

Relación de las variantes alélicas de los genes *CTLA4* y *PADI4* con Artritis Reumatoide en un grupo de Pacientes Colombianos

Sandy Paola Gil Alvarado¹

Director: Helena Groot de Restrepo¹
Co-director: Valeriano López Segura¹

¹Laboratorio de Genética Humana. Universidad de los Andes

Resumen

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, caracterizada por inflamación crónica y erosiva que conduce al deterioro de las articulaciones. Su etiología no es clara, sin embargo, se conoce que además de los factores ambientales intervienen también los genéticos. Los factores de riesgo más importantes relacionados con la AR, son la presencia de algunas variantes alélicas de los genes HLA, PTPN22, CTLA4, TRAF1-C5, PADI4 y STAT4. El objetivo de este estudio fue evaluar la asociación de las variantes alélicas -1661G, CT60 G, -318 T del gen CTLA4 y 89 G, 90 T y 92 G de PADI4 con AR por medio del uso de la técnica de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLPs). Para ello, se analizaron 50 pacientes de la Fundación Santa Fe de Bogotá y se compararon con un grupo control. En el análisis no se encontró asociación entre los alelos de riesgo de los polimorfismos de CTLA4 con AR, así como tampoco se encontró asociación con alelos de PADI4 90 y 92. El genotipo 89A/G sí mostró asociación con la enfermedad ($p=0,027$; OR=2.45; 95% CI= 1.10-5.47).

Palabras clave: Artritis Reumatoide, polimorfismos, RFLP, autoinmune, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4), peptidyl arginine deiminase type IV (PADI4).

1. Introducción.

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, caracterizada por la inflamación crónica y erosiva de las articulaciones que conduce a la destrucción progresiva de las mismas y otras manifestaciones extra-articulares que incluye afecciones en los huesos, pulmones, corazón, sistema nervioso, riñones y otros órganos, pudiendo causar

como consecuencia de todo esto incapacidad severa a largo plazo. (Atouf et al., 2008; Firestein., 2003; Prete et al., 2011).

Esta enfermedad afecta aproximadamente al 1% de la población mundial y es tres veces más común en mujeres que en hombres. Aunque puede presentarse en la juventudes más frecuente después de los 40 años de edad (Worthington., 2005). La etiología y patogénesis de la AR no está completamente clara, pero se conoce que influyen en conjunto factores genéticos y ambientales. De este modo se sabe que el hábito tabáquico está relacionado con una predisposición a padecer la enfermedad. También se han encontrado datos que relacionan el elevado peso al nacer con este riesgo, mientras que el amamantamiento del recién nacido presenta un efecto protector relacionado con la susceptibilidad a desarrollar AR (Karouzakis et al., 2011).

Además de los factores ambientales, existen claras evidencias de la relación de una posible base genética con la AR. La prevalencia de AR en parientes en primer grado de consanguinidad está entre el 2% y el 12%, en gemelos monocigóticos entre 12% y 30% y en gemelos dicigóticos del mismo sexo entre el 5% y 10%. Estos porcentajes de incidencia son mucho mayores a los que se encuentran en el resto de la población (1%), lo que apoyan la hipótesis de una base genética y determina que hasta un 60% de la susceptibilidad a padecer AR es debida a este tipo de factores (MacGregor et al., 2000; Alamanos et al., 2005). Entre los factores genéticos de riesgo más importantes relacionado con el desarrollo de AR se han encontrado algunas variantes alélicas del Antígeno Leucocitario Humano (HLA). Específicamente los alelos DRB1*0101, *0102, *0401, *0404, *0405, *0408, *1001 y*1402 que codifican para una secuencia común de aminoácidos localizados entre la posición 70-74 en una región hipervariable de la cadena β (Atouf et al., 2008); Sin embargo, los alelos HLA- DRB1 solo alcanzan a explicar el 30% de la contribución genética en AR, por lo tanto se ha tratado de avanzar en la búsqueda de otros genes que estén implicados en el riesgo a padecer AR (du Montcel et al., 2005; Wilcox et al., 2007). Estudios de asociación de genoma completo (GWAS) han mostrado la asociación de HLA-DRB1 y PTPN22 con AR, además de identificar prometedores loci relacionados con

susceptibilidad a AR como CTLA4, TRAF1-C5, PADI4, STAT4 (Burton et al., 2007; Plenge et al., 2007; Perricone et al., 2011; Majorczyk et al., 2010; Remmers et al., 2001).

Hasta el momento los estudios realizados sobre AR en Colombia han mostrado la relación de algunos alelos HLA-DRB1 con la susceptibilidad a padecer AR en pacientes juveniles. De la misma manera se ha reportado una asociación positiva entre polimorfismos de los genes PTPN22 y STAT4 con esta enfermedad; mientras TRAF1-C5 no ha mostrado influencia en el riesgo a padecer AR en la población colombiana (Gómez et al., 2005; Garavito et al., 2004; Ramírez., 2009; Palomino et al., 2008). Debido a que cada gen puede contribuir de manera modesta al desarrollo de la enfermedad, y que la relación de cada polimorfismo es variable entre las poblaciones y los diferentes grupos étnicos, es necesario continuar con el estudio de otros genes que hayan sido reportados en la literatura internacional, de modo que podamos identificar las variantes asociadas a AR y éstas puedan ser utilizadas como marcadores de riesgo y susceptibilidad en la población colombiana. Además sería importante aportar conocimiento acerca de los mecanismos de acción involucrados en la respuesta inflamatoria autoinmune. Por lo tanto, en este estudio proponemos como objetivo principal analizar los polimorfismos CTLA4 CT60, -1661 y PADI4 89, 90, 92 y su relación con el riesgo a padecer artritis reumatoide en un grupo de pacientes colombianos.

Gen CLTA4

El antígeno-4 asociado al linfocito T (LT) citotóxico es una molécula receptora expresada principalmente en la superficie de los LT activados. Está implicada en la homeostasis inmunológica como regulador negativo de la función de las células T y por lo tanto juega un papel importante en la auto-tolerancia periférica (Harper et al., 1991). El gen CTLA4 se encuentra en el locus 2q33.3, está conformado por 4 exones y codifica para una proteína de 223 aminoácidos (Anaya et al., 2005). Se han reportado alrededor de 17 polimorfismos en el gen (Johnson et al., 2001; Fernández., 2009). Sin embargo, sólo algunos han sido ampliamente estudiados. El polimorfismo -318C/T y el -1661A/G ubicados en el promotor han demostrado asociación con enfermedades autoinmunes en algunas poblaciones,

probablemente por alterar el sitio de unión de factores de transcripción (Chistiakov et al., 2006; Hudson et al., 2002; Ling et al., 1999). El polimorfismo +49A/G, que genera un cambio de treonina por alanina en el exón 1, ha sido asociado con diabetes mellitus tipo 1 y con varias enfermedades autoinmunes. Aunque en AR los resultados son inconsistentes (Donner et al., 1996; Kouki et al., 2000; Flinstad et al., 1999; Matsushita et al., 1999; Barton et al., 2000). El polimorfismo de la región 3' UTR, CT60, provoca un cambio de adenina por guanina que se ha asociado con la reducción de los niveles del mRNA de este gen y el incremento de susceptibilidad en varias enfermedades autoinmunes (Ueda et al., 2003).

Gen PADI4

La peptidil arginina deiminasa tipo IV, es uno de los miembros de la familia de genes PADI que codifican para enzimas responsables de la modificación postraducciona de residuos de arginina a citrulina mediante un proceso de deiminación (Zhou et al. 2002). El gen se encuentra localizado en 1p36.13, está compuesto por 16 exones y codifica para la proteína PAD4 de 663 aminoácidos. La presencia de autoanticuerpos dirigidos a proteínas citrulinadas son marcadores tempranos y específicos de AR, lo que sugiere que este cambio covalente (citrulinación) juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (Schellekens et al., 2000; Zhou et al., 2002). En varios estudios se ha demostrado que algunos polimorfismos del gen PADI4 confieren susceptibilidad a AR en la población asiática. Sin embargo, en algunas poblaciones caucásicas no se ha observado asociación entre PADI4 y AR (Suzuki et al., 2003; Kang et al., 2006; Barton et al., 2004). En pacientes Egipcios, los polimorfismos PADI4-92 y PADI4-102 muestran una asociación significativa con AR, en tanto que PADI4-89, PADI4-90 y PADI4-104 están relacionados con el incremento del riesgo a padecer la enfermedad en la población China (Abd-Allah et al., 2011; fan et al., 2008).

Aunque se ha encontrado una gran evidencia del papel de polimorfismos de los genes CTLA4 y PADI4 en la etiología de AR en varias poblaciones, no existe claridad acerca de la extrapolación de estos hallazgos en otras y por lo tanto resulta interesante investigar si

algunos de los polimorfismos asociados a AR en otras poblaciones también lo están en la población colombiana.

2. Objetivos generales:

- Relacionar la presencia de variantes alélicas de los genes CTLA4 y PADI4 con el desarrollo de Artritis Reumatoide en un grupo de pacientes colombianos.

2.1. Objetivos específicos:

- Evaluar las frecuencias de los polimorfismos PADI4-89, PADI4-90 y PADI4-92 en la muestra de estudio.
- Evaluar las frecuencias de los polimorfismos CT60, -1661A/G, -318C/T del gen CTLA4 en la muestra de estudio.
- Estudiar la asociación de los polimorfismos con Artritis Reumatoide en el grupo de pacientes.

3. Materiales y Métodos.

Diseño del estudio

Se planteó un estudio de casos y controles para establecer la asociación entre la artritis reumatoide (AR) y algunos polimorfismos de nucleótido simple (SNP) de los genes CTLA4 y PADI4 en un grupo de pacientes colombianos. Este estudio es una parte inicial del proyecto “Caracterización genética de la artritis reumatoide en pacientes colombianos para un mejor diagnóstico” del Laboratorio de Genética Humana de la Universidad de los Andes en colaboración con el grupo de investigación en Inmunología y Biología Molecular Reumavance de la Fundación Santa Fe de Bogotá.

Muestra

Se estudiaron 50 pacientes de la ciudad de Bogotá que fueron seleccionados por médicos

reumatólogos de la Fundación Santa Fe de Bogotá en Colombia. Éstos fueron diagnosticados según los criterios de inclusión del American College of Rheumatology (ACR) (Tabla 1). No se tuvieron en cuenta pacientes diagnosticados con otras enfermedades autoinmunes u óseas. De los pacientes diagnosticados con AR, 43 fueron mujeres y 7 hombres.

Tabla 1. Criterios del ACR para el diagnóstico de AR

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

Como controles se seleccionaron personas sanas que hacen parte de los proyectos de investigación que desarrolla el grupo Reumavance de la Fundación Santa Fe de Bogotá y representan a la población de Bogotá D.C.

Consideraciones éticas

Las personas (casos y controles) dispuestas a participar en este proyecto de investigación aprobaron y firmaron el consentimiento informado conforme a lo establecido en la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud “Normas Científicas, Técnicas y

Administrativas para la Investigación en Salud”. El Comité de Ética de la Universidad de los Andes aprobó este estudio. A cada participante se le asignó un código para su identificación de modo que se garantizar el anonimato de los pacientes durante el tratamiento de las muestras y no existiera ningún posible sesgo por parte del investigador

Toma de muestra

Se recolectaron aproximadamente 10ml de sangre periférica mediante punción venosa en tubos con anticoagulante EDTA. Estas muestras se mantuvieron refrigeradas hasta el momento que se realizó la extracción del ADN.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con el kit para aislamiento de ADN humano “CorpoGen DNA 2000” de Corpogen, que se basa en una técnica de Salting-out. Las concentraciones y purzas del ADN se evaluaron en un espectrofotómetro NanoDrop[®], sólo aceptándose para el estudio las muestras con una pureza respecto a la relación A260/A280 entre 1,65 y 1,9.

PCR y Genotipificación de los SNPs

Las PCRs se realizaron utilizando el kit “PCR 100 2X”de Corpogen. El producto es una mezcla lista para PCR que contiene, agua grado biología molecular y concentraciones adecuadas de todos los reactivos necesarios para una eficiente amplificación del DNA: Taq DNA polimerasa (TucanTaq), dNTPs, cloruro de magnesio, tampón de reacción y sustancias estabilizantes. El volumen total de la reacción fue de 20µl, que contenían 10µl de PCR 100 2X, 5.5µl de agua grado biología molecular, 0.75µl de cada primer a una concentración de 10µmol/µl y 3µl de ADN. Los primers utilizados para amplificar los fragmentos que contenían cada uno de los SNPs, fueron extraídos de trabajos publicados con anterioridad (Tabla 2). Los tamaños de los amplicones fueron verificados usando las secuencias NCBI NG_023261.1 (PADI4) y NCBI NG_011502.1 (CTLA4) extraídas de la base de datos del NCBI y analizadas en el programa “Serial Cloner 2.6.0”.

La PCR se realizó en un termociclador Axigen Maxigen con el siguiente programa de termociclaje: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos; 35 ciclos de 45 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de annealing específica para la amplificación de cada fragmento (tabla 3), 1 minuto de extensión final a 72°C; y 10 minutos de extensión final a 72°C.

La determinación de los alelos se realizó a través del método PCR-RFLP reportado en estudios anteriores (Hudson et al., 2002; Rasmussen et al., 2001; Heggarty et al., 2007; Faragó et al., 2007). Con el programa “Serial Cloner” se verificó el sitio de corte de cada enzima y el tamaño y número de fragmentos resultantes después de la digestión (tabla 3). Los productos resultantes de las PCRs fueron incubados con su enzima de restricción respectiva (Tabla 3) durante 12 horas, en un volumen final de reacción de 20µl que contenía: 6µl del producto de la PCR, 12µl de agua libre de nucleasas, 1µl de Buffer y 1µl de la enzima de restricción (Fermentas).

Los resultados de las digestiones fueron analizados por medio de electrofesis en gel de agarosa al 2% (Bioline). Como agente visualizador se utilizó el intercalante GelRed™ al 2%. Las muestras se corrieron a 70V durante 60 minutos en una celda Bio-Rad Wide Mini-Sub cell GT. Los productos fueron visualizados en el fotodocumentador de geles Bio-Rad Gel Doc™ con digitalización de imagen a través del software Quantity One. El genotipo de cada polimorfismo fue determinado según el tamaño y número de fragmentos observados en el gel.

Tabla 2. Parejas de primers usadas para amplificar los fragmentos que contienen los diferentes SNP de los genes *PADI4* y *CTLA4*.

<i>Gen</i>	SNP	Primer Forward (5' - 3')	Primer Reverse (5' - 3')	Referencia
<i>PADI4^a</i>	89	CTCCTCACTGCATCCTCTGCT	CTTTCATCGTCAGGGTCACCTCTA	Faragó et al., 2007
	90	CAAAGTCCCACGATCTGCAAG	AGGACACTATGGCTGGAAGAAGC	Faragó et al., 2007
	92	AGCTTTTTGCTTTCCCTCCATT	GTCTGACTGGCTAGAAACCATGC	Faragó et al., 2007
<i>CTLA4^b</i>	-1661	CTAAGAGCATCCGCTTGCACCT	TTGGTGTGATGCACAGAAGCCTTTT	Hudson et al., 2002
	-318	AAATGAATTGGACTGGATGGT	TTACGAGAAAGGAAGCCGTG	Rasmussen et al., 2001
	CT60	AGTGCTTGATTGCGTGG	TGCTGAGACTATACATTGGTTAAG	Heggarty et al., 2007

Tabla 3. Condiciones de amplificación y digestión de los fragmentos.

Gen	SNP	Temperatura de Anneling (°C)	Tamaño del amplicón (pb)	Enzima de Restricción	Tamaño de digestión
PADI4	89	55	195	BsuRI	G:40+41+114 A:41+154
	90	55	878	MlsI	T:106+179+593 C:179+699
	92	56	385	HpaII	G:100+134+151 C:100+285
CTLA4	-1661	58	486	TruII	A:347+139 G:486
	-318	60	247	TruII	C:21+226 T:21+94+132
	CT60	51	765	Tail	A:765 G:614+151

Análisis de los datos

Para el análisis de los datos se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas. Se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg en la población control (Iniesta et al., 2005). Para evaluar la asociación de los polimorfismos con AR se construyeron las correspondientes tablas de contingencia y se contrastó la hipótesis de asociación a través de un análisis de χ^2 . También se calcularon los *odds ratios*(OR) de cada genotipo con intervalos de confianza (IC) del 95% para cuantificar la magnitud de la asociación. El valor de p menor de 0,05 se consideró estadísticamente significativo. Para realizar los análisis estadísticos descritos se utilizó el programa SNPStats.

4. Resultados

Antes de realizar el análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas de todos los polimorfismos, se comprobó que el grupo control estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg para cada uno de los polimorfismos (Tabla 4).

Tabla 4. Valores p para la evaluación del equilibrio Hardy-Weinberg.

HW p-VALUE		
SNP	Controles	Casos
CTLA4 CT60	0,5	0,21
CTLA4 -318	1	1
CTLA4 -1661	1	0,25
PADI4 89	0,25	0,16
PADI4 90	1	0,087
PADI4 92	0,57	0,78

En este caso, tanto pacientes como controles se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Análisis de los polimorfismos CTLA4 -1661A/G, -318 C/T y CT60

El estudio del polimorfismo -1661 A/G del gen CTLA4 nos mostró que para la población analizada las frecuencias de los heterocigotos A/G para los casos (30%) fue mayor que para los controles (28%), de la misma manera se observaron frecuencias más altas del genotipo de riesgo G/G en los casos (2%) respecto a los controles (8%) (Fig. 1); sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias de los dos grupos en ninguno de los modelos asumidos (Tabla 5).

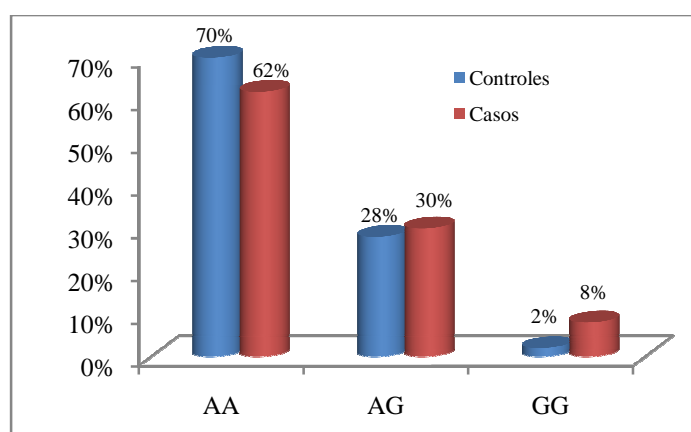


Figura 1. Distribución genotípica de pacientes y controles para el polimorfismo CTLA4 -1661

La figura 1 muestra que la mayor parte de los sujetos, tanto en pacientes como controles, fueron los homocigotos A/A (70% y 62% respectivamente); entre tanto, los homocigotos G/G se presentaron en menor frecuencia en ambas poblaciones.

Para ninguno de los análisis de los modelos asumidos se observaron diferencias de frecuencias es significativas entre los grupos de pacientes y controles (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de riesgo del CTLA4 -1661 en función del modelo de herencia

Modelo	Genotipo	Control	Casos	OR (95% CI)	P-value
Co	A/A	35 (70%)	31 (62%)	1.00	0.33
	A/G	14 (28%)	15 (30%)	1.21 (0.50-2.90)	
	G/G	1 (2%)	4 (8%)	4.52 (0.48-42.59)	
Do	A/A	35 (70%)	31 (62%)	1.00	0.4
	A/G-G/G	15 (30%)	19 (38%)	1.43 (0.62-3.29)	
Re	A/A-A/G	49 (98%)	46 (92%)	1.00	0.16
	G/G	1 (2%)	4 (8%)	4.26 (0.46-39.55)	
Ovdo	A/A-G/G	36 (72%)	35 (70%)	1.00	0.83
	A/G	14 (28%)	15 (30%)	1.10 (0.46-2.62)	

Co: codominante; Do: dominante; Re: recesivo; Ovdo: sobredominante

En relación al análisis del polimorfismo -318 C/T, se observó que la mayoría de los individuos en ambos grupos tenían el genotipo C/C (76% controles, 74% pacientes). Mientras los homocigotos TT fueron los menos frecuentes para el grupo de pacientes (2%), lo cual correspondió a solo uno de los 50 analizado. En tanto, en el grupo control estos homocigotos no fueron presenciados (0%).

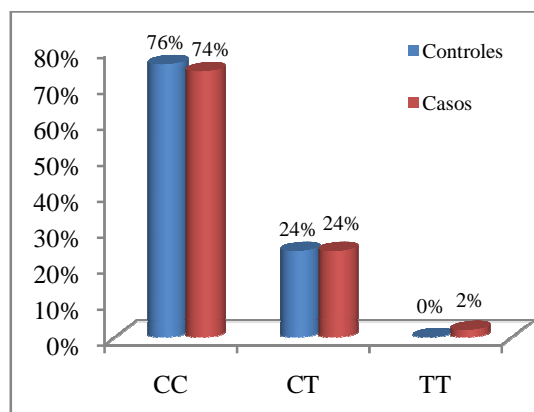


Figura 2. Distribución genotípica de pacientes y controles para el polimorfismo CTLA4 -318

Las diferencias entre las frecuencias de los genotipos C/T y T/T, que tenían el alelo de riesgo T, entre los grupos de pacientes versus controles no fue significativa.

Tabla 6. Análisis de riesgo del CTLA4 -318 en función del modelo de herencia

Modelo	Genotipo	Control	Casos	OR (95% CI)	P-value
Co	C/C	38 (76%)	37 (74%)	1.00	0.5
	C/T	12 (24%)	12 (24%)	1.03 (0.41-2.58)	
	T/T	0 (0%)	1 (2%)	NA (0.00-NA)	
Do	C/C	38 (76%)	37 (74%)	1.00	0.82
	C/T-T/T	12 (24%)	13 (26%)	1.11 (0.45-2.75)	
Re	C/C-C/T	50 (100%)	49 (98%)	1.00	0.24
	T/T	0 (0%)	1 (2%)	NA (0.00-NA)	
Ovdo	C/C-T/T	38 (76%)	38 (76%)	1.00	1
	C/T	12 (24%)	12 (24%)	1.00 (0.40-2.50)	

Co: codominante; Do: dominante; Re: recesivo; Ovdo: sobredominante

En el caso de CT60, las frecuencias para los homocigotos A/A (13% controles, 16% casos) fueron las menores en ambos grupos. Mientras que los que portaban el alelo de riesgo en forma homocigotos G/G, fueron los que presentan mayores frecuencias en la población de estudio (48% controles, 48% casos).

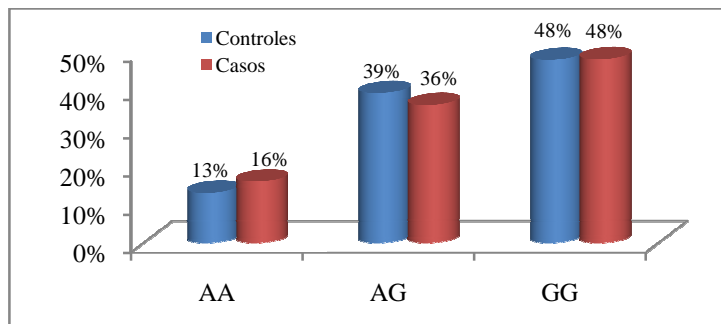


Fig 3. Distribución genotípica de controles y casos para CTLA4 CT60

En la tabla 7, podemos observar que los OR no muestran ningún tipo de asociación en ninguno de los modelos utilizados.

Tabla 7. Análisis de riesgo del CTLA4 CT60 en función del modelo de herencia

Modelo	Genotipo	Control	Casos	OR (95% CI)	P-value
Co	A/A	6 (13%)	8 (16%)	1.00	0.9
	A/G	18 (39.1%)	18 (36%)	0.92 (0.38-2.19)	
	G/G	22 (47.8%)	24 (48%)	1.22 (0.37-4.08)	
Do	A/A	6 (13%)	8 (16%)	1.00	0.99
	A/G- G/G	40 (87%)	42 (84%)	0.79 (0.25-2.47)	
Re	A/A -A/G	24 (52%)	26 (52%)	1.00	0.68
	G/G	22 (48%)	24 (48%)	1.01 (0.45-2.24)	
Ovdo	G/G-A/A	28 (60.9%)	32 (64%)	1.00	0.75
	A/G	18 (39.1%)	18 (36%)	0.88 (0.38-2.00)	

Co: codominante; Do: dominante; Re: recesivo; Ovdo: sobredominante

PADI4 89

Para este polimorfismo se puede analizar que en la población de estudio, los homocigotos G/G se encuentran en menor frecuencia (24% controles; 18% casos), mientras que los portadores del genotipo AA estaban en una mayor proporción, tanto en casos como controles (36% controles; 20% casos).

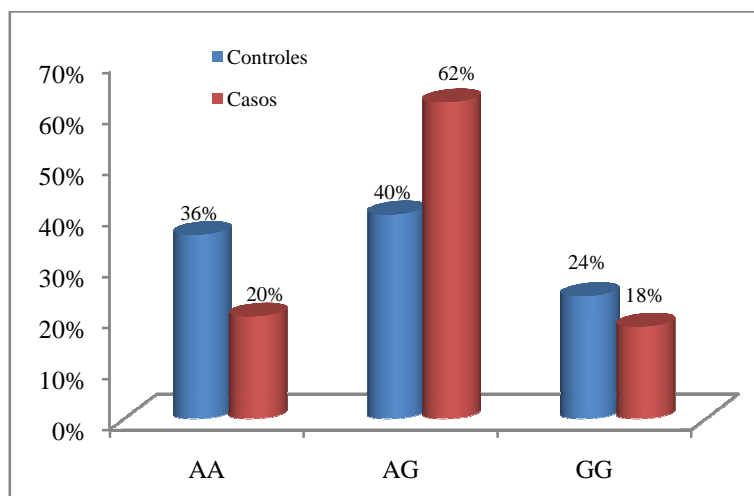


Figura 4. Distribución genotípica de pacientes y controles para el polimorfismo PADI4 89

La proporción de heterocigotos es la de mayor porcentaje tanto en los controles como en los casos (40% y 62% respectivamente). Las diferencias entre las frecuencias para los heterocigotos entre casos (62%) y controles (40%) fue significativa en el modelo sobredominante ($p=0,027$; $OR=2.45$; $95\% CI= 1.10-5.47$).

Tabla 8. Análisis de riesgo del PADI4 89 en función del modelo de herencia

Modelo	Genotipo	Control	Casos	OR (95% CI)	P-value
Co	A/A	18 (36%)	10 (20%)	1.00	0.077
	A/G	20 (40%)	31 (62%)	2.79 (1.07-7.26)	
	G/G	12 (24%)	9 (18%)	1.35 (0.42-4.30)	
Do	A/A	18 (36%)	10 (20%)	1.00	0.073
	A/G-G/G	32 (64%)	40 (80%)	2.25 (0.91-5.55)	
Re	A/A-A/G	38 (76%)	41 (82%)	1.00	0.46
	G/G	12 (24%)	9 (18%)	0.70 (0.26-1.83)	
Ovdo	A/A-G/G	30 (60%)	19 (38%)	1.00	0.027
	A/G	20 (40%)	31 (62%)	2.45 (1.10-5.47)	

Co: codominante; Do: dominante; Re: recesivo; Ovdo: sobredominante

PADI4 90 y 92

La comparación de la distribución de las frecuencias de PADI4 90, entre los controles y los pacientes no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, existe una moderada diferencia entre el genotipo heterocigoto C/T para pacientes (64%) y controles (50%). Las frecuencias del genotipo T/T exhibieron valores similares entre ambos grupos (18% controles, 16% casos).

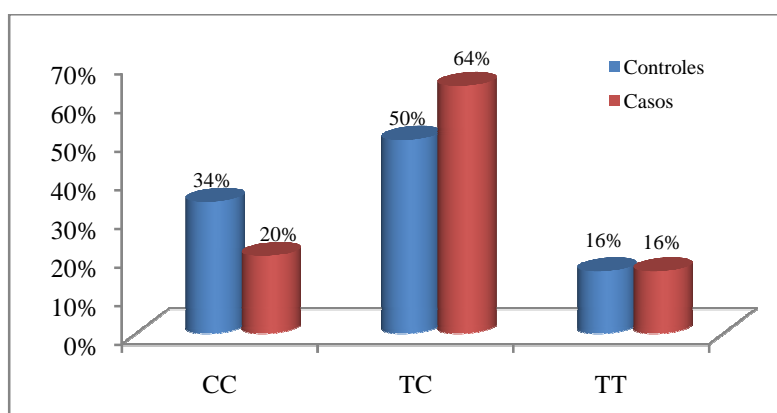


Figura 5. Distribución genotípica de pacientes y controles para el polimorfismo PADI4 90

Con respecto a los modelos planteados, podemos ver en la tabla 9, que los OR tampoco son significativos para ninguno de ellos, lo cual supone que no existe ningún tipo de asociación.

Tabla 9. Análisis de riesgo del PADI4 90 en función del modelo de herencia

Modelo	Genotipo	Control	Casos	OR (95% CI)	P-value
Co	C/C	17 (34%)	10 (20%)	1.00	0.26
	T/C	25 (50%)	32 (64%)	2.18 (0.85-5.57)	
	T/T	8 (16%)	8 (16%)	1.70 (0.49-5.95)	
Do	C/C	17 (34%)	10 (20%)	1.00	0.11
	T/C-T/T	33 (66%)	40 (80%)	2.06 (0.83-5.10)	
Re	C/C-T/C	42 (84%)	42 (84%)	1.00	1
	T/T	8 (16%)	8 (16%)	1.00 (0.34-2.91)	
Ovdo	C/C-T/T	25 (50%)	18 (36%)	1.00	0.16
	T/C	25 (50%)	32 (64%)	1.78 (0.80-3.96)	

Co: codominante; Do: dominante; Re: recesivo; Ovdo: sobredominante

Los análisis estadísticos de PADI4 92 indicaron que no existen diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas de controles y casos (Tabla 10). Sin embargo, existe una moderada diferencia entre el genotipo heterocigoto C/G para pacientes (54%) y controles (45%). Las frecuencias del genotipo C/C y GG fueron muy similares para ambos grupos (Fig 6).

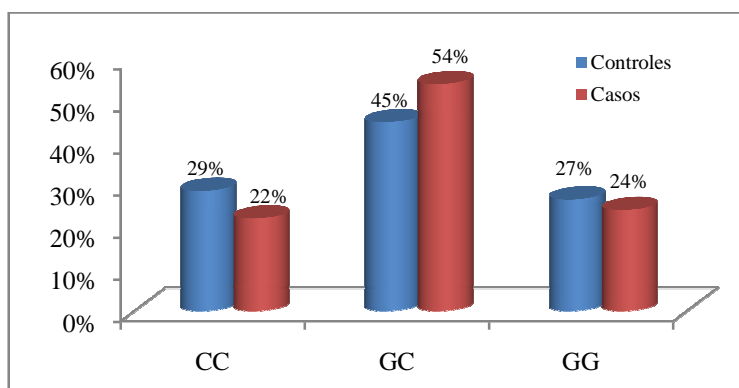


Figura 6. Distribución genotípica de pacientes y controles para el polimorfismo PADI4 92

Los OR tampoco fueron significativos para ninguno de los modelos analizados, mostrando que no existe asociación alguna entre la presencia del alelo de riesgo G y AR (tabla 9).

Tabla 10. Análisis de riesgo del PADI4 92 en función del modelo de herencia

Modelo	Genotipo	Control	Casos	OR (95% CI)	P-value
Co	C/C	14 (28.6%)	11 (22%)	1.00	0.64
	G/C	22 (44.9%)	27 (54%)	1.56 (0.59-4.12)	
	G/G	13 (26.5%)	12 (24%)	1.17 (0.39-3.58)	
Do	C/C	14 (28.6%)	11 (22%)	1.00	0.45
	G/C-G/G	35 (71.4%)	39 (78%)	1.42 (0.57-3.53)	
Re	C/C-G/C	36 (73.5%)	38 (76%)	1.00	0.77
	G/G	13 (26.5%)	12 (24%)	0.87 (0.35-2.17)	
Ovdo	C/C-G/G	27 (55.1%)	23 (46%)	1.00	0.36
	G/C	22 (44.9%)	27 (54%)	1.44 (0.65-3.18)	

Co: codominante; Do: dominante; Re: recesivo; Ovdo: sobredominante

5. Discusión

Estudios realizados del gen CTLA4 sugieren que es un importante regulador negativo de los linfocitos T, por tanto la búsqueda de asociación entre algunos polimorfismos de este gen y algunas enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Grave's, la diabetes mellitus insulino-dependiente, enfermedades de la tiroides y la artritis reumatoide ha resultado atractiva para muchos investigadores (Saito., 1998; Rasmussen et al., 2001).

En este estudio, donde se analizó la asociación de los polimorfismos -1661A/G, -318 C/T y CT60 de CTLA4 con artritis reumatoide, los resultados indicaron que las diferencias de las frecuencias genotípicas entre ambos grupos (pacientes y controles), no eran significativas.

Por lo tanto no se concluyó que no existía una asociación entre los alelos de riesgo y la enfermedad. Sin embargo, en el caso de -1661, el genotipo de protección A/A fue moderadamente más alto en los controles comparados con los pacientes, mientras que el considerado de riesgo (G/G) fue moderadamente más alto en pacientes. Este genotipo ha sido asociado con una reducción del control de las células T. La explicación probable para la asociación entre algunos polimorfismos del gen CTLA4 y enfermedades autoinmunes como la AR, es que éstos podrían afectar la expresión o función del receptor CTLA, permitiendo que se desarrolle autorreactividad (Khoury et al., 2004).

El polimorfismo -1661A/G ha sido ampliamente estudiado en algunas enfermedades autoinmunes, sin embargo, según la literatura consultada, la asociación de éste con la AR no ha sido explorada. Otro polimorfismo presente en la región promotora (-318C/T) ha sido estudiado tanto en población coreana y española, aunque no se encontró asociación con la enfermedad en ninguno de los dos casos (Lee et al., 2002; González., 1999). Algunos reportes han mostrado asociación de CT60 con la artritis reumatoide en población China, mientras que en poblaciones inglesas y españolas no se ha encontrado esta misma relación (Lei et al., 2005; Orozco et al., 2004; Barton et al., 2004). Esto demuestra que en diferentes poblaciones y etnias, los SNPs tienen efectos diferentes.

Baniasadi et al, estudiaron la asociación de cinco polimorfismos del gen CTLA4 (-318C/T, -1661A/G, -1722 C/T, +49A/G y CT60) con la diabetes tipo 1, reportando que el alelo G en el locus -1661 estaba asociado con la enfermedad, mientras los otros polimorfismos no mostraron ningún tipo de asociación (2006). Este mismo alelo se había encontrado anteriormente asociado a diabetes tipo 1 en una población del sur de Marruecos (Bouqbis et al., 2003).

En relación con los polimorfismos estudiados del gen PADI4 (89, 90 y 92), no se encontró una asociación con AR similar a la observada por Suzuki et al en el 2003 en población japonesa, sin embargo se observó que el genotipo heterocigoto A/G de PADI4 89 representa un factor de riesgo para este padecimiento. El polimorfismo PADI 89 A/G, representa el cambio de una adenina por una guanina, que durante la formación de la

proteína se refleja en el cambio de serina por glicina; es decir, una diferencia electrostática generada por el reemplazo de un aminoácido polar por otro no- polar, que eventualmente podría generar cambios en las propiedades funcionales de la enzima, tales como la especificidad de ésta a su sustrato y/o la tasa catalítica.

El creciente interés por investigar la asociación existente entre los alelos de los polimorfismos mencionados y AR obedece a que PADI4 está involucrado en la vía de citrulinación de algunas proteínas que se encuentran con esta modificación postraducciona l en la articulación inflamada (pannus) y que normalmente no lo están en el tejido sano. Además la respuesta inmune en contra de los antígenos citrulinados son la herramienta para el diagnóstico temprano y altamente específico de la artritis reumatoide (Suzuki et al., 2007).

Desde el estudio de los polimorfismos del gen PADI4 (89, 90, 92 y 104) en población japonesa por Suzuki et al, se han realizado gran cantidad de estudios que involucran éstos y otros polimorfismos (PADI4 96 y 102) de este gen, en poblaciones geográficas y étnicamente diferentes, así como también se han realizado estudios tratando de corroborar los resultados en población japonesa (Suzuki et al., 2003; Barton., 2004., Caponi et al., 2005; Iwamoto., 2005). Alelos de PADI4 han mostrado asociación en población japonesa, coreana, china y egipcia (Suzuki et al., 2003; Freudenberg et al., 2011; Fan et al., 2008). Mientras estudios en población francesa blanca y población inglesa indican que no existe asociación entre los alelos de PADI4 y AR (Caponi et al., 2005; Barton., 2004).

6. Conclusiones

1. El genotipo heterocigoto PADI 89A/G se encuentra asociado con AR en la población estudiada ($p=0,027$; OR=2.45; 95% CI= 1.10-5.47).
2. Los Polimorfismos CTLA4 -1661G, -318 T, CT60 G y PADI4 90T y 92G no presentan asociación con AR en la población de estudio.

3. Este estudio muestra los resultados de asociación de los polimorfismos estudiados con AR, sin embargo, éstos deben ser corroborados en una población con mayor número de individuos.

7. Agradecimientos

A Dios por permitir que todas las cosas sean posibles, a mis padres, mi esposo e hija por el apoyo, la confianza y la espera.

Agradezco a la Dra. Helena Groot, directora del laboratorio de Genética Humana y de este proyecto, por su guía constante, la experiencia y el conocimiento brindado. Al Dr. Valeriano López, codirector de este estudio, por su disposición en todo momento de ayudarme y asesorarme en la realización de este proyecto. A Diana Narváez por sus valiosos comentarios y por ayudarme a buscar soluciones.

A los reumatólogos Paola Coral, Gerardo Quintana y Paul Méndez por el diagnóstico de los pacientes y por suministrar las muestras para el proyecto “Caracterización genética de la artritis reumatoide en pacientes colombianos para un mejor diagnóstico”.

Al Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de los Andes por financiar este proyecto a través de Proyecto Semilla.

Finalmente, gracias a todos mis compañeros del laboratorio de genética humana por la compañía, por sus opiniones y por hacer todos los momentos más agradables.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abd-Allaha S, El-Shala A, Shalabya S, Pashaa H, Abou El-Saoudb A, El-Najjarb A, El-Shahawy E. PADI4 polymorphisms and related haplotype in rheumatoid arthritis patients. *Joint Bone Spine* 2011, doi:10.1016/j.jbspin.2011.07.006

Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *AutoimmunRev* 2005; 4:130–6.

Anaya J, Shoenfeld Y, Correa P, García M, Cervera R. Autoinmunidad y enfermedad autoinmune. Ed 2005. Pág 113-115.

- Atouf O, Benbouazza K, Brick C, Bzami F, Bennani N, Amine B, Hajja-Hassouni N, Essakali M. HLA polymorphism and early rheumatoid arthritis in the Moroccan population. *Joint Bone Spine* 2008; 75: 554-558
- Baniasadi V, Narain N, Goswami R, Das SN. Promoter region -318 C/ T and -1661 A/G CTLA-4 single nucleotide polymorphisms and type 1 diabetes in North Indians. *Tissue Antigens*. 2006; 67:383-9.
- Barton A, Bowes J, Eyre S, Spreckley K, Hinks A, John S, Worthington J. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population is not associated in a United Kingdom population. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1117-1121.
- Barton A, Jury F & Eyre S *et al.* Haplotype analysis in simplex families and novel analytic approaches in a case-control cohort reveal no evidence of association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 748–752.
- Barton A, Myerscough A, John S, Gonzalez-Gay M, Ollier W, Worthington J. A single nucleotide polymorphism in exon 1 of cytotoxic T-lymphocyte-associated-4 (CTLA-4) is not associated with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2000; 39:63.
- Bouqbis L, Izaabel H, Akhayat O, Pérez-Lezaun A, Calafell F, Bertranpetit J and Comas D. Association of the CTLA4 promoter region (-1661G allele) with type 1 diabetes in the South Moroccan population *Genes and Immunity* 2003; 4: 132–137
- Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, et al. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447: 661-78.
- Caponi L, Petit-Teixeira E, Sebbag M, Bongiorno F, Moscato S, Pratesi F, Pierlot C, Osorio J, Chapuy-Regaud S, Guerrin M, Cornelis F, Serre G, Migliorini P. A family based study shows no association between rheumatoid arthritis and the PADI4 gene in a white French population. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 587–593
- Chistiakov D, Savost'yanov K, Turakulov R, Efremov I, Demurov L. Genetic analysis and functional evaluation of the C/T(-318) and A/G(-1661) polymorphisms of the CTLA-4 gene in patients affected with Graves' disease. *Clinical Immunology* 2006; 118: 233 – 242
- Donner H, Rau H, Walfish PG, Braun J, Siegmund T, Finke R; Herwig J, Usadel KH, Bandenhoop K. CTLA4 alaline-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type I diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 82:143.
- Du Montcel ST, Michou L, Petit-Teixeira E, et al. New classification of HLADRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum* 2005; 52:1063–8.
- Fan L, Wang W, Wang Q, Zong M, Yang L, Zhang H, Sun L, Lu T and Han J. A functional haplotype and expression of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Chinese. *Tissue Antigens* 2008; 72: 469–473.
- Faragó B, Talián GC, Maász A, Magyari L, Horvatovich K, Kovács B, Cserép V, Kisfali P, Kiss CG, Czirják L, Meleg B. Prevalence of functional haplotypes of the peptidil arginina deiminasa citrullinating enzyme gene in patients with rheumatoid arthritis: no influence of the presence of anti-citrullinated peptide antibodies. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 4:523-8.

Freudenberg J, Lee HS, Han BG, et al. Genome-wide association study of rheumatoid arthritis in Koreans: population-specific loci as well as overlap with European susceptibility loci. *Arthritis Rheum* 2011; 63:884–93.

Fernández-Mestre M, Sánchez K, Balbás O, Gendzekhzadze K, Ogando V, Cabrera M, Layrisse Z. Influence of CTLA-4 gene polymorphism in autoimmune and infectious diseases. *Human Immunology* 2009; 70: 532–535

Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423:356–61.

Flinstad H, Gulowsen CE, Vartdal F, Spurkland A. CTLA4 promoter and exon 1 dimorphisms in multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 1999; 53:106.

Garavito G, Yunis E, Egea E, Ramírez L, Malagón C, Iglesias A, De La Cruz O, Uribe O, Navarro E, Martínez P, and Jaraquemada D. HLA-DRB1 Alleles and HLA-DRB1 Shared Epitopes Are Markers for Juvenile Rheumatoid Arthritis Subgroups in Colombian Mestizos. *Human Immunology* 2004; 65: 359–365.

Gómez LM, Anaya JM, Gonzalez CI, Pineda-Tamayo R, Otero W, Arango A, Martín J. PTPN22 C1858T polymorphism in Colombian patients with autoimmune diseases. *Genes Immun* 2005;6:628-31.

González-Escribano MF, Rodríguez R, Valenzuela A, García A, García-Lozano JR, Nuñez-Roldan A. CTLA4 polymorphisms in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1999; 53:296-300.

Harper K, Balzano C, Rouvier E, Mattei MG, Luciani MF, Golstein P. CTLA4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol* 1991; 147:1037.

Heggarty S, Suppiah V, Silversides J, O'Doherty C, Droogan A, McDonnell G, Hawkins S, Graham C, Vandenbroeck K. CTLA4 gene polymorphisms and multiple sclerosis in Northern Ireland. *Journal of Neuroimmunology* 2007; 187:187–191.

Hudson L, Rocca K, Song YW, Pandey JP. CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a highly significant association with a determinant in the promoter region. *Hum Genet* 2002;111:452-5.

Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios Epidemiológicos. *Gac Sanit.* 2005; 19:333-41

Iwamoto T, Ikari K, Nakamura T, Kuwahara M, Toyama Y, Tomatsu T, Momohara S and Kamatani N. Association between *PADI4* and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Rheumatology* 2006; 45: 804-807.

Johnson G, Esposito L, Barratt B, Smith A, Heward J, Di Genova G, et al. Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet* 2001;29:233–7.

Kang CP, Lee HS, Ju H, Cho H, Kang C, Bae SC. A functional haplotype of the *PADI4* gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans. *Arthritis Rheum* 2006; 54:90-96.

Karouzakis E, Gay R, Gay S and Neidhart Michel. Epigenetic deregulation in rheumatoid arthritis. *Epigenetic Contributions in Autoimmune Disease*. Landes Bioscience and Springer Science + Business Media. 2011. Chapter 10.

Khoury SJ, Sayegh MH. The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity. *Immunity* 2004; 2:529–38.

Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, Fisfalen ME, Alegre ML, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol* 2000; 165:6606.

Lei C, Dongqing Z, Yeqing S, Oaks MK, Lishan C, Jianzhong J, Jie Q, Fang D, Ningli L, Xinghai H, Daming R. Association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis in Chinese Han population. *Eur J Hum Genet.* 2005;13Q:823-8.

Lee YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. No association of polymorphisms of the CTLA-4 exon 1(+49) and promoter (-318) genes with rheumatoid arthritis in the Korean population. *Scand J Rheumatol* 2002; 31:266-70.

Ling V, Wu P, Finnerty H, Sharpe A, Gray G, Collins M. Complete sequence determination of the mouse and human CTLA4 gene loci: cross-species DNA sequence similarity beyond exon borders. *Genomics* 1999; 60: 341– 355.

Mac Gregor AJ, Snieder H, Rigby AS, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000; 43:30–7.

Majorczyk E, Pawlik A, Kuśnierczyk P. PTPN22 1858C>T polymorphism is strongly associated with rheumatoid arthritis but not with a response to methotrexate therapy. *Int Immunopharmacol.* 2010; 10(12):1626-9.

Matsushita M, Tsuchiya N, Shiota M, Komata T, Matsuta K, Zama K, Oka T, Juji T, Yamane A, Tokunaga K. Lack of a strong association of the CTLA-4 exon 1 polymorphism with the susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Japanese: an association study using a novel variation screening method. *Tissue Antigens* 1999; 54:578.

Orozco G, Torres B, Núñez-Roldán A, González-Escribano M.F, Martín J. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4-CT60 polymorphism in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 2004; 64: 667–670.

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

Perricone C, Ceccarelli F, Valesini G. An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: A never-ending story. *Autoimmunity Reviews* 2011; 10: 599–608

Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, et al. TRAF1-C5 as risk locus for rheumatoid arthritis- A genomewide study. *N Engl J Med* 2007; 357: 1199-209

Prete M, Racanelli V, Digiglio L, Vacca A, Dammacco F, Perosa F. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. *Autoimmunity Reviews* 2011; 11: 123–131.

Ramírez M. Asociación entre manifestaciones clínicas de enfermedades autoinmunes con los polimorfismos de PTPN22, STAT4, CTLA-4 en población colombiana. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia 2009.

Rasmussen H, Kelly M, Francis D, Clausen J. CTLA4 in multiplesclerosis. Lack of genetic association in a European Caucasian population but evidence of interaction with HLA-DR2 among Shanghai Chinese. *Journal of the Neurological Sciences* 2001; 184: 143–147.

Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2007; 357:977–86.

Saito T. Negative regulation of T cell activation. *Curr Opin Immunol* 1998;10:313–21.

Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43:155–63.

Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidyl arginina deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2003; 34:395–402.

Suzuki A, Yamada R AND Yamamoto K. Citrullination by Peptidylarginine Deiminase in Rheumatoid Arthritis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; 1108: 323–339.

Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, et al. Association of the T cell regulatory gene CTLA-4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003; 423: 506– 511.

Wilcox MA, Li Z, Tapper W. Genetic association with rheumatoid arthritis—Genetic Analysis Workshop 15: summary of contributions from Group 2. *Genetic Epidemiol* 2007; 31:S12–21.

Worthington J. Investigating the genetic basis of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity* 2005; 25: 16-20

Zhou Z, Menard HA. Autoantigenic posttranslational modifications of proteins: does it apply to rheumatoid arthritis? *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14:250–3.