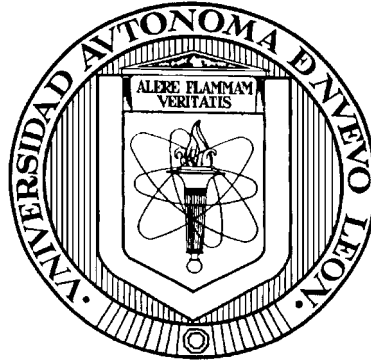


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS

DE POSGRADO



**POLIMORFISMOS DEL GEN MBL2 EN MESTIZOS MEXICANOS CON
LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO**

PRESENTADO

POR

M.C.P. MIGUEL ANGEL VILLARREAL ALARCON

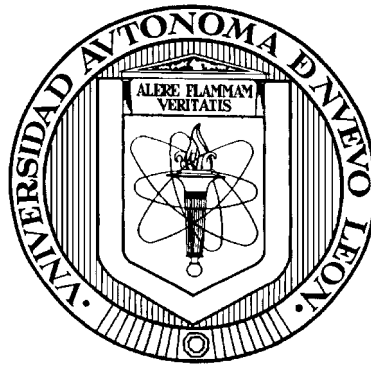
Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTORADO EN MEDICINA

Marzo de 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**FACULTAD DE MEDICINA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO**



**POLIMORFISMOS DEL GEN MBL2 EN MESTIZOS MEXICANOS CON
LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO**

PRESENTADO

POR

M.C.P. MIGUEL ANGEL VILLARREAL ALARCON

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTORADO EN MEDICINA

Marzo de 2008

**Aprobación de la Tesis: POLIMORFISMOS DEL GEN MBL2 EN
MESTIZOS MEXICANOS CON LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO**

DRA. ROCIO ORTIZ LOPEZ
Director de Tesis

DR. AUGUSTO ROJAS MARTINEZ
Co-Director de Tesis

DR. MARIO ALBERTO GARZA ELIZONDO
Co-Director de Tesis

DR. MED. JOSE CARLOS JAIME PEREZ
Miembro de la Comisión de Tesis

DRA. HERMINIA GUADALUPE MARTINEZ RODRIGUEZ
Miembro de la Comisión de Tesis

DR. DIONICIO ANGEL GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A Dios por prestarme vida y salud para realizar este trabajo.

A la Dra. Rocío Ortiz López, por haber aceptado ser la Directora de esta tesis, por haberme aceptado para recibir su asesoría aunque yo no pertenezca a la Unidad de Medicina Molecular, por sus valiosas sugerencias y haber facilitado la colaboración entre Bioquímica y Reumatología así como por su paciencia durante el lapso que requirió su realización.

Al Dr. Augusto Rojas Martínez, por el interés aplicado a las revisiones reiteradas de fondo de este trabajo a través de su desarrollo, aportando valiosas orientaciones estratégicas, siempre cuidadoso en los detalles y por su voluntad para explicar y volver sencillo lo complejo y el discernimiento para separar lo esencial de lo superfluo.

Al Dr. Mario Alberto Garza Elizondo, Jefe de Reumatología, por su apoyo y confianza que me ha brindado desde hace muchos años y que en forma entusiasta aceptó contribuir como codirector, y quien además facilitó que parte del tiempo dedicado al Servicio de Reumatología, tanto mío como de mis demás compañeros se utilizara para sacar adelante nuestros proyectos de doctorado.

Al Dr. José Carlos Jaime Pérez, por las revisiones de los seminarios de tesis y por el valioso estímulo para la continuación de este trabajo, por el seguimiento a mi y a mis compañeros del Programa de Doctorado en Medicina.

A la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez, Secretaria Académica del Área Básica y Jefa del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular por permitir generosamente el uso de las instalaciones y recursos del Departamento de Bioquímica para la realización de este trabajo, así como por su participación activa en los seminarios de preparación dentro de la comisión de tesis doctoral.

A Elsa Nancy Garza Treviño, quien desinteresadamente colaboró en la realización de las genotipificaciones de los pacientes y que tuvo la paciencia de explicar los detalles de la diferenciación de los polimorfismos.

A Carlos Octavio Cancela Murrieta por su colaboración en la continuación de las genotipificaciones así como de las cuantificaciones de MBL y por su disposición a enseñarme los pasos del procesamiento adecuado de las muestras y su contribución a la clasificación una vez terminadas.

Al Dr. Fernando Góngora Rivera, por sus sugerencias en el abordaje estadístico y sus claras y precisas aportaciones en el análisis estadístico de los datos obtenidos contribuyendo así a incrementar el valor aportado por este trabajo.

A la Dra. Iris Jazmín Colunga Pedraza, quien contribuyó en forma entusiasta y persistente, en forma significativa a la consecución de la obtención de una gran parte de los individuos controles sanos.

A la Dra. Jessica Suárez Garza, por su buena disposición y laboriosidad, atención para cuidar los detalles, sus sugerencias, iniciativa

acompañada de conocimientos y sentido común para llevar a cabo aportaciones significativas de forma y de fondo sin las que no hubiera sido posible edición final de esta tesis.

A la Dra. Jacqueline Rodríguez Amado, por su apoyo en la continuidad de este estudio.

A los pacientes, voluntarios sanos, maestros de reumatología que contribuyeron a este estudio, residentes de reumatología, personal administrativo y de enfermería de la consulta 12, personal administrativo de Bioquímica. Pido disculpas si en estas líneas dejo de mencionar a alguien. A todos ellos gracias.

DEDICATORIA

A Gloria Margarita, por su apoyo afectivo incondicional, su paciencia, por darme ejemplo de constancia y por permitir que hubiera descuidado tiempo de la familia, que me da una razón para seguir adelante, sin todo lo cual no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

A Miguel Ángel, por ser él mismo, por permitir que en ocasiones no estuviera acompañándolo por estar escribiendo, y por darme un motivo para seguir adelante.

A mis padres Delia y Miguel, que en vida me enseñaron con su ejemplo cotidiano la laboriosidad, y que no importa tanto hacer lo que uno quiera, sino querer lo que uno hace.

A la memoria del Maestro Dr. Donato Alarcón-Segovia.

INDICE DE ABREVIATURAS

<u>ABREVIATURA</u>	<u>SIGNIFICADO</u>
ACR	American College of Rheumatology
C1q	Factor del Complemento 1 q
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
LEG	Lupus Eritematoso Generalizado
MASP	MBL Associated Serine Protease
MBL	Lecitina Fijadora de Manosa
MEX-SLEDAI	Mexican Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
RR	Riesgo Relativo

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia.....	6
1.2 Originalidad.....	7
1.3 Justificación.....	7
2. HIPÓTESIS	8
3. OBJETIVOS	9
3.1 Objetivo General.....	9
3.2 Objetivo Específico.....	9
4. MATERIAL Y MÉTODOS	10
4.1: Recursos humanos.....	10
4.2: Pacientes y controles.....	10
4.2.1 Criterios de inclusión para pacientes con LEG.....	11
4.2.2 Criterios de exclusión para pacientes con LEG.....	13
4.2.3 Criterios de inclusión para controles normales.....	13
4.2.4 Criterios de exclusión para controles normales.....	13
4.2.5 Consentimiento informado.....	14
4.3 Recursos biológicos.....	14
4.4 Recursos materiales.....	19
4.4. 1 Recursos financieros.....	20
4.5 Recursos Metodológicos.....	20
4.5.1 Diseño experimental y análisis de datos.....	20

4.5.2 Tipo de investigación.....	20
4.5.3 Análisis estadístico.....	21
5. RESULTADOS.....	22
6. DISCUSIÓN.....	27
7. CONCLUSIONES	30
8. BIBLIOGRAFÍA.....	31
9. APÉNDICES.....	35
Apéndice A.- Mex-SLEDAI.....	35
Apéndice B.- Consentimiento informado para pacientes.....	37
Apéndice C.- Consentimiento informado para controles.....	40
Apéndice D.- Hoja de captura para MBL2 en México.....	43
Apéndice E.- Forma para toma de muestra.....	44

INDICE DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
Tabla 1. Criterios Diagnósticos de Lupus Eritematoso Sistémico.....	12
Tabla 2. Características demográficas.....	22
Tabla 3. Genotipos del codón 52, 54, 57 (región estructural) y de la región promotora.....	24
Tabla 4. Número de Infecciones en el último año en pacientes con LEG.....	26
Tabla 5. Comparación de haplotipos en poblaciones normales.....	28
Tabla 6. Comparación de haplotipos en poblaciones de pacientes con lupus.....	28

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Vía de la lectina fijadora de manosa.....	2
Figura 2. Enzimas utilizadas para la determinación de los alelos del segmento estructural.	15
Figura 3. Sondas utilizadas en la genotipificación PCR-RFLP.....	16
Figura 4. Enzimas utilizadas para la identificación de los alelos del segmento promotor.....	17
Figura 5. Electroforesis en gel de las digestiones de la región estructural.....	18
Figura 6. Electroforesis en gel de las digestiones de la región estructural.....	19

RESUMEN

Miguel Ángel Villarreal Alarcón
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio: POLIMORFISMOS DEL GEN MBL2 EN MESTIZOS MEXICANOS CON LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO

Número de páginas: 44

Candidato para el grado de: Doctor en Medicina con Especialidad en Reumatología

Área de Estudio: Ciencias de la Salud

Propósito y Método del Estudio:

Objetivo: Determinar las posibles asociaciones entre haplotipos del locus MBL2 y lupus eritematoso generalizado (LEG)

Material y métodos: Estudio observacional de tipo transversal y retrospectivo. Se incluyeron 149 sujetos, 74 con LEG y 75 controles. Se tipificaron los alelos y genotipos MBL2 y se hizo una correlación entre alelos y genotipos con el cuadro clínico (principalmente con la actividad de la enfermedad e infecciones) en el grupo de pacientes con LEG que fueron atendidos en la consulta de Reumatología del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León (HU-UANL). Además, para poder compararlo con la frecuencia normal en este grupo de población, dado que no se conocía, se tipificaron los alelos y genotipos MBL2 en una serie de personas sanas.

Resultados: No se encontró asociación significativa entre los polimorfismos del MBL2 con respecto al Mex-SLEDAI. No hubo asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos del MBL2 con la presencia de infecciones. Los polimorfismos homocigoto (C/C) y heterocigoto (A/C) en el codón 57 de la región estructural se encontraron en 7% de los pacientes y 15% de los controles ($p < 0.001$). El polimorfismo LX/LX se detectó en 21 pacientes con LEG (28%) y solo 1 sujeto del grupo control (1.3%), lo cual es estadísticamente significativo. ($p < 0.001$).

Contribuciones y Conclusiones Los siguientes hallazgos representan una probable fuente de riesgo de susceptibilidad para LEG: Homocigoto en el codón 57 (C/C) y el haplotipo del promotor LXLX, razón de momios 28.8, I. C. 95% 3.8-220. La ausencia del genotipo A/C pudiera estar asociado a un riesgo por un efecto putativo protector en el desarrollo de lupus. Los resultados sugieren la necesidad de realizar más estudios con el fin de corroborar la utilidad de los polimorfismos del gen MBL2, en individuos sanos para determinar el riesgo de desarrollo de LEG en forma prospectiva.

FIRMA DEL ASESOR: _____

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La lectina fijadora de manosa (MBL) es una proteína sérica dependiente de calcio que es secretada por el hígado como una proteína de fase aguda de la inflamación, cuyo gen se encuentra en el brazo largo del cromosoma 10.¹⁻³ La proteína es una molécula multimérica de hasta seis subunidades funcionales, cada una formada por tres cadenas polipeptídicas y tiene una estructura análoga a la proteína C1q. La MBL juega un papel importante en el sistema de defensa de la inmunidad innata, opsonizando microorganismos ricos en manosa y N-acetilglucosamina y activando macrófagos a través del receptor de C1q⁴. La MBL activa la tercera vía del sistema del complemento y a la vía de la lectina, a través de dos proteasas de serina asociadas (MASP1 y MASP2)⁵. (Ver figura 1)

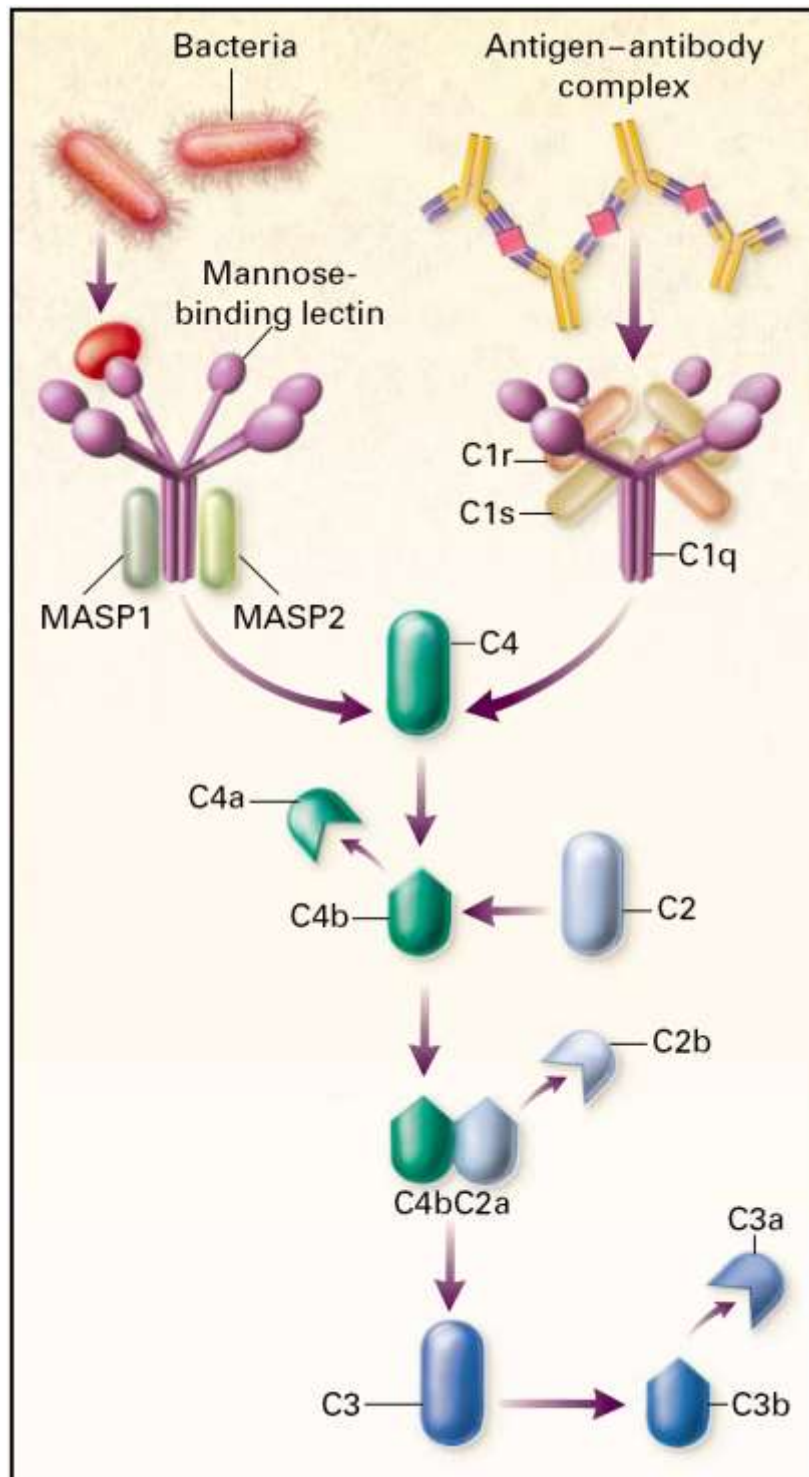


Figura 1. Vía de la lectina de activación del complemento. Su activación es mediada por MBL, que reconoce patrones de carbohidratos microbianos. La MBL se asocia con proteasas de serina asociadas a MBL 1 y 2 (MASP 1 y 2). Su activación escinde C2 y C4, luego C4b y C2b forman una C3 convertasa que inicia la cascada del complemento al escindir C3.⁶

Las concentraciones deficientes y bajas de MBL en el suero se deben principalmente a la presencia de tres mutaciones puntuales en la región estructural (codificante) del gen MBL2 en los codones 54, 57 y 52, que afectan la producción de la proteína, los cuales se denominan de manera general como alelos O (en contraste al alelo normal A) y cuyas denominaciones particulares son B, C y D. Adicionalmente se han reportado tres mutaciones localizadas en la porción 5' no traducida del mismo gen (región promotora) que tienen un efecto cuantitativo sobre la producción y la concentración sérica de la proteína⁷.⁸. Estas mutaciones se ubican en las posiciones -550 y -221 y constituyen los sistemas polimórficos H/L y X/Y respectivamente. Como consecuencia de fenómenos de desequilibrio de ligamiento, en las comunidades humanas se han observado seis sistemas de haplotipos constituidos por los alelos de las regiones promotora y estructural del gen MBL2: HYA, LYA, LXA, HYD, LYC y LYB; estos haplotipos se combinan en genotipos diferentes. El haplotipo HYA está asociado con altos niveles de MBL, mientras que el haplotipo LYA se asocia con niveles moderados y el haplotipo LXA se asocia a una producción baja de MBL. (Figura 1)

Las frecuencias alélicas y genotípicas se han definido en diferentes grupos de población⁹, así, se ha observado la distribución para estos haplotipos en África (Kenya y Mozambique) es de LYA 50%, LYC 24%, LXA 18% y HYA 7%, para Europa (Dinamarca) de HYA 30%, LXA 24%, LYA 21%, LYB 12% y HYD 7%, para Asia (Japón) HYA 44%, LYB 32%, LXA 11%, LYA 7%, para Australia HYA 75%, y LYA 21%, para Groenlandia HYA 81% y LYB 12%, y para Sudamérica

(Argentina) HYA 48% y LYB 43%¹. Hay estudios que sugieren que la deficiencia de MBL está asociada con un alto riesgo de infección tanto en niños como en adultos¹⁰, y existe una controversia sobre el papel patológico de estos polimorfismos en el LEG y en la artritis reumatoide.

Las infecciones causan del 25 al 50% de la morbilidad en pacientes con LEG, y las infecciones graves son una causa importante de hospitalización. Las bacterias comunes son responsables de la mayoría de las infecciones en pacientes con lupus. Las bacterias más frecuentemente descritas son los bacilos gramnegativos y los cocos grampositivos.

Además, las infecciones son la causa principal de muerte en pacientes con LEG en países en desarrollo. En una cohorte de pacientes chinos seguida de 1992 a 1996, el 66% de las muertes fueron causadas por infecciones.^{11, 12} En series de autopsias realizadas en pacientes con LEG en Brasil, las infecciones fueron responsables del 58% de los fallecimientos; 34% de las muertes fueron atribuidas a actividad del LEG. En países desarrollados, la infección también es una de las causas principales de mortalidad en pacientes con LEG y es considerada la primera o segunda causa más común de mortalidad en varios estudios.^{11, 12} Estas tasas altas de mortalidad por infecciones probablemente son el resultado de un uso más agresivo de corticoesteroides, inmunosupresores y terapia de apoyo, (incluyendo diálisis e internamiento en cuidados intensivos), en el control de la actividad y complicaciones del LEG.

Las infecciones oportunistas están surgiendo como causa importante de

mortalidad. Estas se asocian frecuentemente con el uso incrementado de dosis altas de corticoesteroides e inmunosupresores y frecuentemente son diagnosticadas solo en forma post-mortem.¹²

Los alelos variantes en la porción promotora del gen MBL2 se han asociado con niveles menores de MBL, que juega un papel importante en la fagocitosis de microorganismos y tiene una función similar a C1q. Los pacientes con LEG homocigotos para variantes de alelos MBL también tienen un riesgo significativamente mayor de desarrollar infecciones tales como neumonía por neumococo. Se ha demostrado, por ejemplo que la incidencia anual de infecciones requiriendo hospitalización es cuatro veces mayor en estos pacientes con LEG que en los heterocigotos para los alelos variantes o los homocigotos para el alelo normal^{11, 12}.

Con el fin de examinar el papel propuesto de la deficiencia de MBL en LEG, se investigó un grupo de pacientes con LEG atendidos en la consulta de Reumatología del HU-UANL. Se estudió en ellos la asociación de haplotipos del locus MBL con la actividad de la enfermedad y con la historia pasada de infecciones. Estos pacientes residen predominantemente en los estados de Nuevo León, Coahuila, Tamaulipas, San Luis Potosí, Zacatecas y Veracruz y solo participaron aquellos que firmaron la carta de consentimiento informado aprobada por el Comité de Ética del HU-UANL.

1.2 Importancia

En años recientes se ha hecho evidente que la deficiencia de MBL, debida a polimorfismos en el gen MBL2, se asocia con un mayor riesgo de infección, tanto en niños como en adultos¹³, en inmunodeficiencias primaria y secundaria (HIV)¹⁴, en quimioterapia antineoplásica, y se ha observado además en aterosclerosis y cardiopatía coronaria^{15, 16}, fibrosis quística, enfermedades autoinmunes (LEG^{2, 3, 13, 17, 18}, artritis reumatoide^{2, 19}) y abortos recurrentes²⁰. Además, varios estudios realizados en diferentes grupos étnicos (ingleses, españoles^{4, 17}, griegos, afroamericanos, sudafricanos, argentinos, australianos^{13, 21}, Inuits, y chinos –Hong Kong-) han sugerido un efecto menor de los alelos variantes de MBL2 en la predisposición a LEG. Recientemente, se ha observado que el alelo X en el promotor del gen MBL2 está sobre representado significativamente en pacientes chinos con LEG. Recientemente se encontró que en pacientes con LEG homocigotos para los alelos variantes del MBL2 hay asociación con riesgo incrementado de trombosis arterial²².

El pronóstico del LEG está asociado principalmente con los síntomas relacionados a lupus, esto es, participación de órganos específicos. Sin embargo, un cuerpo substancial de evidencia ha indicado que las infecciones contribuyen considerablemente tanto a la morbilidad como a la mortalidad en esta enfermedad^{2, 11, 17, 22}.

1.3 Originalidad

Las frecuencias alélicas y genotípicas para el locus MBL2 se han definido en diferentes grupos de población y se han asociado a susceptibilidad a LEG y predisposición a infecciones en este tipo de pacientes. La frecuencia de estos haplotipos y su relación con LEG no han sido determinadas en México. En el presente estudio se hizo un estudio de casos (pacientes con LEG) y controles (sujetos con patologías no reumáticas) procedentes predominantemente del noreste del país, en el cual se analizaron los haplotipos en el gen mencionado y se establecieron las asociaciones entre haplotipos y LEG, y haplotipos y predisposición a infecciones en este grupo de pacientes. Estos hallazgos serían indicativos de las relaciones entre genotipo para el locus MBL2 y LEG en nuestro grupo étnico.

1.4 Justificación

Debido a las asociaciones que se han establecido entre LEG y predisposición a infecciones en pacientes con LEG con determinados haplotipos del gen MBL2 en diferentes grupos étnicos, entre los cuales no figura la población mexicana; la principal justificación de este trabajo fue establecer este tipo de relaciones en sujetos con LEG de nuestro grupo étnico.

CAPITULO 2

HIPÓTESIS

H1: En la población de mestizos mexicanos existe una asociación causal entre determinados haplotipos del locus MBL2 y LEG y algunos de estos haplotipos incrementan el riesgo relativo (RR) para LEG.

H2: En la población de mestizos mexicanos existe una asociación causal entre determinados haplotipos del locus MBL2 y la susceptibilidad a infecciones en este grupo de pacientes y algunos de estos haplotipos incrementan el riesgo relativo (RR) para infecciones asociadas a LEG.

H0: No existe asociación significativa entre haplotipos de MBL2 y LEG, y no existe asociación significativa entre haplotipos de MBL2 e infecciones asociadas a LEG.

1. Variable dependiente

- Lupus Eritematoso Sistémico
- MEX-SLEDAI
- Infecciones

2. Variable independiente

- Polimorfismos del gen MBL-2

3. Diseño

Estudio observacional, de tipo transversal y retrospectivo

CAPITULO 3

OBJETIVOS

Objetivo general:

1. Determinar las posibles asociaciones entre haplotipos del locus MBL2 y LEG.

Objetivos específicos:

1. Conocer la prevalencia de haplotipos del locus MBL2 en un grupo de pacientes con LEG provenientes de México.
2. Conocer la prevalencia de haplotipos del locus MBL2 en un grupo de sujetos controles provenientes de México
3. Determinar los equilibrios génicos (ley de Hardy-Weinberg) para los genotipos determinados en ambos grupos de estudio.
4. Establecer la asociación entre determinados haplotipos y número de infecciones en sujetos con LEG.

CAPITULO 4

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Recursos humanos

Los especialistas en reumatología del servicio del Hospital Universitario estuvieron a cargo de examinar a los pacientes y les realizaron el Índice de Actividad de la enfermedad en LEG modificado en México (MEX-SLEDAI, por sus siglas en inglés²³) que se muestra en el apéndice. De los cuestionarios aplicados se recopiló el número de infecciones.

Los especialistas en genética y biología molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL llevaron a cabo la determinación de los haplotipos del gen MBL2 de los pacientes y de los controles.

4.2 Pacientes y controles

La población de pacientes consistió de setenta y cuatro personas que son atendidas en la Consulta Externa de Reumatología del HU-UANL y en la consulta privada de Reumatología que voluntariamente decidieron participar en el estudio y que firmaron la forma de consentimiento informado preparada para

este estudio, la cual se sometió a revisión y aprobación por el Comité de Ética del HU-UANL con el número RE07-009. Todos los pacientes reunieron cuatro o más de los criterios propuestos en 1982 y revisados en 1997 por el American College of Rheumatology (ACR)²⁴ para la clasificación del LEG que se muestran en la tabla 1. Los datos demográficos y clínicos se obtuvieron en forma retrospectiva de los expedientes, y los criterios de la recolección de los datos fueron uniformes para todos los pacientes, tal como se muestra en el apéndice. El grupo control estuvo compuesto de setenta y cinco sujetos clínicamente sanos pareados por sexo, que son personal del hospital, estudiantes de medicina y mujeres sanas en puerperio normal en la sala de Obstetricia; todos ellos aceptaron colaborar voluntariamente en el estudio.

4.2.1 Criterios de inclusión para pacientes con LEG

- ❖ Mayores de 16 años de edad.
- ❖ De cualquier sexo.
- ❖ Con diagnóstico de LEG definido.
- ❖ Que firmaran consentimiento informado y en menores de 18 años que este consentimiento sea firmado por uno de sus padres o tutor.

1. Exantema Malar	Eritema fijo, plano o elevado, sobre las regiones malares, que tiende a respetar los pliegues nasogenianos
2. Exantema Discoide	Parches eritematosos y elevados con descamación y tapones foliculares, puede haber cicatrices atróficas.
3. Fotosensibilidad	Exantema cutáneo después de exposición solar, por antecedente u observado por el médico
4. Ulceras orales	Ulceraciones orales o nasofaríngeas generalmente indoloras, observadas por el médico
5. Artritis	Artritis no erosiva que afecta dos o mas articulaciones
6. Serositis	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pleuritis. Historia convincente de dolor pleural o frote escuchado por un médico o evidencia de derrame pleural o 2. Pericarditis. Documentada por ECG, frote o evidencia de derrame pericardico
7. Alteraciones renales	<ol style="list-style-type: none"> a) Proteinuria mayor de 0.5 gr/día o mayor de 3□ b) Cilindros celulares
8. Alteraciones neurológicas	<ol style="list-style-type: none"> 1. Convulsiones en ausencia de medicamentos o trastornos metabólicos conocidos. 2. Psicosis en ausencia de medicamentos o trastornos metabólicos conocidos.
9. Alteraciones hematológicas	a) Anemia hemolítica; b)Leucopenia menor de 4,000 o c)Trombocitopenia menor de 100,000 en ausencia de medicamentos.
10. Alteraciones inmunológicas	a) Anti-DNA.Anticuerpos contra DNA nativo; b) anti-Sm c) Hallazgo de anticuerpos antifosfolípidos basados en: 1)nivel sérico anormal de anticuerpos anticardiolipina IgG o IgM 2)Prueba positiva para anticoagulante lúpico usando un método estándar 3)Prueba serológica falsamente positiva para sífilis por un mínimo de 6 meses y confirmada por una prueba de inmovilización o de absorción de anticuerpos fluorescentes para Treponema pallidum
11. Anticuerpos Antinucleares	Un título elevado, en cualquier momento de la evolución en ausencia de medicamentos conocidos responsables del síndrome de “Lupus inducido por drogas”
Con cuatro o más de los siguientes criterios de Lupus en forma simultánea o seriada se hace diagnóstico de Lupus.	

4.2.2 Criterios de exclusión para pacientes con LEG

- ❖ Que tengan superposición con otra enfermedad autoinmune del tejido conjuntivo.
- ❖ Que tengan enfermedad indiferenciada del tejido conjuntivo.
- ❖ Que no aceptaran firmar el consentimiento informado.
- ❖ Menores de 16 años de edad.

4.2.3 Criterios de inclusión para controles normales

- ❖ Sujetos clínicamente sanos.
- ❖ Mayores de 16 años.
- ❖ De cualquier sexo.
- ❖ Que firmaran el consentimiento informado.

4.2.4 Criterios de exclusión para controles normales

- ❖ Que no aceptaran firmar el consentimiento informado.

4.2.5 Consentimiento informado

Se explicó a los pacientes y controles en que consiste el estudio y se les solicitó la firma de una carta de consentimiento informado presentada por escrito, la cual se muestra en el apéndice.

4.3 Recursos biológicos

Detección de los haplotipos en el gen MBL2.

La determinación de alelos y haplotipos, se realizó a partir de DNA genómico aislado de 200 µl. de sangre periférica anticoagulada con EDTA. El aislamiento del DNA se realizó mediante extracción con fenol-cloroformo, según el protocolo del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UANL^{25, 26}. Después del aislamiento, las muestras de DNA se almacenaron a -20° C hasta su uso en los ensayos de genotipificación²⁷.

La tipificación de alelos en las regiones promotora y estructural del gen MBL2 se hizo mediante la reacción de cadena de polimerasa (PCR, por las siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction) Técnica que radica en forma tradicional en el corte con endonucleasas de restricción de los productos amplificados por PCR con sondas específicas del polimorfismo y luego se verificó éste con un corte con enzima de restricción (RFLP, por las siglas en inglés Restriction

Fragment Length Polymorphism), las sondas fueron enviadas a sintetizar a Invitrogen (Carlsbad, California).^{25, 26} (Figura 2).

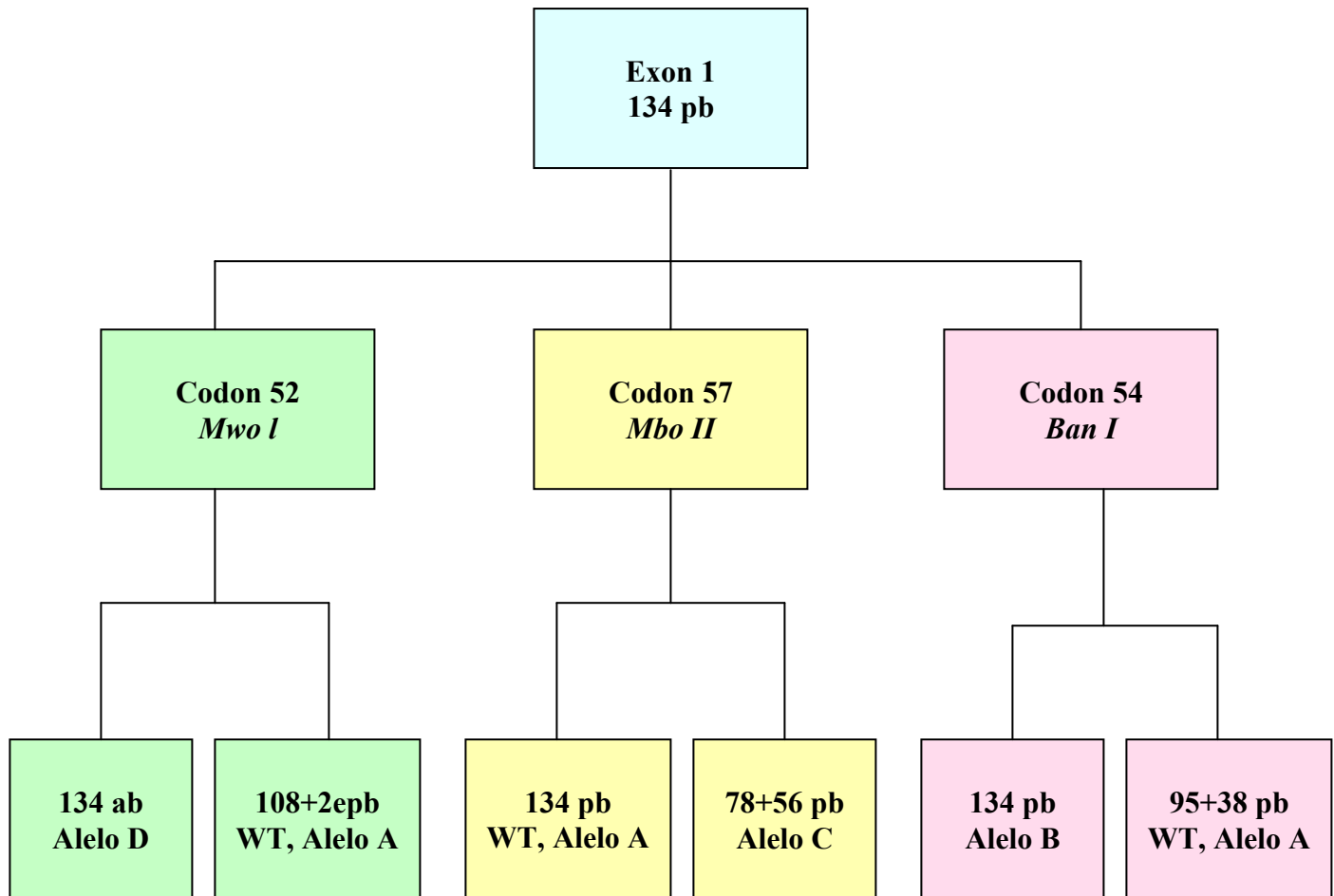


Figura 2. Enzimas utilizadas para la determinación de los alelos del segmento estructural.

Las sondas MBL-E1-FOR y MBL-E1-REV se utilizaron para amplificar los sitios polimórficos en el exón 1, mientras que las sondas MBL-PRO-FOR y MBL-PRO-REV se usaron para los sitios polimórficos en la región promotora del gen.²⁸ (Figura 3)

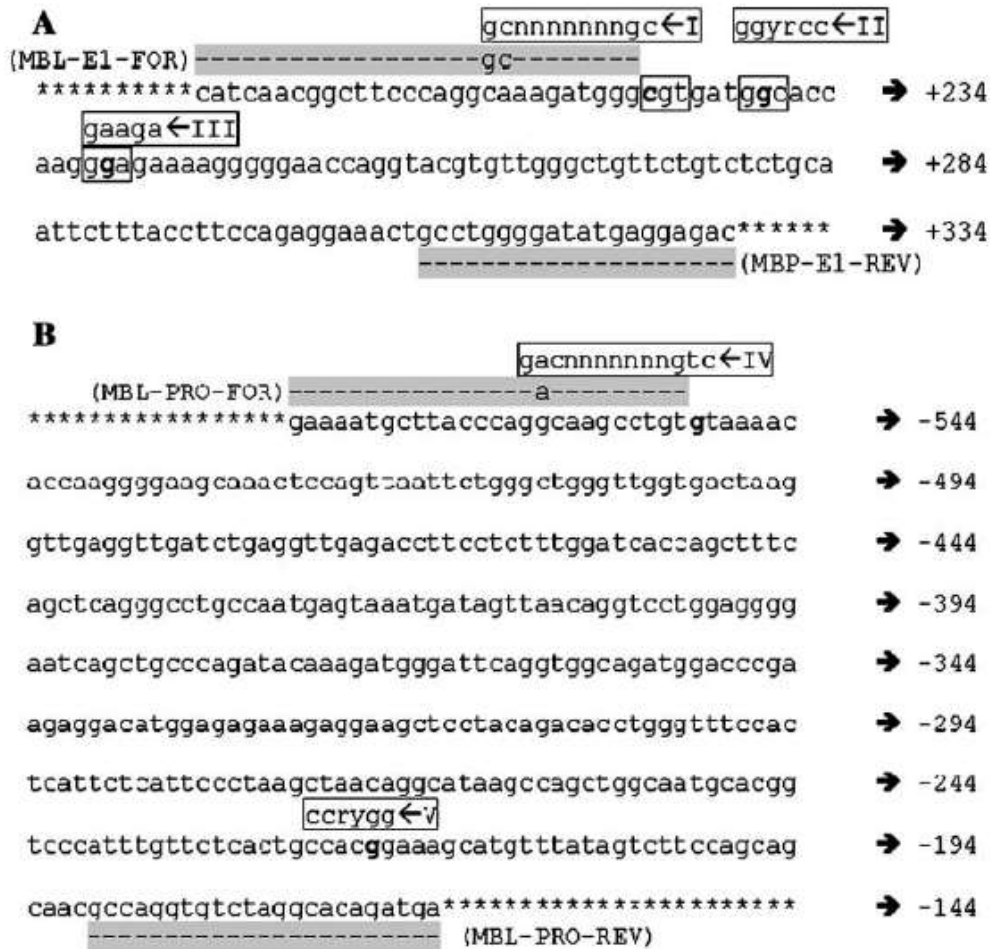


Figura 3. Sondas utilizadas en la genotipificación PCR-RFLP. Las áreas sombreadas son sitios de apareamiento para ambas sondas directas e inversas, r=a ó g; y =c ó t; n=a ó c ó t ó g; A: Exón 1 MBL: *Mwo* I (I) escinde alelos silvestres en el codón 52, *Ban* I (II) escinde alelos silvestres en el alelo en el codón 54 y *Mbo* II (III) escinde el alelo variante en el codón 57. B: Promotor

MBL: *Drd I* (IV) escinde alelo L en -550 y *Btg I* (V) escinde el alelo Y en -221 pb de la región promotora.²⁸

Las vías del proceso de digestión se muestran en la figura 4.

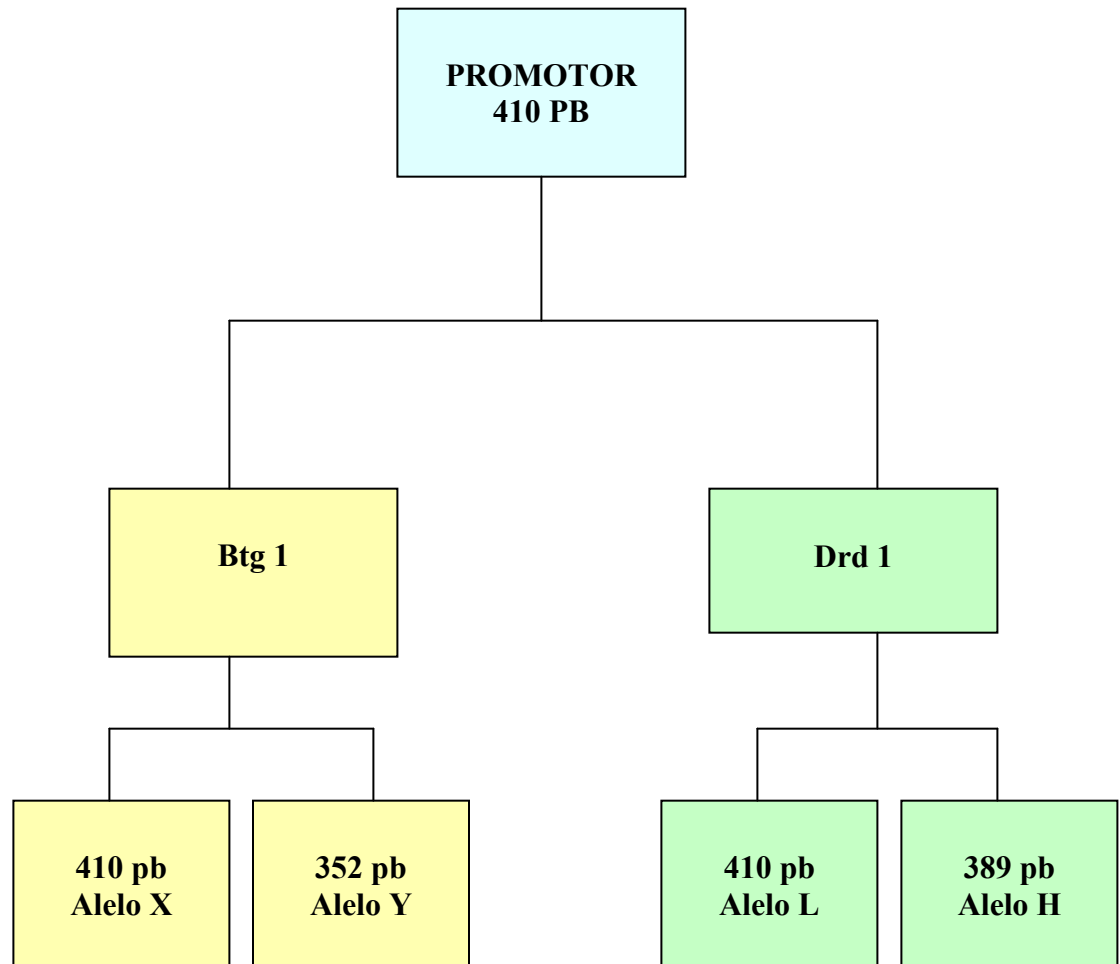


Figura 4. Enzimas utilizadas para la identificación de los alelos del segmento promotor.

Para visualizar los fragmentos digeridos del exón I del promotor se utilizó electroforesis en gel de agarosa al 2% para el estructural y al 3% para el promotor, se marcó con bromuro de etidio y se tomó fotografía con exposición a luz ultravioleta.

Con los resultados obtenidos se definieron los siguientes genotipos: el grupo A/A que consiste de dos alelos silvestres del segmento estructural con alelos de la región promotora de alta expresión (YA/YA), dos alelos silvestres en región estructural con un alelo de región promotora de baja expresión (XA/YA), dos alelos silvestres en región estructural con dos alelos de región promotora de baja expresión (XA/XA); un alelo silvestre y un alelo mutado O para la región estructural (genotipo A/O) combinados ya sea con alelos de región promotora de alta expresión (YA/YO) o con alelos de región promotora de baja expresión (XA/XO); y finalmente el genotipo O/O para alelos defectuosos en la región estructural con cualquier alelo para la región promotora (XO/XO, YO/YO, XO/YO).(Figura 5).

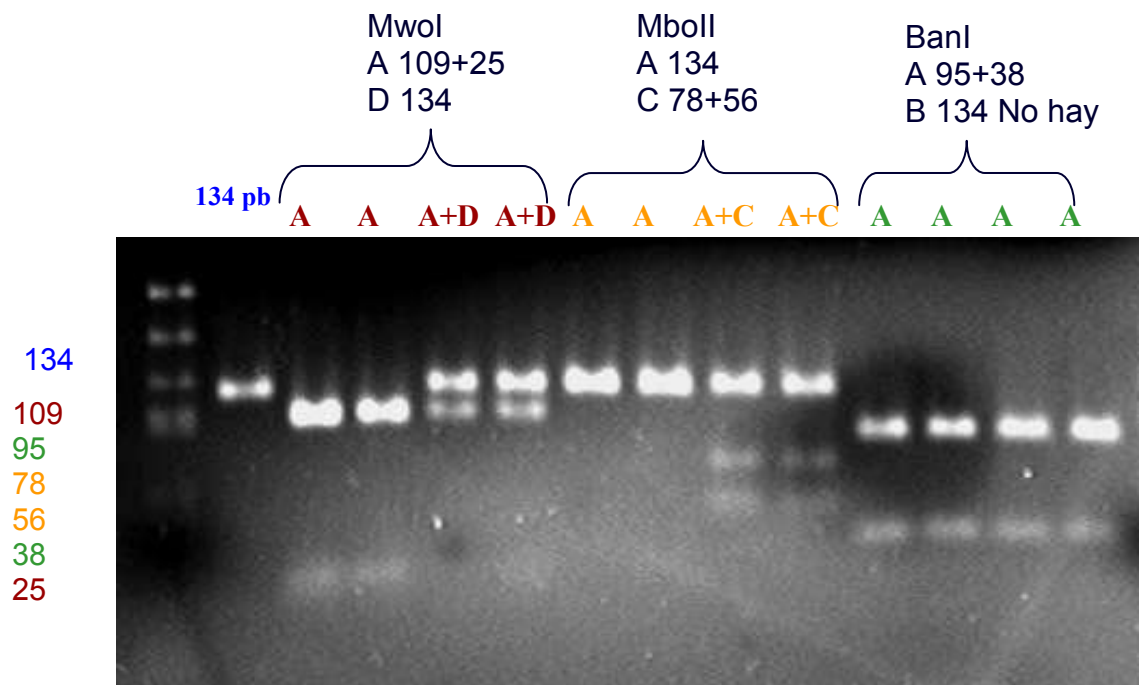


Figura 5. Electroforesis en gel (agarosa) de las digestiones de la región estructural.

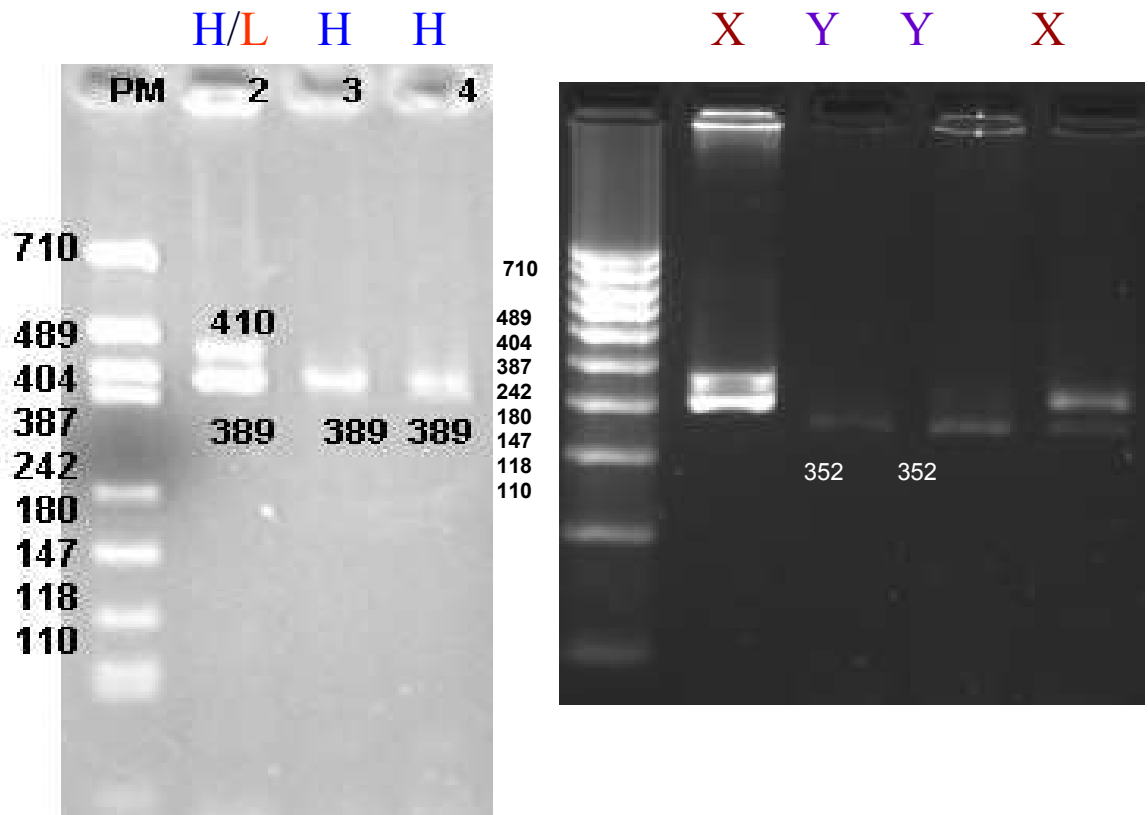


Figura 6. Electroforesis en gel (agarosa) de las digestiones de la región estructural.

4.4 Recursos materiales

Para el examen de los pacientes con LEG se utilizaron las instalaciones de la consulta externa de reumatología así como los consultorios particulares de los reumatólogos que voluntariamente decidieron colaborar con los pacientes bajo su cuidado.

El cuestionario MEX-SLEDAI es el que fue validado por Cardiel y col., en

México en 1992²³ y que se utiliza de rutina en los pacientes con LEG en el servicio. Los expedientes están en el archivo clínico del HU-UANL y en los consultorios particulares de los diferentes reumatólogos.

Los reactivos e instrumentos de laboratorio y gabinete para la elaboración de los haplotipos del gen MBL2 se encuentran en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL. Adicionalmente se utilizó el kit de ELISA para MBL 030 (Antibody Shop, Gentofte, Dinamarca), para la cuantificación de los niveles de lectina fijadora de manosa en suero.

4.4. 1 Recursos financieros

Los costos de los reactivos fueron cubiertos por recursos propios del Servicio de Reumatología y del Departamento de Bioquímica del HU-UANL y se utilizaron para la compra de los reactivos biológicos y los procesos que se realizaron en el departamento de Bioquímica necesarios para los sujetos participantes.

4.5 Recursos Metodológicos

4.5.1 Diseño experimental y análisis de datos.

El diseño es observacional.

4.5.2 Tipo de investigación.

Transversal y retrospectiva.

4.5.3 Análisis estadístico.

El equilibrio de Hardy-Weinberg para las frecuencias genotípicas se probó con análisis de X^2 . El riesgo de lupus asociado con genotipos MBL2 como factor genético y la fuerza de la asociación de los genotipos con la frecuencia de las características clínicas se estimó por cálculo de razón de momios con intervalo de confianza de 95%. Todas las pruebas fueron de dos colas. La significancia estadística fue tomada como un valor de $p < 0.05$.

CAPITULO 5

RESULTADOS

La población consistió en 74 pacientes con LEG y 75 controles sanos. De los pacientes con LEG, 67 fueron del sexo femenino (91%) y 7 del masculino (9%). En el grupo control, 69 fueron mujeres (92%) y 6 hombres (8%).

La mediana de la edad de los pacientes con LEG fue de 33 años, con un rango de 16 a 62 años. En el grupo control, la mediana de la edad fue de 27 años, con un rango de 17 a 77 años ($p= 0.05$).

Las características demográficas de ambos grupos se muestran en la tabla 2.

	Pacientes	Controles	P
Fem/Masc	67/7	69/6	0.53
Edad Mediana y (Rango)	33 (16-62)	27 (17-77)	<0.05

Tabla 2. Características demográficas

Se encontró que los sistemas alélicos analizados para el locus MBL2 estaban en equilibrio de Hardy Weinberg con el grupo control.

En el sistema de alelos de la región estructural A/D para el codón 52, es decir el alelo D, se encontró que el homocigoto A/A se manifestó en 60 pacientes con LEG (81%) y en 60 controles (80%).

El heterocigoto A/D se presentó con una frecuencia de 6 en el grupo de pacientes (8%) y 9 en el grupo control (12%). Además, el homocigoto D/D se identificó en 8 pacientes con LEG (11%) y en 6 controles (8%). Es decir, que el sistema de alelos de la región estructural A/D fue similar en pacientes y controles con respecto al homocigoto A/A, el heterocigoto A/D y el homocigoto D/D.

En los datos anteriores no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. (Tabla 3).

Para el codón 54, es decir el alelo B, se encontró el homocigoto A/A en 57 pacientes con LEG (77%) y 55 controles (73%).

El heterocigoto A/B se manifestó con igual frecuencia, 15 pacientes, tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control (20%).

El homocigoto B/B se detectó en 2 pacientes con LEG (3%) y 5 controles (7%). Por lo tanto, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de los alelos A/A, A/B y B/B ($p < 0.05$). (Tabla 3).

GENOTIPO O ALELO	PACIENTES	CONTROLES	
A/A	60	60	Genotipo del Codon 52 p<0.65
A/D	6	9	
D/D	8	6	
A/A	57	55	Genotipo del Codon 54 p<0.50
A/B	15	15	
B/B	2	5	
A/A	69	62	Genotipo del Codon 57 p<0.001
A/C	0	12	
C/C	5	1	
HYHY	10	9	Alelos de la Porcion promotora p <0.001
LYLY	23	32	
LXLX	21	1	
LXLY	16	10	
HYLY	2	18	
HLYX	2	5	

Tabla 3. Genotipos del codón 52, 54, 57 (región estructural) y de la región promotora.

Para el codón 57, es decir el alelo C, el homocigoto A/A se manifestó en 69 pacientes (93 %) con LEG y en 62 controles (82%).

El heterocigoto A/C no se presentó en el grupo de pacientes con LEG, pero se manifestó en 12 sujetos del grupo control (16%). Además, el homocigoto C/C se identificó en 5 pacientes con LEG (7%) y en 1 sujeto del grupo control (1.3%). Lo anterior da una diferencia estadísticamente significativa, con una $p < 0.001$ (Tabla 3).

En el sistema de alelos de la región promotora H/L, X/Y, se manifestó el polimorfismo HY/HY en 10 pacientes (13%) y 9 controles (12%).

El polimorfismo LY/LY se detectó en 23 pacientes con LEG (31%) y 9 sujetos control (12%).

Por otra parte, el polimorfismo LX/LX se detectó en 21 pacientes con LEG (28%) y solo 1 sujeto del grupo control (1.3%), lo cual es estadísticamente significativo. ($p < 0.001$).

Con respecto al polimorfismo LX/LY, se manifestó en 16 pacientes (21%) y 10 sujetos del grupo control (13%). El polimorfismo HY/LY se detectó en 2 pacientes con LEG (2.7%) y 18 sujetos control (24%). ($p < 0.001$. razón de momios 0.087, I. C. 95% 0.02-0.39).

Por último, el polimorfismo HY/LX se manifestó en 2 pacientes con LEG (3%) y en 5 sujetos del grupo control (7%). (Tabla 3).

Con respecto al índice Mex-SLEDAI no se encontró diferencia intra-caso, estadísticamente significativa entre los pacientes con diferencias entre los polimorfismos de los genes estructurales y de los promotores.

En relación al número de infecciones (Tabla 4), no se encontró diferencia estadísticamente significativa intra-caso entre los pacientes con diferencias en los polimorfismos de los genes estructurales y promotores.

No. de infecciones	No. de Pacientes
0	15
1	24
2	12
3	10
4	8
5	3
6	1
12	1
Total	74 Pacientes

Tabla 4. Número de Infecciones en el último año en pacientes con LEG

CAPITULO 6

DISCUSION

El lupus eritematoso generalizado es una enfermedad de origen multifactorial, influida por la tríada que constituyen la genética, la inmunidad y los factores ambientales; el papel de los factores genéticos continúa estudiándose, sugiriendo alteraciones en genes candidatos para intervenir a este respecto.^{29,}

³⁰ El grado de influencia en las manifestaciones de la enfermedad, así como las complicaciones observadas, cuando las alteraciones de los genes en cuestión influyen simultáneamente en varias funciones, como en la respuesta inmunitaria hacia agentes infecciosos, y en los efectos autoinmunes, al manejarse inadecuadamente la tolerancia hacia lo propio es variable entre las diferentes poblaciones, y entre diferentes familias. Otra característica que tienen las alteraciones del sistema genético en relación al LEG es que también se asocian a otras enfermedades, de manera que el LEG no solo es multifactorial, hablando en sentido amplio, así como en sentido genético, sino que los mismos polimorfismos o mutaciones pueden estar asociados a más de una enfermedad. Cabe mencionar que cuando hay mutaciones o polimorfismos sospechosos, no siempre son reproducibles entre investigadores en diferentes poblaciones dada la diferente penetrancia e interacción con factores ambientales que tienen, además no en todos se pueden reproducir en modelos animales.

En la presente investigación se encontraron diferencias con respecto a estudios realizados en otras poblaciones, tanto para el grupo control (tabla 4) como para

el de pacientes, (tabla 5). La ausencia del genotipo A/C, en el grupo de pacientes, pudiera estar asociado a un riesgo debido a un putativo papel protector de dicho genotipo en el desarrollo de LEG.

Haplotipos	China	Inuits	Caucás	Africa	España	México
En controles						(Este estudio)
HY	0.523	0.833	0.383	0.111	0.391	0.273
LY	0.313	0.138	0.379	0.649	0.424	0.613
LX	0.164	0.029	0.238	0.240	0.185	0.114

Tabla 5. Comparación de haplotipos en poblaciones normales.^{1, 13, 16-18}

Haplotipos en LEG	España	China	México
			(Este estudio)
HY	0.288	0.406	0.162
LY	0.568	0.335	0.433
LX	0.144	0.259	0.405

Tabla 6. Comparación de haplotipos en poblaciones de pacientes con lupus.^{1, 17, 18}

Los resultados en nuestra población muestran semejanza con los resultados encontrados en el grupo de individuos estudiados en China.

A diferencia de otros reportes no se encontró una relación importante entre los distintos polimorfismos estudiados y la frecuencia de infecciones.

En nuestro trabajo se confirmó el hallazgo de otros estudios al respecto de la heterogeneidad de las frecuencias de los haplotipos.

Estos hallazgos sugieren la necesidad de realizar más estudios con el fin de corroborar la utilidad de los polimorfismos del MBL2 en individuos sanos para determinar riesgo de desarrollo de LEG en forma prospectiva. Existe el potencial de realizar otros estudios para correlacionar características clínicas del LEG con los diferentes polimorfismos del MBL2.

CAPITULO 7

CONCLUSIONES

Los polimorfismos del homocigoto C/C se identificaron, en el codón 57 de la región estructural, en el 7% de los pacientes con LEG, y del heterocigoto A/C en 15% de los controles ($p < 0.001$). Lo anterior indica que hay diferencias significativas en los polimorfismos de la región promotora con respecto al riesgo de desarrollar LEG. La ausencia del genotipo A/C pudiera estar asociado a un riesgo por un efecto putativo protector en el desarrollo de lupus.

El polimorfismo LX/LX se encontró en el 28% de los sujetos con lupus y en el 1.33% de los controles ($p < 0.001$) con una razón de momios de 28.8 (I. C. 95% 3.8-220).

El polimorfismo HY/LY se encontró en el 2.7% de los pacientes y en el 24 % de los controles ($p < 0.001$), con una razón de momios 0.087 (I. C. 95% 0.02-0.39).

El estado del homocigoto en el codón 57 (C/C) y el haplotipo del promotor LXLX representan una probable fuente de riesgo de susceptibilidad para LEG con una razón de momios 28.8 (I. C. 95% 3.8-220).

No se encontró asociación significativa entre los polimorfismos del MBL2 con respecto al Mex-SLEDAI.

No hubo asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos del MBL2 con la presencia de infecciones

CAPITULO 8

BIBLIOGRAFIA

1. Casanova JL, Abel L. Human mannose-binding lectin in immunity: Friend, foe, or both? *J Exp Med* 2004 May 17;199(10):1295-9.
2. Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency--revisited. *Mol Immunol* 2003 Sep;40(2-4):73-84.
3. Garred P, Nielsen MA, Kurtzhals JA, Malhotra R, Madsen HO, Goka BQ, Akanmori BD, Sim RB, Hviid L. Mannose-binding lectin is a disease modifier in clinical malaria and may function as opsonin for plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Infect Immun* 2003 Sep;71(9):5245-53.
4. Villarreal J, Crosdale D, Ollier W, Hajeer A, Thomson W, Ordi J, Balada E, Villardell M, Teh LS, Poulton K. Mannose binding lectin and FcγRIIIa (CD32) polymorphism in spanish systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford)* 2001 Sep;40(9):1009-12.
5. Stengaard-Pedersen K, Thiel S, Gadjeva M, Moller-Kristensen M, Sorensen R, Jensen LT, Sjøholm AG, Fugger L, Jensenius JC. Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2. *N Engl J Med* 2003 Aug 7;349(6):554-60.
6. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000 Aug 3;343(5):338-44.
7. Boldt AB, Petzl-Erler ML. A new strategy for mannose-binding lectin gene haplotyping. *Hum Mutat* 2002 Mar;19(3):296-306.
8. Steffensen R, Hoffmann K, Varming K. Rapid genotyping of MBL2 gene mutations using real-time PCR with fluorescent hybridisation probes. *J Immunol Methods* 2003 Jul;278(1-2):191-9.
9. Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Nordestgaard BG. A population-based study of morbidity and mortality in mannose-binding lectin deficiency. *J Exp Med* 2004 May 17;199(10):1391-9.

10. Garred P, Voss A, Madsen HO, Junker P. Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Genes Immun* 2001 Dec;2(8):442-50.
11. Flores-Alvarado D, Esquivel-Valerio J, Galarza-Delgado D, Garza-Elizondo MA. Causas de muerte en lupus eritematoso sistémico. 1998 octubre-diciembre;1 (1):1-6.
12. Juarez M, Mischia R, Alarcon GS. Infections in systemic connective tissue diseases: Systemic lupus erythematosus, scleroderma, and polymyositis/dermatomyositis. *Rheum Dis Clin North Am* 2003 Feb;29(1):163-84.
13. Juliger S, Kremsner PG, Alpers MP, Reeder JC, Kun JF. Restricted polymorphisms of the mannose-binding lectin gene in a population of papua new guinea. *Mutat Res* 2002 Aug 29;505(1-2):87-91.
14. Ying H, Ji X, Hart ML, Gupta K, Saifuddin M, Zariffard MR, Spear GT. Interaction of mannose-binding lectin with HIV type 1 is sufficient for virus opsonization but not neutralization. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004 Mar;20(3):327-35.
15. Rugonfalvi-Kiss S, Endresz V, Madsen HO, Burian K, Duba J, Prohaszka Z, Karadi I, Romics L, Gonczol E, Fust G, Garred P. Association of chlamydia pneumoniae with coronary artery disease and its progression is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin. *Circulation* 2002 Aug 27;106(9):1071-6.
16. Best LG, Davidson M, North KE, MacCluer JW, Zhang Y, Lee ET, Howard BV, DeCruo S, Ferrell RE. Prospective analysis of mannose-binding lectin genotypes and coronary artery disease in american indians: The strong heart study. *Circulation* 2004 Feb 3;109(4):471-5.
17. Garcia-Laorden MI, Rua-Figueroa I, Perez-Aciego P, Rodriguez-Perez JC, Citores MJ, Alamo F, Erausquin C, Rodriguez-Gallego C. Mannose binding lectin polymorphisms as a disease-modulating factor in women with systemic lupus erythematosus from canary islands, spain. *J Rheumatol* 2003 Apr;30(4):740-6.

18. Turner MW. Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. *Immunobiology* 1998 Aug;199(2):327-39.
19. Graudal NA, Garred P, Madsen HO, Svejgaard A, Tarp U, Jurik AG, Graudal HK. Variant mannose-binding lectin genotypes and outcome in early versus late rheumatoid arthritis: Comment on the article by ip et al. *Arthritis Rheum* 2002 Feb;46(2):555-6.
20. Kang I, Park SH. Infectious complications in SLE after immunosuppressive therapies. *Curr Opin Rheumatol* 2003 Sep;15(5):528-34.
21. Minchinton RM, Dean MM, Clark TR, Heatley S, Mullighan CG. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an australian blood donor population. *Scand J Immunol* 2002 Dec;56(6):630-41.
22. Ohlenschlaeger T, Garred P, Madsen HO, Jacobsen S. Mannose-binding lectin variant alleles and the risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2004 Jul 15;351(3):260-7.
23. Guzman J, Cardiel MH, Arce-Salinas A, Sanchez-Guerrero J, Alarcon-Segovia D. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. prospective validation of 3 clinical indices. *J Rheumatol* 1992 Oct;19(10):1551-8.
24. Hochberg MC. Updating the american college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997 Sep;40(9):1725.
25. Martinez de Villarreal LE, Delgado-Enciso I, Valdez-Leal R, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martinez A, Limon-Benavides C, Sanchez-Pena MA, Ancer-Rodriguez J, Barrera-Saldana HA, Villarreal-Perez JZ. Folate levels and N(5),N(10)-methylenetetrahydrofolate reductase genotype (MTHFR) in mothers of offspring with neural tube defects: A case-control study. *Arch Med Res* 2001 Jul-Aug;32(4):277-82.
26. Perales Davila J, Martinez de Villarreal LE, Triana Saldana H, Saldivar Rodriguez D, Barrera Saldana H, Rojas Martinez A, Lopez Valdez R, Garza

Elizondo M, Garcia Cavazos R, Valdez Leal R, Zacarias Villarreal Perez J. Folic acid levels, homocysteine and polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase enzyme (MTHFR) in patients with pre-eclampsia and eclampsia. *Ginecol Obstet Mex* 2001 Jan;69:6-11.

27. Delgado-Enciso I, Martinez-Garza SG, Rojas-Martinez A, Ortiz-Lopez R, Bosques-Padilla F, Calderon-Garciduenas AL, Zarate-Gomez M, Barrera-Saldana HA. 677T mutation of the MTHFR gene in adenomas and colorectal cancer in a population sample from the northeastern Mexico. preliminary results. *Rev Gastroenterol Mex* 2001 Jan-Mar;66(1):32-7.
28. Tin SK, Lee LY, Thumboo J, Koh DR, Fong KY. PCR-RFLP genotyping for exon 1 and promoter region mutations of the human mannose binding lectin (MBL-2) gene. *J Immunol Methods* 2005 Aug;303(1-2):148-51.
29. Prokunina L, Alarcon-Riquelme M. The genetic basis of systemic lupus erythematosus--knowledge of today and thoughts for tomorrow. *Hum Mol Genet* 2004 Apr 1;13 Spec No 1:R143-8.
30. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, de Bakker PI, Le JM, Lee HS, Batliwalla F, Li W, Masters SL, Booty MG, Carulli JP, Padyukov L, Alfredsson L, Klareskog L, Chen WV, Amos CI, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Gregersen PK. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2007 Sep 6;357(10):977-86.

APENDICES

APENDICE A

MEX-SLEDAI

Nombre: _____

El puntaje total del índice clínico Mex-SLEDAI es la suma total de los puntos de cada variable. Se toma en cuenta la variable que está presente en la fecha de la cita o su ocurrencia en los últimos 10 días.

CALIFICACIÓN	DESCRIPTOR	DEFINICION
8 Trastorno Neurológico	Psicosis: Capacidad alterada para funcionar en una actividad cotidiana debido a trastorno grave, en la percepción de la realidad. Incluye: Alucinaciones, incoherencia, pérdida marcada de asociaciones, contenido pobre del pensamiento, pensamiento ilógico notorio, desorganizado. Se debe excluir la presencia de uremia, tóxicos y drogas que puedan inducir psicosis. EVC: Síndrome reciente. Se excluye aterosclerosis Convulsiones: De inicio reciente, excluyendo causas metabólicas, infecciosas o secundarias a drogas. Síndrome orgánico cerebral: Función mental alterada con pérdida en la orientación, memoria o en otra función intelectual de inicio rápido con características clínicas fluctuantes; tales como: Alteración de la consciencia con incapacidad para mantener la atención en el medio ambiente. En adición al menos dos de los siguientes: alteración perceptual, lenguaje incoherente, insomnio o somnolencia diurna, aumento o disminución de la actividad psicomotora. Deben excluirse causas metabólicas, infecciosas y secundarias a drogas. Mononeuritis: Déficit sensorial o motor de inicio reciente en uno o más de los nervios craneales o periféricos. Mielitis: Paraplejía de inicio reciente y/o alteración del control de la vejiga y del intestino, excluyendo otras causas.	
6 Trastorno Renal	Cilindros: granulosos o eritrocitarios Hematuria: > 5 eritrocitos por campo. Excluyendo otras causas Proteinuria de inicio reciente > 0.5 gr/dl en muestra aislada Aumento de creatinina > 5 mg/dl	
4 Vasculitis	Úlceras, gangrena, vasculitis en pulpejo de dedos, infarto periungueal, hemorragias en astillas. Biopsia o angiografía diagnóstica de vasculitis.	
3 Hemólisis Trombopenia	Hb < 12 gr/dl y con reticulocitos corregidos > 3% Menos de 100,000 plaquetas. No debido a drogas u otras causas.	
3 Miositis	Mialgias y debilidad muscular proximales asociadas con elevación de CPK.	
2 Artritis	Más de dos articulaciones dolorosas con inflamación o derrame articular.	
2 Afección Cutánea	Eritema malar, de inicio reciente o aumento en la recurrencia de eritema malar. Úlceras mucosas de inicio reciente o recurrencia de úlceras orales o nasofaringeas. Alopecia: áreas de alopecia difusa o caída fácil del cabello.	

2 Serositis	Pleuritis: Historia contundente de dolor pleurítico, frote pleural o derrame pleural al examen físico. Pericarditis: Historia contundente o frote pericárdico audible. Peritonitis: Dolor abdominal difuso con rebote ligero (excluyendo causas intraabdominales).
1 Fiebre	> de 38° C después de la exclusión de proceso infeccioso
Fatiga	Inexplicable
1 Leucopenia	Leucocitos < de 4000 x mm ³ , no secundario al uso de drogas.
Linfopenia	Linfocitos < de 1200 x mm ³ , no secundario al uso de drogas.

Puntaje total del Índice Mex-SLEDAI: _____

APENDICE B

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO "POLIMORFISMOS DEL GEN MBL2 EN LUPUS EN MEXICO"

Información sobre el estudio

El objetivo de esta investigación es determinar si algunos genes pertenecientes a nuestra información hereditaria influyen en el riesgo de desarrollar lupus eritematoso generalizado así como la de determinar la relación entre estos genes y el curso de la enfermedad.

Procedimiento a seguir:

Usted está siendo invitada(o) a participar de la siguiente forma:

Donando una muestra de sangre de aproximadamente 1 ml, la cual será extraído de una vena de su brazo. A partir de esta muestra se obtendrá ADN (el material genético en donde están los genes). Este material genético será utilizado para realizar esta investigación.

Todo lo que aprendamos de usted durante la investigación será confidencial. La muestra que usted done será manejada con una clave y nunca se revelará su identidad. Si publicamos los resultados del estudio en una revista o libro científico, no lo identificaremos a usted de ninguna manera, ni tampoco se revelara su domicilio, lugar de trabajo, números de teléfono, ni direcciones electrónicas personales. Igualmente, este consentimiento autoriza a los investigadores a realizar futuros estudios en la misma muestra sin necesidad de volver a realizar una nueva venopunción.

No le garantizamos que su participación en el estudio lo beneficie a usted. Ud. no recibirá ninguna compensación por participar en este estudio. Usted no tendrá costos adicionales por su participación en este estudio. Su decisión para tomar parte en este estudio es voluntaria.

Usted tiene libertad de decidir si no quiere participar en este estudio en cualquier momento. Si decide no participar en este estudio, esto no afectará su cuidado médico futuro en esta institución.

Molestias o riesgos posibles:

Existen ciertos riesgos e incomodidades que se pueden presentar en esta investigación. Puede sentir una molestia transitoria en el sitio de la punción, durante la toma de la muestra de sangre, algunas personas también pueden sentir mareo cuando se les extrae la sangre.

Si tiene alguna complicación resultante de los procedimientos que se realicen, tiene derecho a que se le brinde la atención médica requerida. Si usted tiene alguna duda adicional, relacionada con esta investigación, puede dirigirse con el investigador principal, el Dr. Miguel Angel Villarreal Alarcón al Teléfono:83-47-12-93, Ext 231, en Gonzalitos y Madero, consulta externa número 12 del Hospital Universitario. Este estudio está registrado en la Subdirección de Investigación y Estudios de Postgrado y se puede poner en contacto con el Dr. Bosques, Presidente de la Comisión de Etica del Hospital Universitario.

Aceptación de participar

Por medio de la presente confirmo que he sido informado sobre todos los aspectos relacionados con este estudio y he comprendido las explicaciones que se me han dado a través del presente documento al igual que verbalmente para resolver dudas adicionales.

Con base en la información proporcionada declaro que, de manera voluntaria, acepto participar en esta investigación.

Nombre del paciente

Firma del paciente

Nombre del investigador encargado

Firma del investigador encargado

Nombre del Testigo 1

Firma del Testigo 1

Nombre del Testigo 2

Firma del Testigo 2

Fecha (dd/mm/aaaa): ____ / ____ / ____

APENDICE C

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA CONTROLES PARA EL PROYECTO "POLIMORFISMOS DEL GEN MBL2 EN MEXICO"

Información sobre el estudio

El objetivo de esta investigación es determinar la frecuencia de algunos genes pertenecientes a nuestra información hereditaria.

Procedimiento a seguir:

Usted está siendo invitada(o) a participar de la siguiente forma:

Donando una muestra de sangre de aproximadamente 1 ml, la cual será extraído de una vena de su brazo. A partir de esta muestra se obtendrá ADN (el material genético en donde están los genes). Este material genético será utilizado para realizar esta investigación.

Todo lo que aprendamos de usted durante la investigación será confidencial. La muestra que usted done será manejada con una clave y nunca se revelará su identidad. Si publicamos los resultados del estudio en una revista o libro científico, no lo identificaremos a usted de ninguna manera, ni tampoco se revelara su domicilio, lugar de trabajo, números de teléfono, ni direcciones electrónicas personales. Igualmente, este consentimiento autoriza a los investigadores a realizar futuros estudios en la misma muestra sin necesidad de volver a realizar una nueva venopunción.

No le garantizamos que su participación en el estudio lo beneficie a usted. Ud. no recibirá ninguna compensación por participar en este estudio. Usted no tendrá costos adicionales por su participación en este estudio. Su decisión para tomar parte en este estudio es voluntaria. Usted tiene libertad de decidir si no quiere participar en este estudio en cualquier momento. Si decide no participar en este estudio, esto no

afectará su cuidado médico futuro en esta institución.

Molestias o riesgos posibles:

Existen ciertos riesgos e incomodidades que se pueden presentar en esta investigación. Puede sentir una molestia transitoria en el sitio de la punción, durante la toma de la muestra de sangre, algunas personas también pueden sentir mareo cuando se les extrae la sangre.

Si tiene alguna complicación resultante de los procedimientos que se realicen, tiene derecho a que se le brinde la atención médica requerida. Si usted tiene alguna duda adicional, relacionada con esta investigación, puede dirigirse con el investigador principal, el Dr. Miguel Angel Villarreal Alarcón al Teléfono:83-47-12-93, Ext 231, en Gonzalitos y Madero, consulta externa número 12 del Hospital Universitario. Este estudio está registrado en la Subdirección de Investigación y Estudios de Postgrado y se puede poner en contacto con el Dr. Bosques, Presidente de la Comisión de Etica del Hospital Universitario.

Aceptación de participar

Por medio de la presente confirmo que he sido informado sobre todos los aspectos relacionados con este estudio y he comprendido las explicaciones que se me han dado a través del presente documento al igual que verbalmente para resolver dudas adicionales.

Con base en la información proporcionada declaro que, de manera voluntaria, acepto participar en esta investigación.

Nombre del donador

Firma del donador

Nombre del investigador encargado

Firma del investigador encargado

Nombre del Testigo 1

Firma del Testigo 1

Nombre del Testigo 2

Firma del Testigo 2

Fecha (dd/mm/aaaa): ____/____/____

APENDICE D

HOJA DE CAPTURA PARA MBL2 EN MÉXICO

Código MBL-_____ (Lo escribe quien toma la muestra)

Médico a cargo del paciente: _____

Iniciales del paciente _____

Expediente (en caso que se tenga): _____

Fecha de la toma(dd/mm/aa) _____

1.- Lugar de Nacimiento de

Padre _____

Madre _____

Abuelo paterno _____

Abuela paterna _____

Abuelo materno _____

Abuela materna _____

2.- Historia de Infecciones en el último año: Si _____ No _____

Si la respuesta es sí, favor de llenar las que sean pertinentes. Si es no, pasar a observaciones

Urinarias _____

Cistitis _____

Pielonefritis _____

Respiratorias _____

Sinusitis _____

Faringitis _____

Neumonía _____

Digestivas _____

Gastroenteritis _____

Piel _____

Otras Infecciones _____

¿Cuáles? _____

Número de ocasiones: _____

OBSERVACIONES: _____

APÉNDICE E

FORMA PARA TOMA DE MUESTRA

“Polimorfismos del gen MBL2 en lupus eritematoso generalizado en el noreste de México”

Código: (número de paciente): _____

Observaciones: _____

Fecha de la toma: (dd/mm/aaaa) _____ / _____ / _____

Lugar de nacimiento: _____, de sus
padres: _____ y _____

De sus
abuelos: _____, _____, _____, _____

Nombre y Firma del Médico encargado de la toma
