arthritis Rheumatol.* 2018; 70 (suppl 9). <https://acrabstracts.org/abstract/validation-of-proposed-eular-acr-sle-classification-criteria-versus-slicc-sle-classification-criteria/>.
23. Choi MY, Fritzler MJ. Autoantibodies in SLE: prediction and the p value matrix. *Lupus.* 2019;28(11):1285-1293. doi:10.1177/0961203319868531.
24. Diaz C, Yandian M, Bianchi S. Enfermedades Autoinmunes sistémicas. Temas de patología médica: mecanismos de los procesos patológicos y bases para su diagnóstico y tratamiento. Departamento básico de medicina. Oficina del libro de la facultad de medicina. Edición octubre, 2017. Sección Inmunopatología, Capítulo 4, pp 67-91

25. Yaniv G, Twig G, Shor DB, Furer A, Sherer Y, Mozes O, et al. A volcanic explosion of autoantibodies in systemic lupus erythematosus: a diversity of 180 different antibodies found in SLE patients. *Autoimmunity reviews*. 2015;14(1):75-9.
26. Conti F, Ceccarelli F, Perricone C, Massaro L, Marocchi E, Miranda F, et al. Systemic Lupus Erythematosus with and without Anti-dsDNA Antibodies: Analysis from a Large Monocentric Cohort. *Mediators of inflammation*. 2015;2015:328078. doi: 10.1155/2015/328078.
27. Avery TY, de Cruys M, Austen J, Stals F, Damoiseaux JGMC. Anti-Nuclear Antibodies in Daily Clinical Practice: Prevalence in Primary, Secondary, and Tertiary Care. *J Immunol Res* 2014;2014:401739. doi: 10.1155/2014/401739.
28. Damoiseaux J.G.M.C, Cohen Tervaert J.W. From ANA to ENA: How to proceed?. *Autoimmunity Reviews* 2006;5: 10–17. doi:10.1016/j.autrev.2005.05.007
29. Wiik AS, Gordon TP, Kavanaugh AF, Lahita RG, Reeves W, Van Venrooij WJ, et al. Cutting Edge Diagnostics in Rheumatology: The Role of Patients, Clinicians, and Laboratory Scientists in Optimizing the Use of Autoimmune Serology. *Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)* 2004; 51 (2): 291–298. doi 10.1002/art.20229
30. Oliva-Menacho JE, Arroyo- Acevedo JL, Oliva-Candela JA, García-Hjarles MA. Patrones de tinción de anticuerpos antinucleares identificados por Inmunofluorescencia indirecta en pacientes con enfermedad del tejido conectivo *Rev Med Hered*. 2019; 30:33-39.
31. Copple SS, Giles SR, Jaskowski TD, et al. Screening for IgG antinuclear autoantibodies by HEp- 2 indirect fluorescent antibody assays and the need for standardization. *American Journal of Clinical Pathology*. 2012; 137(5):825-830.
32. Hoffman IE, Peene I, Veys EM, De Keyser F. Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative anti-nuclear antibody immunofluorescence screening tests. *Clinical Chemistry*. 2002; 48(12):2171-2176.
33. Stinton LM, Fritzler MJ. A clinical approach to autoantibody testing in systemic autoimmune rheumatic disorders. *Autoimmunity Reviews*. 2007; 7(1):77-84.
34. Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre Lupus Eritematoso Sistémico. Guía de Práctica Clínica sobre Lupus Eritematoso Sistémico. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Servicio de Evaluación del Servicio Canario de la Salud; 2015. Guías de Práctica Clínica en el SNS.
35. Vitali C, Bencivelli W, Isenberf D, Smolen J, Snaith M, Sciuto M et al. Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. II. Identification of the. *Clin Exp Rheumatol* 1991; 10: 541-547.
36. Fortin P, Abrahamowicz M, Clarke A, Neville C, Du Berger R, Fraenkel L et al. Do lupus disease activity measures detect clinically important change? *J Rheumatol* 2000; 27: 1421– 1428.
37. Bencivelli W, Vitali C, Isenberg D, Smolen J, Snaith M, Sciuto M. lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. III. Development of a computerised clinical chart. *Clin Exp Rheumatol* 1991; 10: 549–554.
38. Arce-Salinas A, Cardiel M. Validity of retrospective disease activity assessment in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1996; 23: 846–849.
39. Uribe A, Vilá L, McGwin G, Sanchez M, Reveille J, Alarcón G. The Systemic Lupus Activity Measure-revised, the Mexican Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), and a modified SLEDAI-2K are adequate. *J Rheumatol* 2004; 31: 1934– 1940.
40. Petri M, Kim MY, Kalunian KC, Grossman J, Hahn BH, Sammaritano LR et al. Combined oral contraceptives in women with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2005; 353: 2550–2558.
41. Stoll T, Stucki G, Malik J, Pyke S, Isenberg DA. Further validation of the BILAG disease activity index in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 756–760.

42. Isenberg D, Rahman A, Allen E, Farewell V, Akil M, Bruce IN et al. BILAG 2004. Development and initial validation of an updated version of the British Isles Lupus Assessment Group's disease activity index for patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2005; 44: 902–906.
43. Yee C-S, Farewell V, Isenberg D, Rahman A, Teh L-S, Griffiths B et al. British Isles Lupus Assessment Group 2004 index is valid for assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 4113–4119.
44. Karlson E, Daltroy L, Rivest C. Validation of a Systemic Lupus Activity Questionnaire (SLAQ) for population studies. *Lupus* 2003; 12: 280–286.
45. Ward M, Marx A, Barry N. The rating scale preference measure as an evaluative measure in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2000; 9: 696–701.
46. Chessa E, Piga M, Floris A, Devilliers H, Cauli A, Arnaud L. Use of Physician Global Assessment in systemic lupus erythematosus: a systematic review of its psychometric properties. *Rheumatology(Oxford)*. 2020;59(12):3622-3632. doi: 10.1093/rheumatology/keaa383.
47. Fanouriakis A, Kostopoulou M, Alunno A, Aringer M, Bajema I, Boletis JN, et al. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2019;0:1–10. doi:10.1136/annrheumdis-2019-215089
48. Martha Miniño. Índice de actividad lúpica y tratamiento del lupus eritematoso en dermatología. *Dermatología Rev Mex* 2008;52(1):20-28
49. Brunner H, Silverman E, To T, Bombardier C, Feldman BM. Risk factors for damage in childhood-onset systemic lupus erythematosus: cumulative disease activity and medication use predict disease damage. *Arthritis Rheum* 2002;45:436-44
50. Gladman D, Ginzler E. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 363–369
51. Gladman D, Urowitz M. The SLICC/ACR damage index: progress report and experience in the field. *Lupus* 1999; 8: 632–637
52. Nived O, Jonsen A, Bengtsson A a, Bengtsson C, Sturfelt G. High predictive value of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for survival in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2002; 29: 1398– 1400.
53. Diaz C, Bianchi S. Patogenia de las enfermedades autoinmunes. *Temas de patología médica: mecanismos de los procesos patológicos y bases para su diagnóstico y tratamiento*. Departamento básico de medicina. Montevideo, Oficina del libro de la facultad de medicina, Edición octubre, 2017, capítulo 3: 51-67
54. Robins Kumar V. Enfermedades de sistema inmunitario, enfermedades autoinmunitarias, en: *Robins y Cotran Patología estructural y funcional*, Barcelona, Elsevier, 9na edición, 2015, capítulo 6, pp 211-217
55. Liu Z, Davidson A. Taming lupus—a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nature Medicine* 2012; 18 (6): 871-882. doi:10.1038/nm.2752
56. Flesher DL, Sun X., Behrens TW, Graham RR, Criswell LA. Recent advances in the genetics of systemic lupus erythematosus. *Expert Rev. Clin. Immunol.*2010; 6 (3): 461–479
57. Deng Y, Tsao, BP. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2010; 6 (12): 683–692.
58. Alarcon Riquelme ME. Genética del lupus eritematoso generalizado. ¿Qué se sabe y a donde se va?. *Reumatol Clin.* 2010;6(1):1–2. doi:10.1016/j.reuma.2009.01.002
59. Peng Zhang, Qianjin L. Genetic and epigenetic influences on the loss of tolerance in autoimmunity. *Cellular and Molecular Immunology* 2018; 14:1–11
60. James J, Robertson J. Lupus and Epstein-Barr .*Curr Opin Rheumatol.* 2012 ; 24(4): 383–388.

61. Eric Toussiro, Jean Roudier. Epstein–Barr virus in autoimmune diseases. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2008;22(5): 883–896
62. Halenius A, Hengel H. Human Cytomegalovirus and Autoimmune Disease. *BioMed Research International* 2014;2014:1-15
63. Mislav Radić. Role of Helicobacter pylori infection in autoimmune systemic rheumatic diseases. *World J Gastroenterol* 2014; 20(36): 12839-12846
64. Jadue N, Gonzalez J. Inmunopatogenia de las enfermedades autoinmunes. *Rev. Med.Clin.Condes* 2012; 23(4)464, 472
65. Opazo M, Ortega-Rocha E, Coronado-Arrázola I, Bonifaz L, Boudin H, Neunlist M, et al. Intestinal Microbiota Influences Non-intestinal Related Autoimmune Diseases. *Front. Microbiol.*2018; 9:432
66. Lazar V, Ditu LM, Pircalabioru GG, Gheorghe I, Curutiu C, Holban AM, et al. Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer. *Front Immunol.* 2018;9:1830
67. Tsokos G, Mindy S, Lo MS, Costa Reis P, Sullivan KE. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nature* 2016; 12: 716-730.
68. Leanos-Miranda A, Cardenas-Mondragon G. Serum free prolactin concentrations in patients with systemic lupus erythematosus are associated with lupus activity. *Rheumatology* 2006; 45(1):97–101.
69. Orbach H, Zandman-Goddard G, Boaz M, Agmon-Levin N, Amital H, Szekanecz Z, et al. Prolactin and autoimmunity: hyperprolactinemia correlates with serositis and anemia in SLE patients. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012;42(2):189–98.
70. Mistry P, Kaplan MJ. Cell death in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Clin Immunol.* 2017;185: 59–73. doi:10.1016/j.clim.2016.08.010.
71. Muñoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:280-289
72. Ravichandran KS, Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:964-974
73. Mevorach D, Trahtemberg U, Krispin A, Attalah M, Zazoun J, Tabib A, Grau A, Verbovetski-Reiner I (2010). What do we mean when we write “senescence,” “apoptosis,” “necrosis,” or “clearance of dying cells”? *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Oct;1209:1-9. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05774.x.
74. Poon IK, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol* 2014;14(3):166-180
75. Squatrito D, Emmi G, Silvestri E, Ciucciarelli L, D'Elisio M, Prisco D, Emmi L. Pathogenesis and potential therapeutic targets in systemic lupus erythematosus: from bench to bedside. *Autoimmun Highlights* 2014;5:33-45. doi: 10.1007/s13317-014-0058-y
76. Kiraz Y, Adan A, Yandim MK, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol* 2016; 37(7):8471-86. doi: 10.1007/s13277-016-5035-9.
77. Chuaire-Noack L, Sánchez-Corredor MC, Ramírez-Clavijo S. p53 y su papel en el epitelio superficial del ovario. Revisión. *Investigación Clínica* 2008; 49 (4): 561-593
78. Ollereau B, Ma D. The p53 control of apoptosis and proliferation: lessons from Drosophila. *Apoptosis.* 2014;19:1421–9.
79. Fierabracci A, Pellegrino M. The Double Role of p53 in Cancer and Autoimmunity and Its Potential as Therapeutic Target *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17:1975. doi:10.3390/ijms17121975
80. Hikisz P, Kiliańska ZM. PUMA, a critical mediator of cell death— one decade on from its discovery. *Cell Mol Biol Lett.* 2012;17: 646–69
81. Beckerman R, Prives C. Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(8):a000935. doi:10.1101/cshperspect.a000935

82. Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, George DL. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol.* 2004;6:443–50.
83. Kovacs B, Patel A, Hershey JN, Dennis GJ, Kirschfink M, Tsokos GC. Antibodies against p53 in sera from patients with systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1997;40:980–982
84. Miret C, Molina R, Filella X. Relationship of p53 with other oncogenes, cytokines and systemic lupus erythematosus activity. *Tumour Bio* 2003;24:185–188
85. Piotrowski P, Lianeri M, Mostowska M, Wudarski M, Chwalinska-Sadowska H, Jagodzinski PP. Contribution of polymorphism in codon 72 of p53 gene to systemic lupus erythematosus in Poland. *Lupus* 2008; 17:148–151.
86. Nath SK, Kelly JA, Namjou B et al. Evidence for a susceptibility gene, SLEV1, on chromosome 17p13 in families with vitiligo-related systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 1401–1406.
87. Lee YH, Rho YH, Choi SJ et al. The functional p53 codon 72 polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2005; 14:842–845.
88. Lee YH, Bae S-C, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between the p53 codon 72 polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Lupus* 2012; 21: 430–437.
89. Checa Caratachea MA. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2007;20 (3) :213-221
90. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2007;449:851–61.
91. Abul K, Abbas MD. Enfermedades de la inmunidad, en: Robbins y cotran, Patología estructural y funcional. Barcelona, Elsevier, 7ma edición, 2005, p 174-176
92. Medline Plus [Internet]. Bethesda (MD): U.S. National Library of Medicine; Dental health; 2022 Sep 21 [cited 2023 Jun 23]; [about 4 screens]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1042522#frequency_tab
93. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, George DL, Murphy M: The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003; 33: 357-365.
94. Huszno J, Grzybowska E. TP53 mutations and SNPs as prognostic and predictive factors in patients with breast cancer (Review). *Oncology Letters* 2018;16: 34-40.
95. Pinto Y, Ibañez M, Rangel N, Ramirez S, Sanchez W, Vanegas D. Polimorfismos del gen P53 en cáncer mamario familiar en una población colombiana p53 y mama. *Rev Colombiana Cir* 2007;22(1):17-26.
96. Cruz JF, Quintero M *, Fernández L, Condezo G, Bastidas M, Puig J. Distribución del polimorfismo del codón 72 del gen p53 en lesiones de cuello uterino. *Rev Obstet Ginecol Venez* 2010;70(1):31-36
97. Cañas M, Morán Y, CamargME1, RiveroMB, Bohórquez A, Villegas V, et al. Polimorfismo del codón 72 de TP53 y riesgo de cáncer gástrico: estudio caso-control en individuos de la región centroccidental de Venezuela. *Invest Clin* 2009;50(2): 153 – 161.
98. Koushik A, Tranah GJ, Ma J, StampferMJ, Sesso HD, Fuchs CS, Giovannucci EL, Hunter DJ. p53 Arg72Pro polymorphism and risk of colorectal adenoma and cancer. *Int J Cancer* 2006; 119:1863-1868.
99. Toyama T, Zhang Z, Nishio M, Hamaguchi M, Kondo N, Iwase H, Iwata H, Takahashi S, Yamashita H and Fujii Y. Association of TP53 codon 72 polymorphism and the outcome of adjuvant therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2007; 9: 34
100. Bitti ML, Sacucci P, Capasso F, Piccinini S, Angelini F, Rapini N, et al. Genotypes of p53 codon 72 correlate with age at onset of type 1 diabetes in a sex specific manner. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2011; 24(7-8):437-9.
101. Pim D, Banks L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* 2004; 108: 196–199.

102. Onel KB, Huo D, Hastings D, Fryer-Biggs J, Crow MK, Onel K. Lack of association of the TP53 Arg72Pro SNP and the MDM2 SNP309 with systemic lupus erythematosus in Caucasian, African American, and Asian children and adults. *Lupus* 2009;18(1):6166
103. Sanchez E, Sabio JM, Callejas JL et al Study of a functional polymorphism in the p53 gene in systemic lupus erythematosus: lack of replication in a Spanish population. *Lupus* 2006; 15:658–661
104. Tripodi A, et al. Testing for lupus anticoagulants: all that a clinician should know. *Lupus* 2009; 18: 291–298
105. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4:295–306
106. Ballesté R, Buzzi C, Cairoli E, L Coelho Andrade LE, Danza A, Montenegro C, et al. 1er Consenso Uruguayo de Anticuerpos Antinucleares. *Rev Méd Urug* 2019; 35(4):302-315. doi: 10.29193/RMU.35.4.7
107. Zian Z , Maamar M, El Aouni M, Barakat A, Nourouti N, El Aouad R, et al. Immunological and Clinical Characteristics of Systemic Lupus Erythematosus: A Series from Morocco. *BioMed Research International* 2018; 30:3139404. doi: 10.1155/2018/3139404.
108. Urowitz MB , Gladman DD, Ibañez D, Fortin PR, Bae SC, Gordon C, et al. Evolution of Disease Burden Over Five Years in a Multicenter Inception Systemic Lupus Erythematosus Cohort. *Arthritis Care & Research* 2012; 64 (1): 132–137. DOI 10.1002/acr.20648
109. Alarcon GS, AW Friedman AW, Straaton KV, Moulds JM, J Lisse, Bastian HM, et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: III A comparison of characteristics early in the natural history of the LUMINA cohort. *Lupus* 1999;8, 197-209
110. Al Arfaj AS, Khalil N. Clinical and immunological manifestations in 624 SLE patients in Saudi Arabia. *Lupus* 2009; 18: 465-473. doi: 10.1177/0961203308100660
111. Tkachenko O, Lapin S, Mazing A, Emanuel V, Belolipetskaia E, Beliaeva I, et al. Profiling of non-criteria antiphospholipid antibodies in patients with SLE: differentiation of thrombotic SLE patients and risk of recurrence of thrombosis. *Lupus* 2020; 29(5):490-498. doi: 10.1177/0961203320909952.
112. Tincani A, Andreoli L, Chighizola C, Meroni PL, Tincani A, Andreoli L, et al. The interplay between the antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus, *Autoimmunity* 2009; 42 (4): 257259. doi: 10.1080/08916930902827918
113. Ramos-Casals M, Campoamor MT, Chamorro A, Salvador G, Segura S, Botero JC, et al. Hypocomplementemia in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome: prevalence and clinical significance in 667 patients. *Lupus*. 2004;13(10):777-83. doi: 10.1191/0961203304lu1080oa.
114. Zhang J, González LA, Roseman JM, Vilá LM, Reveille JD, Alárcon GS. Predictors of the rate of change in disease activity over time in LUMINA, a multiethnic US cohort of patients with systemic lupus erythematosus: LUMINA LXX. *Lupus*. 2010;19(6):727-33. doi:10.1177/0961203309359289.
115. Yang Y, Zhu J, Wu S, Li J, Wang M, Wang T, Lu Y. Association study between the TP53 Rs1042522G/C polymorphism and susceptibility to systemic lupus erythematosus in a Chinese Han population. *Rheumatol Int*. 2017;37(4):523-529. doi: 10.1007/s00296-017-3662-0.

ANEXOS:

ANEXO I:

Indice de Daño acumulado. SLICC/ACR SDI (Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology) Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus. ³⁴

Item	Score	Puntuación
Ocular (ambos ojos, por evaluación clínica)		
Catarata ¹	1	
Cambios en la retina o atrofia óptica ²	1	
Neuropsiquiátrico		
Afectación cognitiva ³ (déficit de memoria, dificultad en el cálculo, dificultad para la concentración, dificultad con el lenguaje escrito o hablado, deterioro en el nivel de adaptación) o psicosis mayor ⁴	1	
Convulsiones ⁵ que requiriese tratamiento durante 6 meses	1	
ACV ⁶ (score 2 si >1)	1 (2)	
Neuropatía craneal o periférica (excluir neuropatía óptica) ⁷	1	
Mielitis transversa ⁸	1	
Renal		
Filtrado glomerular medido o calculado <50%	1	
Proteinuria >3,5 grs/24 horas	1	
Enfermedad renal terminal (independientemente de diálisis O trasplante)	3	
Pulmonar		
Hipertensión pulmonar (aumento del VD o refuerzo del P2)	1	
Fibrosis pulmonar (examen físico y radiológico)	1	
Pulmón encogido (Rx)	1	
Fibrosis pleural (Rx)	1	
Infarto pulmonar (Rx)	1	
Resección por causa distinta de neoplasia	1	
Cardiovascular		
Angina o bypass coronarios	1	
Infarto de miocardio (score 2 si >1)	1 (2)	
Miocardiopatía (disfunción ventricular)		
Enfermedad valvular (soplo diastólico o sistólico >3/6)	1	
Pericarditis durante 6 meses o pericardiectomía	1	

Sistema vascular periférico		
Claudicación durante 6 meses	1	
Ulceración con pérdida de partes blandas	1	
Pérdida de tejido significativa y permanente (por ejemplo pérdida de dedos o miembros). Score 2 si >1 localización	1	
Trombosis venosa con tumefacción, ulceración o éstasis venoso)	1	
Gastrointestinal		
Infarto o resección de duodeno “terminal”, bazo, hígado o vesícula biliar por cualquier causa. Score 2 si >1	1	
Insuficiencia mesentérica	1	
Peritonitis crónica	1	
Estenosis o cirugía del tracto gastrointestinal superior	1	
Musculoesquelético		
Atrofia muscular o debilidad	1	
Artritis erosiva o deformante (incluyendo deformidades reductibles, y excluyendo necrosis avascular)	1	
Osteoporosis con fractura o aplastamiento vertebral (excluyendo necrosis avascular)	1	
Necrosis avascular. Score 2 si >1	1 (2)	
Cutáneo		
Alopecia crónica cicatricial	1	
Cicatrices extensas	1	
Ulceras cutáneas (excluyendo tumores) durante > 6 meses	1	
Fallo gonadal prematuro	1	
Diabetes (indistintamente del tratamiento)	1	
Malignidad (excluyendo displasia) score 2 si >1	1 (2)	
Total		
Daño: Cambio irreversible, no relacionado con la actividad inflamatoria, ocurrido desde el diagnóstico de LES, verificado por la valoración clínica y presente al menos durante 6 meses, a menos que fuese secundario a otro proceso. Los episodios repetidos deben ocurrir con al menos 6 meses de intervalo para puntuar 2. La misma lesión no puede ser puntuada 2 veces.		

¹ Catarata: Opacidad de la lente en cualquier ojo, permanente, ya sea primaria o bien secundaria al tratamiento esteroideo, documentada por oftalmoscopio. ² Cambios en la retina: Documentados por examen oftalmoscópico, puede ser un defecto en la visión o ceguera legal. Atrofia óptica: Documentada por examen oftalmoscópico. ³ Afectación cognitiva: Déficit de memoria, documentada por examen clínico o por tests neurocognitivos aceptados. ⁴ Psicosis mayor: Habilidad alterada para un normal equilibrio debido a razones psiquiátricas. Severa alteración en la percepción de la realidad, caracterizada por los siguientes hechos: ilusiones, alucinaciones (auditivas o visuales), incoherencias, marcada pérdida en la asociación, contenido pobre en el pensamiento, pensamiento ilógico, raro, desorganizado o comportamiento catatónico. ⁵ Convulsiones: Descarga eléctrica paroxística ocurrida en el cerebro y que produce alteraciones físicas características que incluyen movimientos tónicos y clónicos o ciertas alteraciones en el comportamiento. Sólo las convulsiones que requieran tratamiento durante 6 meses serán tomadas como daño. ⁶ ACV: Accidente

cerebrovascular que produce clínica focal como paresia, debilidad, etc. ⁷ Neuropatía: Daño o afectación de un nervio craneal o periférico, excluyendo el nervio óptico, que produzca afectación motor o sensitiva. ⁸ Mielitis transversa: Debilidad o pérdida de la sensibilidad de las extremidades inferiores con pérdida del control del esfínter urinario o anal. ³⁴

ANEXO II:

En el anexo II se muestran algunos genes de susceptibilidad al LES reconocidos hasta el momento.⁵

Función	Gen de interes	Nombre	Cromosoma	SNP
TLR/IFN signaling	<i>IRF5</i>	Interferon regulatory factor 5	7q32.1	rs2070197
	<i>PHRF1/IRF7</i>	PHD and ring finger domains 1/interferon regulatory factor 7	11p15.5	rs4963128
	<i>IRAK1/MECP2</i>	IL-1 receptor-associated kinase 1/methyl CpG-binding protein 2	Xq28	rs2269368
	<i>TNFAIP3[†]</i>	TNF- α -induced protein 3	6q23.3	rs6920220
	<i>TNIP1</i>	TNFAIP3 interacting protein 1	5q33.1	rs7708392
	<i>ITGAM</i>	Integrin, α M	16p11.2	rs1143679
TLR/IFN and lymphocyte signaling	<i>ATG5</i>	Autophagy-related 5 homolog	6q21	rs2245124
	<i>PRDM1</i>	PR domain containing 1, with ZNF domain	6q21	rs6568431
Lymphocyte development and signaling	<i>HLA-DRB1</i>	MHC, class II, DR β 1	6p21.32	rs3135394
	<i>BLK</i>	B-lymphoid tyrosine kinase	8p23.1	rs2736340
	<i>BANK1</i>	B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1	4q24	rs10516487
	<i>PTPN22</i>	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22	1p13.2	rs2476601
	<i>TNFSF4</i>	TNF superfamily, member 4	1q25.1	rs2205960