

Tesis Doctoral

## IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS DE PREDISPOSICIÓN A LA ARTERITIS DE CÉLULAS GIGANTES.

Memoria presentada por la Licenciada en Biología M<sup>a</sup> Aurora Serrano Lopera para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Dirigida por: Javier Martín Ibáñez, Profesor de Investigación en el Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” CSIC, Granada y Miguel Ángel González-Gay Mantecón, Jefe de Sección del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (IFIMAV), Santander.



Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra,

IPBLN-CSIC

Granada, Mayo de 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: M<sup>a</sup> Aurora Serrano Lopera  
D.L.: GR 2101-2014  
ISBN: 978-84-9083-129-8

La doctoranda M<sup>a</sup> Aurora Serrano Lopera y los directores de la tesis Javier Martín Ibáñez y Miguel Ángel González-Gay Mantecón garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Así mismo, la doctoranda M<sup>a</sup> Aurora Serrano Lopera y los directores de la tesis Javier Martín Ibáñez y Miguel Ángel González-Gay Mantecón garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que las publicaciones presentadas no se han utilizado en la defensa de ninguna otra tesis en España u otro país y que no serán utilizadas con tal propósito.

Granada, 19 de Mayo de 2014

Director de la Tesis



Fdo.: Javier Martín Ibáñez

Director de la Tesis



Fdo.: Miguel Ángel González-Gay

Doctoranda



Fdo.: M<sup>a</sup> Aurora Serrano Lopera

## ABREVIATURAS

AAV	Vasculitis asociadas a ANCA
ACG	Arteritis de células gigantes
ACR	Colegio Americano de Reumatología (American College of Rheumatology)
ANCA	Anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos
AR	Artritis reumatoide
AT	Arteritis de Takayasu
BCR	Receptor de la célula B
CCL5	Ligando de quimioquina 5 con motivo C-C
CCR	Receptores de quimioquinas
CD	Células dendríticas
CI	Intervalo de confianza
CY	Cola citoplasmática
DT1	Diabetes Tipo 1
EB	Enfermedad o síndrome de Behçet
GW	Granulomatosis de Wegener

GWAS	Estudio de asociación del genoma completo (Genome-Wide association studies)
HLA	Antígeno leucocitario humano (Human Leukocyte antigen)
HSP	Síndrome de Schönlein-Henoch o púrpura
ICAM	Molécula de adhesión intracelular
IFN	Interferon
IFNG	Interferon gamma
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IOD	Enfermedad oclusiva irreversible
IRF	Factor regulador del interferón
Jak	Kinasa Janus
KD	Enfermedad de Kawasaki
LD	Desequilibrio de ligamiento (Linkage disequilibrium)
LES	Lupus eritematoso sistémico
LPS	Lipopolisacáridos
MCP	Proteínas quimio-atrayentes de monocitos

MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (Major Histocompatibility complex)
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B
NK	Células Natural Killer
NOS	Óxido nítrico sintetasa
OR	Odds ratio
PAM	Poliangeítis microscópica
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos (Pathogen-associated molecular patterns)
PCR	Proteína C reactiva
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PMR	Polimialgia reumatica
RANTES	Receptor de la quimioquina 5 motivo C-C (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted)
SCS	Síndrome de Churg- Strauss
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
STAT	Señal transductora y activadora de la transcripción
TCR	Receptor de la célula T

TGF	Factor de crecimiento tisular
Th	Linfocitos T coadyuvantes
TLRs	Receptores tipo toll
TM	Dominio transmembrana
TNFAIP3	Proteína 3 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAF	Factores asociados al receptor de la superfamilia del factor de necrosis tumoral
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VIM	Manifestaciones isquémicas visuales
VSG	Velocidad de sedimentación globular

## INDICE

### 1. RESUMEN

### 2. INTRODUCCIÓN

2.1 Definición y epidemiología de la arteritis de células gigantes.

2.2 Etiología de la ACG

2.3 Aspectos clínicos de la enfermedad

2.4 Fisiopatología y alteraciones de la respuesta inmune en la ACG

2.4.1 Cambios histológicos y mecanismos fisiopatológicos en la ACG.

2.4.2 La respuesta inmune en la ACG

2.5 Genética de la ACG

2.5.1 Asociaciones HLA

2.5.1.1 Asociaciones HLA de Clase II

2.5.1.2 Asociaciones HLA de Clase I

2.5.2 Asociaciones con los genes que codifican citocinas

2.5.3 Asociaciones con moléculas implicadas en la función endotelial

2.5.4. Asociaciones con genes de la respuesta inmunitaria

2.6 Bases genéticas comunes en autoinmunidad

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### 4. ANEXO PUBLICACIONES



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Genes estudiados asociados con ACG

5.1.1. NLRP1

5.1.2. PTPN22

### 5.2. Genes estudiados no asociados con ACG

5.2.1. ITGAM

5.2.2. CD226

5.2.3. TRAF6

5.2.4. CCR6

5.2.5. CSK

### 5.3. Perspectivas

## 6. CONCLUSIONES

## 7. BIBLIOGRAFIA

## 1. RESUMEN

La arteritis de células gigantes (ACG), también conocida como arteritis de la temporal o arteritis de Horton, es una vasculitis granulomatosa que afecta a las arterias de mediano y gran calibre, en particular aquellas derivadas del arco aórtico con preferencia a afección de ramas extracraneales de la carótida externa. La ACG es la vasculitis más frecuente en personas de edad avanzada y la sufren principalmente las mujeres. También es más frecuente en los países occidentales, especialmente en las poblaciones de ascendencia escandinava.

Es una enfermedad poligénica compleja de etiología desconocida y hay evidencias que sugieren que existe un fuerte componente genético para esta vasculitis. Así, numerosos estudios han puesto de manifiesto la asociación de variantes genéticas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de vías inflamatorias e inmunológicas en la susceptibilidad a la ACG. La suma de varios polimorfismos desfavorables para el individuo, puede facilitar la aparición de la enfermedad, cuya manifestación requiere a menudo la presencia de un marco ambiental propicio para desarrollarse.

El descubrimiento de una asociación entre un polimorfismo genético y la progresión de la enfermedad podría ayudar a dilucidar la patogenia de la enfermedad, así como a diseñar nuevas dianas terapéuticas, facilitando el diagnóstico e incluso predecir las características clínicas que presentará cada paciente. Así que, el objetivo principal de esta tesis doctoral fue la identificación de nuevos marcadores genéticos de predisposición a la ACG. Para ello se siguió una estrategia basada en estudios de asociación caso-control y basándonos en la existencia de un sustrato de susceptibilidad compartido por distintas enfermedades autoinmunes se seleccionaron variantes genéticas de riesgo en otras enfermedades autoinmunes. Con este fin, analizamos la influencia de las siguientes variantes genéticas (*ITGAM*, *CD226*, *TRAF6*, *CCR6*, *NLRP1*, *CSK* y *PTPN22*). Los resultados de nuestro estudio sugiere que los siguientes polimorfismos analizados: *ITGAM* (rs1143679), *CD226* (rs727088, rs34794968 y rs763361), *TRAF6* (rs540386), *CCR6* (rs3093024) y *CSK* (rs1378942 y rs34933034) no juegan un papel importante en la patología de la ACG. Este trabajo también permitió detectar variantes genéticas que confieren predisposición a la ACG. Así pues, hemos identificado *NLRP1* como un nuevo gen de susceptibilidad a ACG, por tanto, se añade una pieza más al rompecabezas genético que subyace en la patogénesis de esta compleja enfermedad.

Tras nuestro estudio, también podemos concluir que el polimorfismo rs2476601/R620W del gen *PTPN22* confiere susceptibilidad a padecer ACG y aunque los mecanismos que subyacen a la función de dicha variante génica no son aun claros, esta asociación sugiere que debe de existir una desregulación de la señalización del TCR que participa en los mecanismos fisiopatológicos de esta vasculitis.

Concluyendo, los avances llevados a cabo mediante la realización del presente trabajo permiten ampliar el conocimiento de la base genética de la ACG y sugieren rutas o procesos inmunológicos que pudieran estar alterados en esta vasculitis o en subfenotipos específicos, proporcionando información relevante tanto para posteriores estudios genéticos como para posteriores estudios funcionales. No obstante, en un futuro consideramos que deberían realizarse estudios de asociación de genoma completo o GWASs, los cuales están basados en la detección y análisis de marcadores genéticos a lo largo de todo el genoma con un número muy amplio de participantes y que aportarían datos muy valiosos para ayudar a comprender y tratar la patología de esta enfermedad.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Definición y epidemiología de la arteritis de células gigantes.

La arteritis de células gigantes (ACG), se define como una vasculitis sistémica autoinmune cuya característica principal es la inflamación de los vasos sanguíneos, manifestándose predominantemente en las medianas y grandes arterias extracraneales así como sus correspondientes ramas, en especial las arterias temporales que se hallan sobre las sienes, por lo que la ACG también recibe el nombre de "arteritis temporal" [1, 2] . Se caracteriza por la formación de granulomas y por la inflamación y lesión de los vasos sanguíneos, y puede resultar en accidente cerebrovascular y ceguera [3]. Histológicamente, se puede observar una disrupción de la lámina elástica interna con infiltración de la pared arterial por células mononucleares con o sin formación de células gigantes [4].

La arteritis de células gigantes (ACG) fue descrita en 1890 por Jonathan Hutchinson como una forma peculiar de "arteritis trombosante del anciano, con ocasional producción de gangrena". Horton en 1932 describió la histopatología típica de la enfermedad y posteriormente otros aspectos de sus manifestaciones clínicas y posibilidades terapéuticas, de ahí que a la enfermedad también se la conozca con el nombre de arteritis de Horton [5, 6].

Las vasculitis de grandes vasos incluyen dos síndromes, la arteritis de Takayasu (AT) y la ACG, que es la forma más común de vasculitis sistémica primaria caracterizadas por un cuadro inflamatorio granulomatoso con frecuente presencia de células gigantes, que si bien son claramente diferenciables entre sí, comparten algunos hallazgos histopatológicos y manifestaciones clínicas [7].

Numerosos estudios han relacionado a la ACG con otros cuadros reumatológicos, sobre todo la polimialgia reumática (PMR), aunque las dos afecciones pueden producirse al mismo tiempo o por separado, de hecho, entre un 5 % y un 15 % de los pacientes con PMR aislada, más tarde tendrán un diagnóstico de ACG. Además, alrededor del 50 % de los pacientes que padecen ACG tiene síntomas de PMR [1, 8-10].

En cuanto a su epidemiología, esta enfermedad afecta principalmente a personas de raza caucásica, mostrando un gradiente norte-sur marcado, es decir, una mayor frecuencia en el norte con respecto al sur, llegándose a alcanzar en las poblaciones de ascendencia escandinava la incidencia más alta. Además, ACG afecta predominantemente a mujeres, con una proporción de sexos en torno a 2-3:1. La incidencia de vasculitis en la población general es pequeña, estimándose en 17-18 casos por 100.000 habitantes. Se encuentran pocos pacientes en edades inferiores a los 50 años, mientras que a partir de dicha edad, la incidencia va aumentando, de manera que, la media de edad en el momento de la aparición de la enfermedad, se sitúa alrededor de los 70 años. En las últimas décadas, la incidencia en personas de 70 o más años ha aumentado de forma progresiva lo que se atribuye al progresivo envejecimiento de la población en países occidentales y a un mayor conocimiento y diagnóstico de la enfermedad. Además, una serie de factores tales como los factores de riesgo cardiovascular y el tabaquismo parecen incrementar el riesgo de desarrollar ACG [2, 11, 12].

## 2.2 Etiología de la ACG.

Aunque la causa de esta patología se desconoce, se sabe que se trata de un desorden multifactorial que se desencadena en individuos genéticamente predispuestos tras la exposición a determinados factores ambientales. En este sentido, la ACG, al igual que otras enfermedades autoinmunes, es una enfermedad poligénica y varios genes se han asociados con susceptibilidad a esta patología. El papel aditivo de estos genes junto con las interacciones de determinados factores ambientales puede influir en la susceptibilidad así como en la severidad de la enfermedad.

El hecho de que haya una mayor prevalencia de la enfermedad en individuos de origen caucásico norte-europeo y la existencia de casos con agregación familiar [13] ha hecho pensar en algún factor genético para explicar la etiología de la enfermedad [14]. Hay otras evidencias que indican que los factores genéticos son de gran importancia; como un incremento en la prevalencia de los antígenos HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5 y HLA-DRB1 [15-21] en pacientes con ACG, que dan soporte a ésta idea sugiriendo que la patogénesis de las vasculitis sistémicas, como es el caso de la ACG, puede estar determinada por múltiples genes en conjunto con factores medioambientales.

Hay otros estudios que han corroborado la existencia de una asociación entre la ACG y genes que están implicados en las vías regulando la respuesta inmune e inflamatoria. En este sentido, se ha descrito asociación de polimorfismos en genes como es el caso de *TNFA*, *IFNG*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10*, *ICAM-1*, *VEGF*, *eNOS*, *NLRP1* y *PTPN22* entre otros, en la susceptibilidad y/o con diferentes manifestaciones clínicas de la ACG, proporcionando así más evidencias de que la etiología de la ACG está genéticamente determinada [22-26].

Debido a las fluctuaciones estacionales, la variación geográfica, los patrones cíclicos y que la incidencia sea más alta en las grandes aglomeraciones urbanas, se ha sugerido a los factores ambientales como posibles desencadenantes de esta vasculitis [1, 27] [28]. Y puesto que, la ACG se presenta con síntomas de tipo sistémicos, tales como fiebre y malestar general, la etiología infecciosa ha sido sugerida en reiteradas ocasiones.

Inicialmente Horton y col intentaron, infructuosamente, aislar un microorganismo responsable de la enfermedad a través del cultivo e inoculación en animales de material derivado de arterias con

la enfermedad. Desde entonces, han sido descritos como posibles causantes de la enfermedad varios microorganismos, desde agentes virales a microorganismos bacterianos, por ejemplo, se ha planteado la hipótesis de la asociación entre el virus parainfluenza tipo I y la enfermedad dada la alta prevalencia de anticuerpos contra este virus en los pacientes con ACG [29]. Adicionalmente, se describió una relación temporal entre el pico de incidencia de esta patología y epidemias de parvovirus B19, Mycoplasma, el virus varicela-zoster y Chlamydia pneumoniae [1, 30-33]. En consonancia con esto, el parvovirus B19 se ha relacionado con la patogénesis de otras vasculitis, como la Granulomatosis de Wegener (GW) y la vasculitis cerebral en niños [28].

Por otro lado, en otro estudio llevado a cabo, con la intención de encontrar un patógeno candidato para explicar dicha etiología, tras la secuenciación del microbioma de pacientes, no encontrando diferencias significativas entre casos y controles [34].

La enfermedad ha sido también relacionada epidemiológicamente con el contacto con periquitos y otros pájaros [35].

Por otra parte, el hecho de que la ACG sea más común entre las mujeres que entre los hombres y rara vez ocurra antes de los 50 años se ha relacionado con las diferencias en el metabolismo de las hormonas sexuales. La producción de estrógenos de las mujeres pre-menopáusicas es cíclico, con una tasa de secreción más alta que la de los hombres. Por otra parte, la menopausia implica un importante cambio en el metabolismo de los estrógenos, y en estudios llevados a cabo se ha visto que los estrógenos pueden estar implicados en el metabolismo de la pared del vaso. Por otra parte, varios estudios sugieren que los estrógenos desempeñan un papel importante en la inmunología. Esto hace pensar que el metabolismo de los estrógenos pueda desempeñar un papel en el envejecimiento vascular y ACG [36].

A pesar del hecho de que factores ambientales como las infecciones pueden activar al sistema inmunitario en un individuo susceptible a la ACG, hasta ahora sólo existen casos episódicos de la presencia de antígenos microbianos en la arteria temporal dañada [32] y la evidencia de una respuesta inmune en la pared vascular dirigida específicamente contra algún patógeno es escasa aún [37].

### 2.3 Aspectos clínicos de la enfermedad.

Las manifestaciones clínicas de la ACG se producen por la inflamación y reducción progresiva de la luz de las arterias de mediano y gran calibre afectadas [1]. La ACG suele ir acompañada de síntomas sistémicos claudicación mandibular y alteraciones visuales [38]. El síntoma más común que el paciente percibe es la cefalea [9, 39], por lo general en la zona de las sienes, aunque el dolor de cabeza puede producirse en cualquier zona, incluidas las partes frontales, superiores y posteriores del cráneo. La mayoría de los pacientes reportan dolor constante en la región temporal.

Los síntomas más generalizados como la fatiga, la pérdida de apetito, la pérdida de peso o una sensación de gripe son también muy comunes. Al masticar, también, puede sentirse dolor en la mandíbula. En algunas ocasiones, la única señal de la ACG es una fiebre sin explicación. Pueden manifestarse síntomas menos frecuentes, como dolor en el rostro, la lengua o la garganta.

Otra de las características clínicas más frecuentes en pacientes de ACG es manifestar PMR [10]. Teniendo esto en consideración se considerará que los pacientes con ACG tienen PMR si presentan los siguientes síntomas: dolor de cabeza bilateral severo, dolor en la nuca, en los hombros y en la cintura pélvica, asociados con rigidez matinal. Así que, es recomendable que los pacientes con PMR, informen a su médico de inmediato sobre cualquier síntoma relacionado con un dolor de cabeza nuevo, cambios en la visión o dolor en la mandíbula.

Por otra parte los pacientes pueden presentar complicaciones isquémicas visuales si experimentan pérdida transitoria de visión (amaurosis fugax), diplopía o la pérdida visual permanente. En este sentido, si los pacientes con ACG sufren al menos una de las siguientes complicaciones: algún tipo de manifestación visual, ictus y/o ataques isquémicos transitorios, claudicación mandibular, o estenosis de alguna arteria mediana o grande arteria de las extremidades con signos evidentes de manifestación oclusiva; se considerará que los pacientes tienen complicaciones severas.

La pérdida de visión es una de las más temidas complicaciones isquémicas de la ACG que ocurre en aproximadamente el 10-20% de los pacientes [40], pudiéndose encontrar con los siguientes problemas visuales: visión borrosa temporal, visión doble y ceguera. La pérdida permanente de la



vista a causa de la ACG puede sobrevenir de repente, pero el tratamiento adecuado puede prevenir esta complicación. De hecho, si la visión se halla intacta al momento de comenzar el tratamiento, el riesgo de una pérdida futura es sólo del 1% o menor.

Con menor frecuencia pueden producirse eventos isquémicos cerebrales, especialmente en el territorio vertebrobasilar [41]. Las alteraciones visuales transitorias están presentes en aproximadamente el 15% de los pacientes y la pérdida completa de visión en el 13%. La trombocitosis presente en algunos de estos pacientes ha sido considerada como un posible factor de riesgo para el desarrollo de estas complicaciones [42]. Por otra parte, la existencia de anemia ha sido asociada con un menor riesgo de manifestaciones clínicas visuales severas [43].

La amaurosis fugax constituye un predictor de lesiones oculares más graves, que debe ser tenido en cuenta [44]. Algunos pacientes pueden presentar como primera manifestación de este proceso un accidente vascular cerebral, que suele afectar con mayor frecuencia a los vasos sanguíneos del territorio vertebro-basilar y por lo tanto dar síntomas en forma de desequilibrio, inestabilidad en la marcha y déficit motor [45]. La ACG se asocia, además, a un riesgo aumentado de aneurismas de aorta torácica y abdominal y disección aórtica, debido al desarrollo de aortitis que suele ocurrir generalmente después de varios años del diagnóstico de la ACG. Siendo los aneurismas de aorta torácica 17 veces más frecuentes en los pacientes con ACG que en la población en general [46]. La elevación de la velocidad de sedimentación globular (VSG) es casi constante en la ACG, si bien ocasionalmente puede ser normal o estar sólo ligeramente elevada. Además del aumento de la VSG y la proteína C reactiva (PCR), la anemia normocítica normocrómica, leucocitosis y / o trombocitosis, y un aumento en las proteínas de fase aguda en la electroforesis de albúmina de suero son indicadores de la inflamación sistémica [37].

Al igual que ocurre con otras enfermedades autoinmunes, el diagnóstico suele ser complejo, ya que la aparición de la enfermedad puede enmarcarse como un proceso secundario dentro del cuadro clínico de otras enfermedades, frecuentemente infecciosas o autoinmunes y predominantemente cutáneas involucrando pequeños vasos, o más raramente éste es primario, no asociado a otras enfermedades.

No existe un simple análisis de sangre ni otra forma no invasiva para confirmar el diagnóstico de ACG. Los niveles elevados de marcadores inflamatorios, como la tasa de sedimentación de eritrocitos, o un análisis de sangre que mide la inflamación, los cuales son altos en la mayoría de

las personas que padece ACG. Pero, dado que otras enfermedades también pueden elevar estos índices, los médicos no pueden confiar en este dato como prueba de ACG.

El primer paso y la clave para sospechar la posibilidad de una ACG y/o PMR, dado que existen diversas formas clínicas de presentación, es la historia clínica. Las manifestaciones clínicas que nos deben hacer sospechar una ACG en un paciente de 50 años o más, se representan en la **Tabla 1**.

En la historia clínica, se ha de recoger, la presencia de factores de riesgo vascular clásicos (Hipertensión, diabetes mellitus, dislipemia, tabaquismo) ya que estos representan una influencia negativa en el desarrollo de manifestaciones isquémicas severas en estos pacientes, así como la cronología y tiempo de evolución de las manifestaciones clínicas.

**Tabla 1. Manifestaciones clínicas de sospecha de ACG**

Paciente mayor de 50 años con:

- Cefalea de inicio reciente o cambio de características de cefalea previa. Localización uni o bilateral en zona temporal u occipital.
- Claudicación mandibular. (Dolor a la masticación que mejora al parar).
- Alteraciones visuales. (amaurosis fugax, ceguera uni o bilateral con o sin amaurosis previas, ptosis palpebral, oftalmoplejia, diplopia, escotomas centelleantes, hemianopsia, cuadrantanopsia, visión borrosa).
- Clínica de polimialgia reumática (dolor y rigidez en cintura escapular o pelviana o cuello) con sintomatología craneal o audiovestibular.

Otros:

- Síndrome febril de origen desconocido.
- Síndrome constitucional.
- Síndrome depresivo en paciente sin antecedentes psiquiátricos con reactantes de fase aguda.
- Otalgia/odinofagia de causa incierta.

- Vértigo/hipoacusia.
- Clínica de afectación vascular en pacientes sin factores de riesgo vascular, sobre todo a nivel femoral, subclavio o axilar (ausencia de pulsos o asimetrías de presión arterial, soplos carotídeos o en fosa infraclavicular, claudicación de extremidades).

Debe realizarse una exploración física completa, dado que se trata de una enfermedad sistémica. En dicho examen clínico, se incluye la exploración detallada y minuciosa de la arteria temporal, la auscultación de las arterias, incluyendo las arterias subclavias y la arteria axilar, y la medición de la presión arterial bilateral con el fin de buscar cualquier estenosis vascular unilateral [47] y en general, la exploración cardiovascular, neurológica y oftalmológica. Además deben de hacerse las siguientes pruebas de laboratorio: Analítica general (Hemograma, VSG y PCR), bioquímica estándar (glucosa, urea, creatinina, ionograma, calcio, fósforo, GOT, GPT, fosfatasa alcalina, GGT, bilirrubina, LDH, CPK, colesterol, proteínas totales, albúmina, proteinograma), coagulación (TP y TTPA) y estudio básico de orina (proteínas, hematuria). En el suero de aproximadamente el 90 % de los pacientes no tratados con ACG se encuentran autoanticuerpos antiferritina. Aunque, su presencia no constituye una prueba de la ACG ya que estos autoanticuerpos antiferritina también se encuentran en otras enfermedades inflamatorias / reumáticas.

Las alteraciones analíticas que pueden estar presentes en la ACG, y que básicamente indican proceso inflamatorio-reactante de fase aguda, se presentan en la **Tabla 2**.

### **Tabla 2. Alteraciones analíticas en ACG**

- VSG  $\geq$  a 50mm/h ( 5-10% de pacientes pueden tener VSG normal al diagnóstico).
- Anemia normocítica normocrómica
- Aumento de otros reactantes de fase aguda (PCR, fibrinógeno,  $\alpha$ -2-globulinas)
- Descenso de albúmina plasmática
- Aumento moderado de enzimas hepáticas, especialmente fosfatasa alcalina y GGT.

Un estudio inmunológico puede ser útil para descartar otros procesos (ANAs, ANCA, factor reumatoide). También es recomendable realizar un electrocardiograma y una radiografía de tórax.

Excepto por los hallazgos histopatológicos, no existe ningún signo ni síntoma, ni hallazgo de laboratorio específico para el diagnóstico de ACG. Para la confirmación del diagnóstico se realizará una biopsia de aquella arteria temporal en la que existen síntomas clínicos o signos de alteración en la exploración física [48].

La biopsia de arteria temporal estaría indicada en aquellos pacientes con sospecha de ACG es decir: Pacientes con 50 años o más con VSG elevada (>50mm/h) y alguno de los criterios presentes en la **tabla 3**.

### **Tabla 3. Indicaciones de biopsia de arteria temporal.**

#### **Pacientes de 50 años con VSG $\geq$ 50 mm/h con alguno de siguientes criterios:**

- Cefalea de aparición reciente o de características diferentes a las habituales o aparición de algias faciales atípicas a nivel cervical u occipital.
- Claudicación mandibular
- Alteraciones visuales de aparición aguda que sugieren origen isquémico (amaurosis fugax, ceguera uni o bilateral, diplopia, visión borrosa).
- Hipersensibilidad, engrosamiento o ausencia de pulso de la arteria temporal (palpación patológica de arteria temporal).
- Anemia normocítica normocrómica (una vez descartadas otras causas).
- Síndrome febril prolongado (una vez descartadas otras causas).
- Síndrome constitucional (astenia, anorexia y pérdida del 10% de peso habitual, tras descartar otras causas).
- Polimialgia reumática con síntomas craneales, clínica audiovestibular, clínica sistémica severa o que no responde a tratamiento corticoideo.

En resume, el diagnóstico de ACG se basa en los síntomas clínicos, los marcadores inflamatorios, datos de laboratorio y la existencia de inflamación en la biopsia de la arteria temporal. La presencia de inflamación en la pared del vaso es la prueba definitiva de la vasculitis y por lo tanto se considera como el estándar de oro de diagnóstico en la ACG. Así que, aunque los parámetros histológicos pueden servir como marcadores de pronóstico, para la confirmación del diagnóstico de ACG se requiere la realización de una biopsia de la arteria temporal, para comprobar si existe inflamación de la arteria. La biopsia o extracción quirúrgica de una pequeña porción de la arteria temporal es una técnica sencilla, que se realiza con anestesia local, es poco costosa y con escasas o nulas complicaciones. En ocasiones la biopsia puede ser negativa (hasta 10-15% de biopsias en ACG son negativas, sin embargo, una biopsia de arteria temporal normal no excluye el diagnóstico de ACG, ya que la afectación de la arteria temporal puede ser segmentaria o presentar un patrón irregular de la inflamación en la pared de la arteria. Los falsos negativos se pueden minimizar si se toma una muestra de al menos 2 centímetros, y si el resultado inicial es negativo realizando biopsia de la arteria temporal contralateral. La realización de biopsia de arteria temporal contralateral solo ha demostrado un aumento de entre 1%-5% de diagnósticos por lo que su realización deberá individualizarse. En contraposición, la presencia de biopsia de arteria temporal positiva confirma el diagnóstico [48].

El American College of Rheumatology (ACR) definió en 1990 unos criterios para la clasificación de la ACG (**Tabla 4**). La presencia de 3 de estos 5 criterios tiene una sensibilidad y una especificidad para el diagnóstico de ACG del 93 y 91%, respectivamente. Estos criterios de la ACR han sido validados en España. No obstante, estos criterios se realizaron para diferenciar unas vasculitis de otras y no pueden considerarse criterios diagnósticos. Por ello la mayoría de los autores aceptan que la biopsia de arteria temporal debe realizarse para confirmar el diagnóstico [49].

Se define como ACG con biopsia negativa a aquellos pacientes con biopsia temporal negativa y que clínicamente podrían diagnosticarse de ACG, para lo cual sería necesario que cumplieran 3 o más, de los 5 criterios clásicos de clasificación de la ACR (Tabla 4) y que no presenten en ese momento ni en el año siguiente, ningún otro proceso que pudiera explicar los síntomas.

**Tabla 4. Criterios de clasificación del Colegio Americano de Reumatología para la arteritis de células gigantes**

Edad ≥ 50 años	Desarrollo de síntomas o signos después de la edad de 50 años
Cefalea de reciente comienzo	Dolor de cabeza de reciente comienzo o de características nuevas
Alteraciones de la arteria temporal	Dolor a la palpación, descenso del pulso de las arterias temporales no relacionado con arteriosclerosis de las arterias carotídeas
VSG ≥ 50 mm/1ª h	Determinada por el método de Westergren
Biopsia de arteria temporal anormal	Mostrando vasculitis caracterizada por un predominio de células mononucleares o inflamación granulomatosa, generalmente con células gigantes multinucleadas

Para la clasificación de un paciente como ACG, debe reunir al menos 3 de los 5 criterios (sensibilidad: 93,5%; especificidad: 91,2%).

En cuanto al tratamiento, la ACG responde muy bien al tratamiento con corticoides, administrados inicialmente en dosis única diaria o mejor en 3 dosis al día. Generalmente, de 40 a 60 mg al día de prednisona o equivalente es suficiente en la mayoría de los enfermos. La mayor parte de los enfermos precisa tratamiento durante 1 o 2 años, aunque en algunos casos es necesario prolongarlo durante más tiempo [41].

## 2.4 Fisiopatología de la ACG

La ACG se caracteriza por la inflamación en la pared arterial que conduce a cambios estructurales que reducen el flujo sanguíneo y provocan hiperplasia de la íntima y obstrucción del lumen provocando las manifestaciones isquémicas de los tejidos suministrados por la arteria. A pesar de que la fisiopatología de la GCA aún es poco conocida, se sabe que después de la activación de las células dendríticas, en la frontera de la adventicia y la media de las arterias de mediano y gran calibre, los linfocitos T CD4 + se activan y se someten a expansión clonal y se diferencian en células Th17 y células T helper (Th1). Las células Th17 producen interleucina 17 (IL - 17 ) como se puede observar en la figura 1, que puede inducir la producción de citoquinas por los macrófagos y los fibroblastos y son responsables de las manifestaciones sistémicas de la enfermedad. Por otro lado, las Th1 producen interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) que conduce a la diferenciación y la migración de los macrófagos resultando en la formación de células gigantes multinucleadas que forman granulomas y finalmente, tanto las células T como los macrófagos producen citocinas pro-inflamatorias que contribuyen a la inflamación de la pared arterial y la oclusión de los vasos [18, 50, 51]

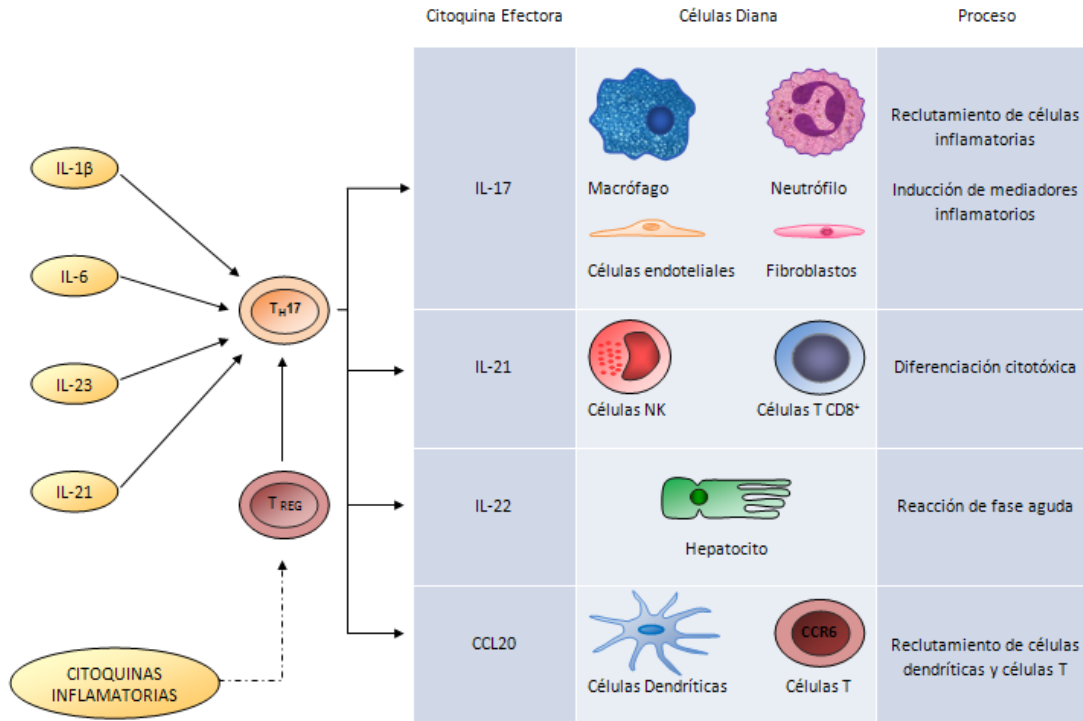


Figura 1. El grupo de citocinas IL-6 /IL -17 en la arteritis de células gigantes. IL-1β, IL-6, IL-23 e IL- 21 cambian la diferenciación de las células T hacia el linaje Th17. Las células Th17 producen una gran cantidad de citocinas que regulan los efectos inflamatorios locales y sistémicos en la ACG. Figura adaptada de Weyand et al. Nat. Rev. Rheumatol. 2013; 9, 731-740.

Como se puede observar en la figura 2, las arterias temporales de pacientes con ACG tienen infiltrados de células gigantes multinucleadas situados en las proximidades de la lámina elástica interna fragmentada mientras que las células CD4<sup>+</sup> y macrófagos se organizan en los granulomas y por el contrario las células CD8<sup>+</sup> y los neutrófilos son escasos [52].



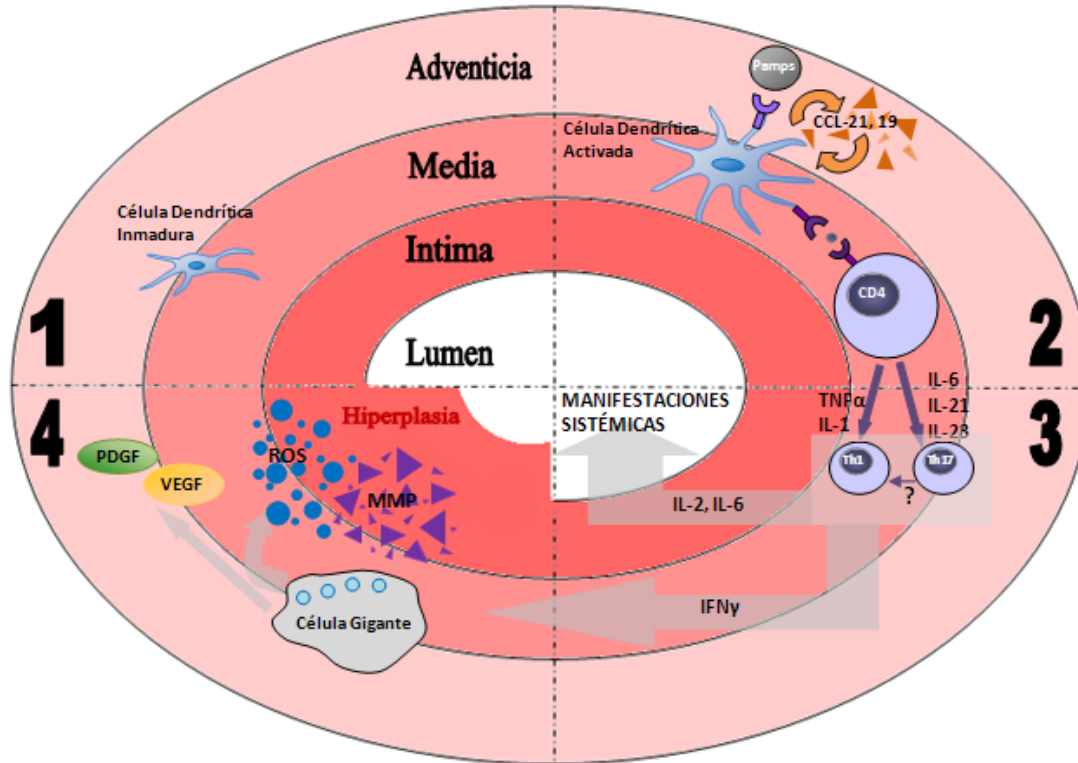


Figura 2. Inmunopatofisiología de grandes vasos en la arteritis de células gigantes.

1. En arterias normales, Células dendríticas (CD) inmaduras, en la frontera adventicia-media, son los centinelas inmunes de la pared del vaso. 2. En ACG, su maduración y activación (por un instigador desconocido) conduce al reclutamiento de las células T CD4+ en la pared del vaso. 3. Las células T CD4+ son capaces de diferenciarse en: Th17, que es responsable de las manifestaciones sistémicas de la enfermedad, o Th1. 4. Las células Th1 junto con IFN- $\gamma$  conducen a la activación de los macrófagos, la formación del granuloma y la destrucción de la integridad estructural de la pared del vaso a través de la secreción de MMP y de ROS. Figura adaptada de Panagiota B. et al. *Medicine; Immunology, Allergology and Rheumatology*, libro editado por Lazaros I. Sakkas y Christina Katsiari, 2013.

#### 2.4.1. Cambios histológicos y mecanismos fisiopatológicos en la ACG.

Las lesiones histopatológicas involucran a todas las capas de la pared arterial y se asocian con células gigantes multinucleadas, lámina elástica fragmentada e infiltrados celulares incluyendo los linfocitos T y los macrófagos. Así que, histológicamente la ACG se caracteriza por una inflamación granulomatosa que afecta a todas las capas de las arterias medianas y grandes que tienen lámina elástica interna [53]. Los hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos sugieren la presencia de una reacción inmune celular. El infiltrado celular está compuesto de linfocitos T helper, células plasmáticas y macrófagos aunque, pueden encontrarse también histiocitos, células gigantes, eosinófilos y fibroblastos [54].

La oclusión del lumen, se debe a la hiperplasia de la íntima desencadenado por la migración y proliferación de miofibroblastos y al subsecuente engrosamiento mural [55]. La enfermedad tiene un curso temporal y espacial variado, por lo que los segmentos de las regiones adyacentes a las zonas no afectadas de inflamación son comunes, lo que puede tener relevancia para el diagnóstico en el 10% de los casos [56].

#### 2.4.2. La respuesta inmune en la ACG

En la ACG, tanto el sistema inmune innato como el adaptativo, resultan implicados [37]. La respuesta de fase aguda mediada por el sistema inmune innato es responsable del componente inflamatorio sistémico de la enfermedad.

La adventicia arterial de mediano y de gran tamaño es el sitio de la lesión inmunológica primaria [55] puesto que en las arterias, sólo la capa adventicia es vascularizada con una red capilar (la *vasa vasorum*), mientras que las capas íntimas y media son avasculares. A través de la *vasa vasorum*, las células T y los macrófagos tienen acceso a la pared arterial. No obstante, la fuerza del flujo sanguíneo impide la adhesión celular y su entrada a la *vasa vasorum*. Sin embargo, la adventicia alberga una población nativa de células dendríticas inmaduras que vigilan estas zonas [55, 57].

Como se observa en la siguiente figura 3, estas CD inmaduras, localizadas en la adventicia de arterias temporales de individuos sanos, expresan S100 y el receptor de quimioquinas 6 (CCR6) mientras que no expresan los marcadores de superficie celular CD83 o CD86, lo que indica su estado de reposo [58].

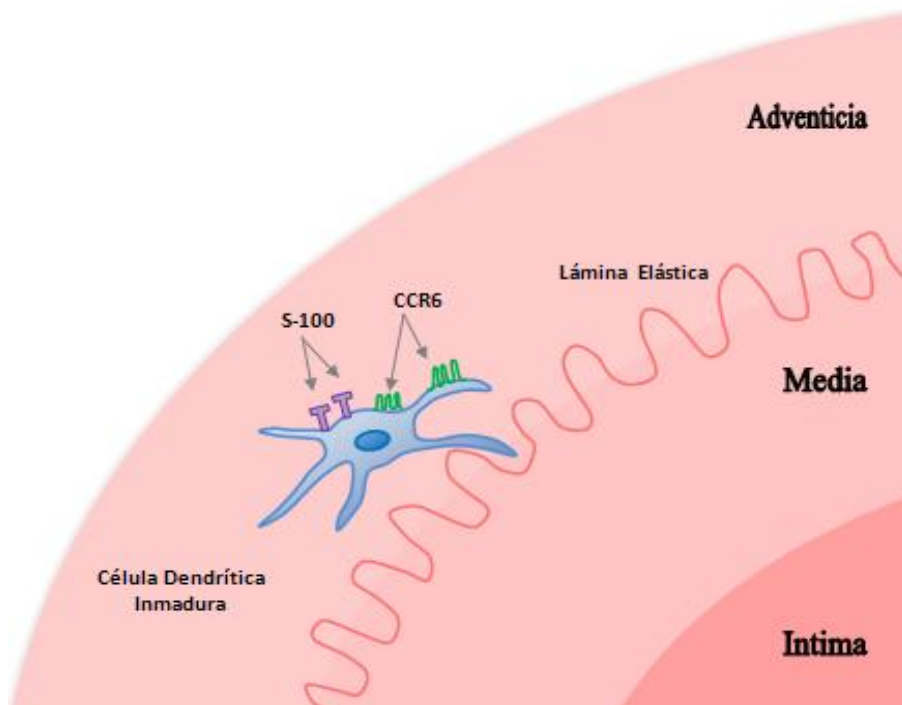


Figura 3. Células dendríticas (CD) en la adventicia normal. Las arterias de mediano calibre, como la arteria temporal, contienen una población de CD que están posicionadas en la adventicia. En las arterias normales, las CD S 100 + son inmaduras y expresan el receptor de quemoquinas CCR6. Ellas se especializan en fagocitar el antígeno y detectar el daño celular. Figura adaptada de New Engl J Med 2003; 349:160-169.

Normalmente, las CD activadas migran a los ganglios linfáticos, donde pueden desencadenar la respuesta inmune adaptativa, sin embargo, en pacientes con ACG, las CDs activadas permanecen en la pared arterial. La activación de las CD preceden al reclutamiento de CD4 +. Por otro lado los TLR4 inducen panarteritis transmural, mientras que los TLR5 causan infiltrados perivasculares en la adventicia [58].

Estas células dendríticas una vez activadas en la adventicia, se convierten en células presentadoras de antígeno, que reclutan células T (CD4+) en defensa del tejido. Como se observa en la figura 4, estas CD activadas expresan CD83 y CD86 y producen IL-18 y pueden aumentar la liberación de IFN  $\gamma$  desde los linfocitos T. También, producen grandes cantidades de quemoquinas como CCL19 y CCL21, que se unen a CCR7 y la expresión de CCR7 produce el reclutamiento de las CD activadas,

sin abandonar el tejido [59]. Las CD quedan atrapadas en la pared arterial e inician una respuesta inmune aberrante dependiente de linfocitos T.

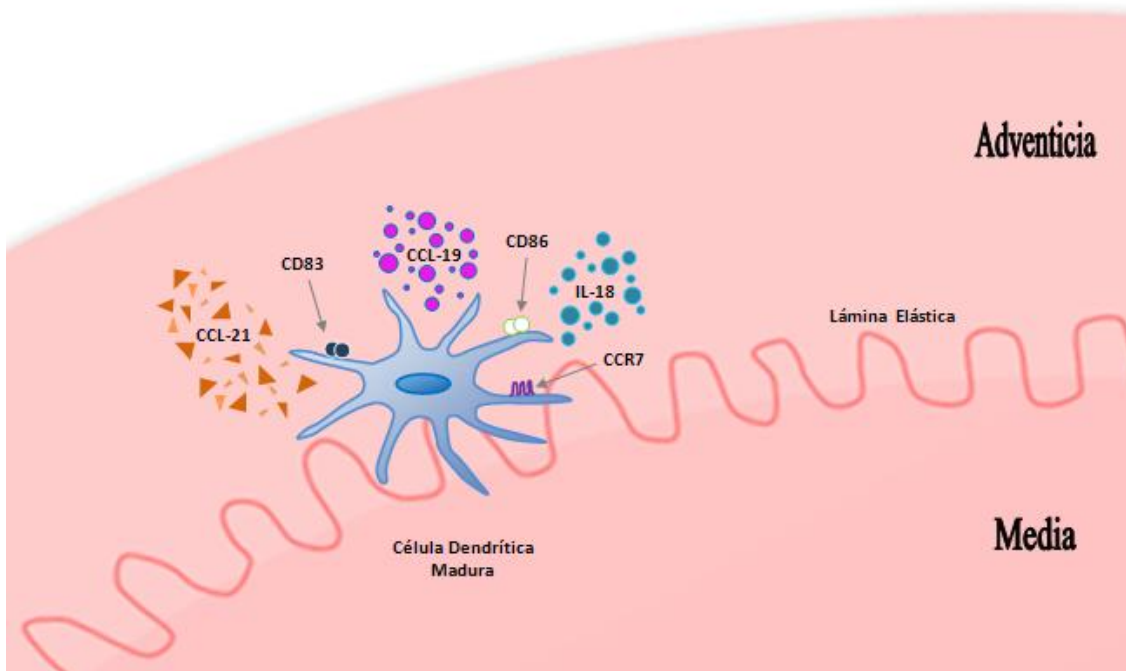


Figura 4. Células dendríticas (CD) activadas en arteritis. Las CD en las arterias con vasculitis están activadas, como lo indica la expresión de CD 83 y CD 86, pudiendo dar señales coestimuladoras para activar a los linfocitos T. Estas CD secretan IL-18 y pueden aumentar la liberación de IFN g desde los LT. Producen grandes cantidades de quemoquinas como CCL19 y CCL21, que se unen a CCR7. La expresión de CCR7 produce el reclutamiento de las CD activadas, sin abandonar el tejido. Las CD quedan atrapadas en la pared arterial e inician una respuesta inmune aberrante dependiente de LT. Figura adaptada de New Engl J Med 2003; 349:160-169.

El cambio en el estatus de función de las células dendríticas es el marcador crítico y el evento temprano en el desarrollo de la vasculitis [60] y desencadena una respuesta de tipo Th1, con importante secreción de IL-2 y IFN- $\gamma$ . Estos, principalmente el IFN- $\gamma$ , inducen la formación de un proceso inflamatorio de carácter granulomatoso [23], que da lugar también a la liberación de una gran variedad de factores de crecimiento y factores angiogénicos, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) [61]. Como

se puede ver en la figura 5, al nivel de la adventicia se produce también un infiltrado de macrófagos (CD68+) que producen citoquinas proinflamatorias tales como la Interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) [24] y factor transformante del crecimiento-1 $\beta$  (TGF-1 $\beta$ ) [62], que estimula la quimiotaxis de más células inflamatorias desde la *vasa vasorum* promoviendo así la inflamación local y sistémica. IL - 6 induce un aumento en el nivel de PCR y VSG, que se asocia con la gravedad de la enfermedad [63].

En la lámina elástica interna se produce un infiltrado de células monocito-macrófago que activados por IFN -  $\gamma$  migran por interacción de moléculas de ICAM-1 desde la red de neovascularización, inducidas por el proceso inflamatorio en esta localización [64], pueden fusionarse, formando células gigantes y participando en la formación del granuloma [62]. Estos granulomas están compuestos por células CD4 +, macrófagos y células gigantes, y se sitúan preferentemente cerca de la lámina elástica interna, en el límite de la íntima y la media.

El principal papel de estas células es la liberación de metaloproteinasas y enzimas de óxido nítrico (óxido nítrico sintasa inducible - iNOS), que destruyen la matriz extracelular de la arteria, especialmente la elastina. La neovascularización se correlaciona estrechamente con la formación de neoíntima, la fragmentación de la lámina elástica interna y la presencia de células multinucleares.

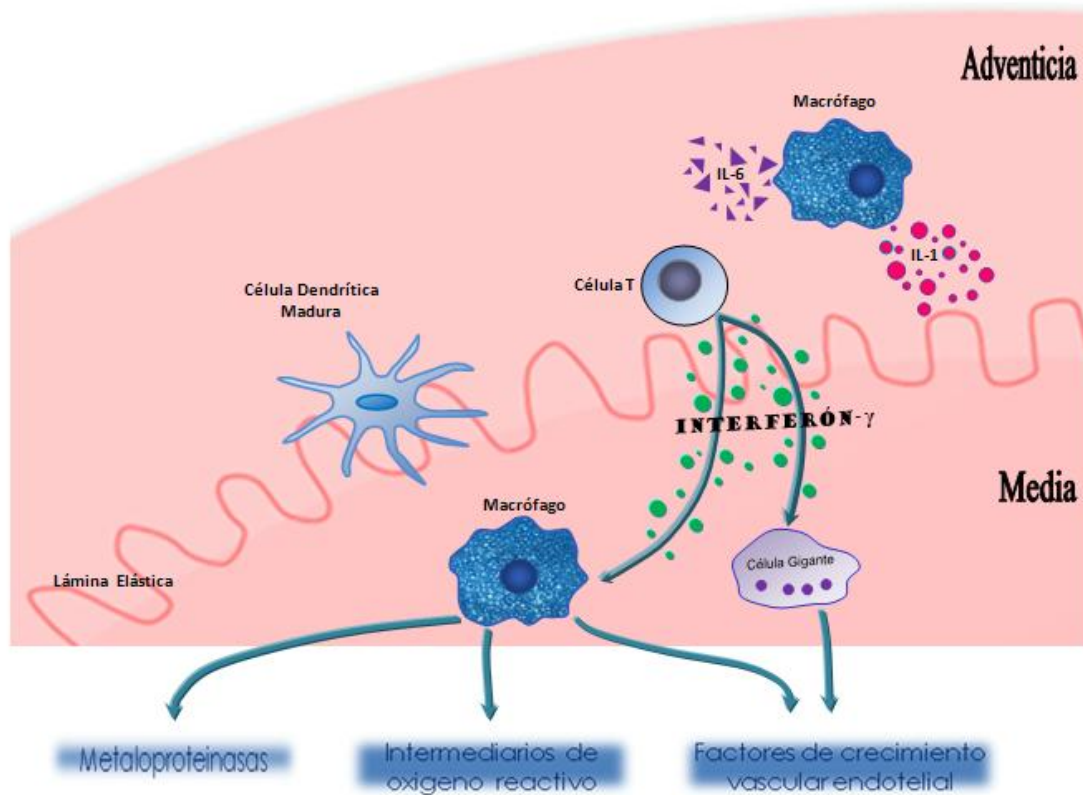


Figura 5. Respuesta adaptativa en la arteritis de células gigantes. La activación y el reclutamiento de las CD en la adventicia generan condiciones para el “atrapamiento” y estimulación de los LT antígeno- específicos. Los LT CD4 que entran al microambiente de la pared arterial interactúan con las CD y secretan citoquinas. El IFN $\gamma$  es crítico, pues regula la diferenciación y función de los macrófagos. El compromiso funcional de los macrófagos en el infiltrado vascular se asocia a su localización en la pared arterial: los macrófagos en la adventicia producen IL-1 e IL-6, mientras que los macrófagos de la media secretan metaloproteinasas y juegan un rol crítico en el daño oxidativo por la producción de intermediarios reactivos de oxígeno. Figura adaptada de New Engl J Med 2003; 349:160-169.

Se ha descrito también la existencia de daño directo endotelial, producido por linfocitos activados [65]. A nivel de sangre circulante, los linfocitos T de los pacientes con ACG muestran expresión de marcadores de activación [51] como el HLA-DR, el receptor de IL-2 y el receptor de transferrina y también expresión de integrinas [66]; así mismo se ha apreciado un bajo número de células T (CD8+) [67].

## 2.5 Genética de la ACG

Los factores genéticos son importantes en la predisposición a esta enfermedad y gracias a los numerosos estudios llevados a cabo en los últimos años, se están haciendo avances para poder dilucidar la influencia genética que se ha implicado tanto en la susceptibilidad como en la gravedad de esta vasculitis [58].

En este apartado de la tesis vamos a tratar de describir las asociaciones genéticas hasta el momento con el objetivo de conducir a una mejor comprensión de la red genética que subyace a esta enfermedad. En una reciente revisión, Carmona et al. [68] exponen las asociaciones reportadas hasta la presente, aquí incluimos además una nueva asociación que ha sido descrita como resultado de las investigaciones del presente trabajo.

Los genes más estudiados con respecto a su implicación en la enfermedad, son aquellos situados dentro de las regiones de clase I y clase II del HLA, pero a pesar de la gran relevancia de estos alelos HLA en la predisposición genética a la ACG, se estima que estos solo forman una parte de la contribución genética total a la enfermedad. Por lo tanto, hay numerosos genes que deben influir en la ACG fuera de la región HLA. En las siguientes tablas se incluye un resumen de las asociaciones incluidas en la region HLA, así como las asociaciones fuera de dicho complejo.

**Tabla 5.** Estudios genéticos del alelo HLA-DRB1 \* 04 en la arteritis de células gigantes descritos hasta la fecha

Año de publicación	Localización	Asociación con HLA-DRB1*04	Cohorte analizada (caso / control)	Valor - P	Referencias
1992	Rochester, Minnesota (USA)*	Sí	42/63	0.03	Weyand <i>et al.</i> [15]
1994	Rochester, Minnesota (USA)*	Sí	52/72	0.0001	Weyand <i>et al.</i> [69]
1998	Toulouse (Francia)	Sí	41/384	<0.001	Rauzy <i>et al.</i> [70]
1998	Montpellier (Francia)	Sí	42/1609	0.0005	Combe <i>et al.</i> [71]
1998	Lugo (España)	Sí	53/145	<0.05	Dababneh <i>et al.</i> [72]
1999	Reggio Emilia (Italia)	No	39/250	>0.05	Salvarani, <i>et al.</i> [73]
2002	Copenhagen (Dinamarca)	Sí	65/193	0.01	Jacobsen <i>et al.</i> [19]
2004	Cantabria (España)	Sí	44/99	0.04	Martínez-Taboda <i>et al.</i> [74]

\* Ascendencia escandinava.



**Tabla 6.** Loci de susceptibilidad para la arteritis células gigantes fuera de la región HLA.

Año de publicación	loci de susceptibilidad	variación asociada	Población	Tamaño de la Cohorte (GCA/controls)	Valor-P (test alélico)	OR [CI 95%]*	Asociación	Replicación	Referencia	Gen asociado con otras vasculitis
2000	<i>TNF</i>	TNFA2	Noroeste de España	62/147	0.003	2.50 [1.30-4.80]	Enfermedad global	No	Mattey <i>et al.</i> [75]	BD, AAV, TA
2000	<i>TNF</i>	TNFA10	Noroeste de España	62/147	0.02	0.30 [0.10-0.80]	Enfermedad global	No	Mattey <i>et al.</i> [75]	
2000	<i>CCL5</i>	rs2107538	Noroeste de España	30/65	NS	NS	PMR	No	Makki <i>et al.</i> [76]	
2000	<i>ICAM1</i>	rs1799969	Norte de Italia	56/228	0.00005	5.00 [2.20-11.50]	Enfermedad global (PMR)	No	Salvarani <i>et al.</i> [77]	BD
2002	<i>IL6</i>	rs1800795	Noroeste de España	62/124	0.06 <sup>a</sup>	2.3 [NA]	PMR	No	Gonzalez-Gay <i>et al.</i> [78]	BD, TA
2012	<i>IL6</i>	rs7805828	España	82/166	0.0119	0.33 [0.13-0.82]	Enfermedad global	No	Enjuanes <i>et al.</i> [79]	
2012	<i>IL6</i>	rs1546762	España	82/166	0.037	2.04 [1.03-4.05]	Enfermedad global	No	Enjuanes <i>et al.</i> [79]	
2003	<i>NOS3</i>	rs1799983	Norte de Italia	91/133	0.02	1.60 [1.10-2.30]	Enfermedad global	No	Salvarani <i>et al.</i> [80]	BD
2003	<i>NOS3</i>	C-1-T <sup>b</sup>	Noroeste de España	57/117	0.02	0.30 [0.10-0.80]	Enfermedad global	No	Amoli <i>et al.</i> [81]	
2003	<i>VEGF</i>	rs2010963	Norte de Italia	92/200	0.019	1.53 [1.06-2.21]	Enfermedad global	Sí	Boiardi <i>et al.</i> [82]	BD
2005	<i>VEGF</i>	rs2010963	Noroeste de España	103/226	0.021	1.75 [1.08-2.88]	VIM	Sí	Rueda <i>et al.</i> [83]	
2012	<i>VEGF</i>	rs2010963	España	82/166	0.0097	NA	Enfermedad global	Sí	Enjuanes <i>et al.</i> [79]	
2012	<i>VEGF</i>	rs699946	España	82/166	0.0137	NA	Enfermedad global	No	Enjuanes <i>et al.</i> [79]	
2012	<i>VEGF</i>	rs699947	España	82/166	0.0364	NA	Enfermedad global	No	Enjuanes <i>et al.</i> [79]	
2004	<i>IFNG</i>	allele*3 microsatellite (intron 1)	Noroeste de España	59/129	0.01	3.13 [1.27-7.68]	VIM	No	Gonzalez-Gay <i>et al.</i> [84]	BD
2004	<i>IL4</i>	T-T-C-A-C <sup>c</sup>	Noroeste de España	82/102	0.02 <sup>d</sup>	2.00 [1.00-3.90]	Enfermedad global	No	Amoli <i>et al.</i> [85]	BD
2005	<i>NOS2A</i>	TAAA repeat	Noroeste de España	103/198	0.007	1.98 [1.20-3.27]	Enfermedad global	No	Gonzalez-Gay <i>et al.</i> [86]	TA
2012	<i>NOS2A</i>	rs2779251	España	82/166	<0.0001	0.27 [0.14-0.52]	Enfermedad global	No	Enjuanes <i>et al.</i> [79]	
2005	<i>MCP1</i>	C-C <sup>e</sup>	Noroeste de España	79/99	0.03 <sup>d</sup>	2.09 [1.09-4.02]	Enfermedad global	No	Amoli <i>et al.</i> [87]	BD
2012	<i>MCP1</i>	rs1860190	España	82/166	0.0347	NA	Enfermedad global	No	Enjuanes <i>et al.</i> [79]	
2006	<i>IL10</i>	rs1800872	Norte de Italia	140/200	0.0002	2.00 [1.40–2.80]	Enfermedad global	No	Boiardi <i>et al.</i> [88]	BD, AAV
2007	<i>IL10</i>	rs1800896	Noroeste de España	103/226	0.1 <sup>f</sup>	1.29 [0.92–1.80]	Enfermedad global	No	Rueda <i>et al.</i> [89]	

2006	<i>FCGR3A</i>	rs396991	Noroeste de España	85/132	0.06 <sup>b</sup>	NA	Enfermedad global	No	Morgan <i>et al.</i> [90]	BD
2006	<i>FCGR2A</i>	rs1801274	Noroeste de España	85/132	0.05 <sup>h</sup>	NA	Enfermedad global	No	Morgan <i>et al.</i> [90]	BD
2008	<i>MMP9</i>	rs2250889	Philadelphia (USA)	30/23	0.009	NA	Enfermedad global	No	Rodríguez-Pla <i>et al.</i> [91]	
2008	<i>MPO</i>	rs2333227	Norte de Italia	156/235	0.0001	2.00 [1.40-2.90]	Enfermedad global	No	Salvarani <i>et al.</i> [92]	
2009	<i>TLR4</i>	rs4986790	España	210/678	0.01	1.65 [1.08-2.52]	Enfermedad global	No	Palomino-Morales <i>et al.</i> [93]	BD
2010	<i>IL18</i>	rs360719	España	212/405	0.003	1.48 [1.13-1.95]	Enfermedad global	No	Palomino-Morales <i>et al.</i> [94]	BD
2010	<i>IL18</i>	rs1946518	España	212/405	0.02	1.32 [1.04-1.69]	Enfermedad global	No	Palomino-Morales <i>et al.</i> [94]	
2011	<i>IL12RB2</i>	rs3790567	España	357/574	0.039	1.25 [1.01-1.54]	Enfermedad global (VIM)	No	Rodríguez-Rodríguez <i>et al.</i> [95]	BD
2011	<i>IL2/IL21</i>	rs6822844	España	272/791	0.04	1.76 [1.02-3.04]	Claudicación mandibular	No	Rodríguez-Rodríguez <i>et al.</i> [96]	BD, TA
2012	<i>NLRP1</i>	rs8182352	España e Italia	685/2898	0.0026	1.20 [1.06-1.35]	Enfermedad global	Sí	Serrano <i>et al.</i> [25]	
2013	<i>PTPN22</i>	rs2476601	España, Alemania, Noruega y Reino Unido	911/ 8136	1.06E-04	1.62 [1.29 -2.04]	Enfermedad global	Sí	Serrano <i>et al.</i> [26]	AAV

\*OR, odds ratio para el alelo menor; VIM, manifestaciones isquémicas visuales; PMR, polimialgia reumática. NS, no significativo, NA, no disponible; BD, enfermedad de Behçet; AAV, Vasculitis asociada a ANCA; TA arteritis de Takayasu.

aP-valor del análisis del genotipo CC en pacientes con ACG con PMR versus aquellos con ACG aislada = 0,02

bHaplotipo: rs2070744\*C-VNTR 1 en intrón 4-rs1799983\*T.

cSNP pedido: rs2070874-rs2227284-rs2227282-rs2243266-rs2243267.

dHaplotipo valor-P

eSNP pedido: rs4586-rs13900.

fGenotípica P=0.034.

g Modelo dominante: P=0.03, OR=3.09 [1.10-8.64].

hModelo recesivo: P=0.02, OR=2.10 [1.12-3.77].

### 2.5.1. Asociaciones HLA

La mayoría de los estudios genéticos de asociación que se han llevado a cabo en relación a la enfermedad se han centrado en el complejo MHC, por ser el locus que ofrecía los resultados más significativos en estudios de ligamiento [97]. La región MHC es también el locus que presenta una mayor asociación con la enfermedad aunque se ha estimado que a lo sumo podría explicar la mitad de la carga genética de la misma [98].

El MHC es un complejo de genes que se localizan en el brazo corto del cromosoma 6, en la región 6p21.3. Consiste en un conjunto de genes altamente polimórficos y que presentan un elevado desequilibrio de ligamiento, es decir, la tasa de recombinación es baja o inexistente, por lo que alelos localizados en distintos “loci” tienden a transmitirse conjuntamente formando haplotipos que se heredan de padres a hijos. El MHC en humanos se conoce como antígenos leucocitarios humanos (HLA, human leukocyte antigen). Su función es la presentación de antígenos a los linfocitos T, de manera que presentan un papel clave en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Cumplen con la función de reconocer lo propio y lo ajeno y aseguran la respuesta inmunológica, capaz de defender al organismo de algunos agentes extraños que generan infecciones.

Las moléculas HLA son glicoproteínas y son parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Hay dos clases de HLA que tienen una función ligeramente diferente. Tienen muy diferentes secuencias de aminoácidos, pero la estructura tridimensional muy similar. Se les conoce como HLA de clase I y HLA de clase II.

HLA de clase I es un heterodímero formado por dos cadenas polipeptídicas unidas de forma no covalente. La cadena  $\alpha$  ó cadena pesada y una cadena  $\beta$ 2 microglobulina o cadena ligera. La cadena  $\alpha$  está compuesta por tres dominios los cuales se numeran desde el extremo N-terminal,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2, y  $\alpha$ 3. Los dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 1 formar la hendidura de unión al péptido, donde el antígeno es presentado al receptor de las células T, este espacio creado es lo suficientemente grande para que quepan péptidos entre 8 a 11 aminoácidos. El segmento  $\alpha$ 3 contiene una región transmembrana que se une a la molécula a la membrana celular (**Figura 6**). En esta región se encuentran los genes que codifican para los genes HLA-A, B y C entre otros.

Las moléculas HLA de clase II está formado por dos cadenas asociadas de modo no covalente, la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  que son sintetizadas por genes del MHC. La cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  poseen segmentos que desde su extremo N-terminal se nombran como  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ . En esta molécula los sitios de unión al péptido se encuentran entre los dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ , y el espacio que queda entre esta unión permite que se unan los péptidos antigénicos entre 10 a 30 residuos o incluso más. Mientras que los segmentos  $\alpha 2$  y  $\beta 2$  se pliegan formando dominios tipo Ig. Los bucles formados por las secuencias  $\beta 2$  son el sitio de unión a la molécula CD4 de los Linfocitos T colaboradores. En similitud con las moléculas de clase I, el MHC II completamente ensamblado y estable es un heterotrimerio, constituido por la cadena  $\alpha$ , la cadena  $\beta$  y el péptido. Estas moléculas codifican principalmente a los genes HLA-DR, DQ y DP.

Existen en un individuo normal heterocigoto, seis alelos para la cadena  $\alpha$  y seis para la cadena  $\beta$ , lo que nos daría como resultado un total de doce posibles variantes en la molécula del HLA II, sin embargo existen cadenas  $\alpha$  provenientes del alelo HLA-DQ $\alpha$  que no necesariamente se aparean con las cadenas  $\beta$  del alelo HLA-DQ $\beta$ , si no que pueden asociarse a cadenas  $\beta$  de otros alelos (HLA-DP $\beta$ , HLA-DR $\beta$ , etc.). Este mecanismo permite la existencia de alrededor de 10 a 20 moléculas de clase II.

MHC de clase I se encuentra en todas las células nucleadas y es fundamental para la inmunidad anti-viral. MHC de clase II, por el contrario se encuentra en un pequeño número de células especializadas conocidas colectivamente como células presentadoras de antígeno (CPAs). Las células presentadoras de antígenos incluyen macrófagos, linfocitos B, linfocitos T citotóxicos entre otros. Los linfocitos T citotóxicos, CD8, expresan la molécula con el receptor de células T. CD8 se une a MHC de clase I y no a MHC de clase II. Así que, las células T citotóxicas se unen a MHC de clase I. Las células T auxiliares no expresan CD8 sino que expresan CD4 que funciona de una manera similar, por lo tanto, MHC de clase II se une a las células T auxiliares. Por esta razón las células T auxiliares también se conocen como células CD4 y las células T citotóxicas como CD8.

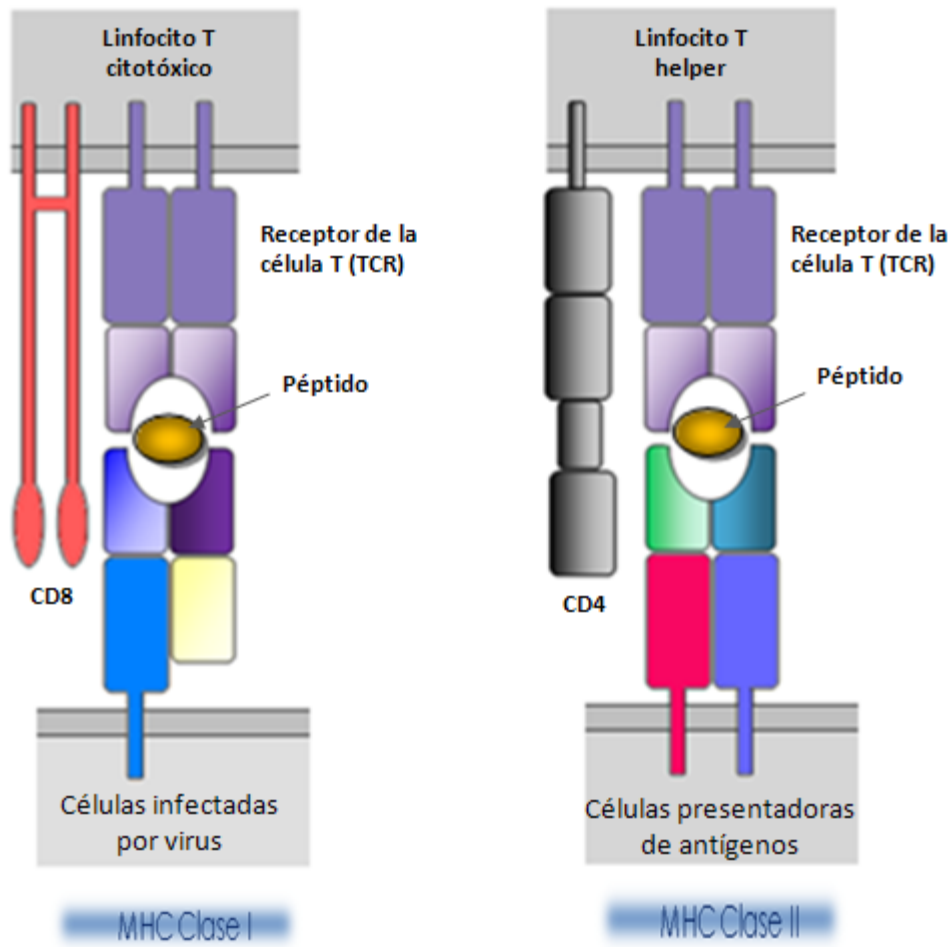


Figura 6. Estructura de las moléculas MHC de clase I y II unidos a linfocitos T citotóxicos y linfocitos T auxiliares o helper, respectivamente.

La región de clase III se sitúa entre la I y la II, y contiene genes importantes en el sistema inmune innato, incluyendo el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  ( $TNF-\alpha$ ) y algunos componentes del complejo como C2 y C4. (Figura 7)

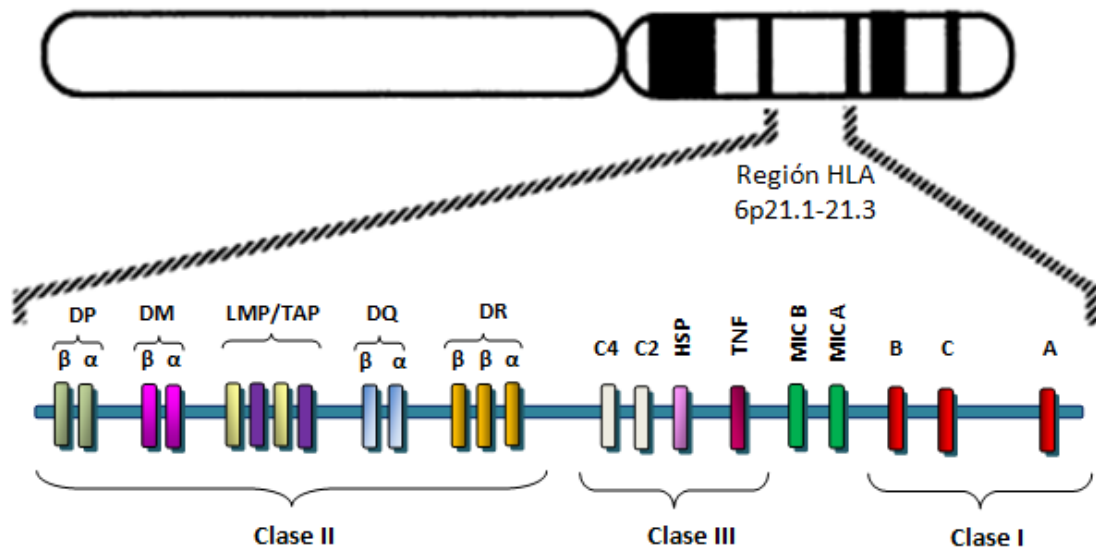


Figura 7. Representación esquemática del complejo principal de histocompatibilidad humano, donde se muestran los loci que codifican los antígenos HLA de Clase I y II más importantes.

#### 2.5.1.1. Asociaciones HLA de clase II

Las asociaciones genéticas más consistentes con ACG se encuentran dentro de la región HLA de clase II, particularmente el alelo HLA-DRB1 \* 04 (específicamente DRB1 \* 0401 y DRB1 \* 0404) que se ha identificado como el principal contribuyente del componente genético de la ACG en diferentes poblaciones tanto en personas de origen escandinavo, donde esta enfermedad es más frecuente, así como en la población española [15-17, 19, 69-72, 74, 99-102]

Además se ha reportado una asociación de *HLA-DRB1\*04* con el desarrollo de complicaciones visuales de esta vasculitis [103]. En particular el alelo HLA-DRB1\*0404 [15, 69] está presente en aproximadamente el 50% de los pacientes y se ha observado una incidencia de manifestaciones oculares tres veces más frecuente y de mayor severidad, así como una mayor incidencia de eventos isquémicos neurológicos [45, 104]. Así como la resistencia al tratamiento con esteroides en pacientes con ACG que también ha sido relacionada con la presencia de dicho alelo [70]. Por otro lado, el hecho de que en otros estudios no hayan confirmado dicha asociación [73] puede

estar influido por otros factores étnicos o geográficos [104]. Aunque la asociación entre HLA-DRB1 y ACG ha sido claramente demostrada, existen controversias sobre la asociación genotípica de HLA-DRB1 con PMR. Así, en un estudio llevado a cabo en España los pacientes con ACG, con o sin manifestaciones de PMR, fueron asociados con los alelos de HLA-DRB1\*04, mientras que aquellos con el PMR aislado se asociaron con el HLADRB1\*13/14 [72].

Esta discrepancia se ve apoyada por datos de otro estudio en pacientes de ACG en Francia donde hay una prevalencia alta de los alelos HLA-DRB1\*040 y un incremento en la frecuencia del HLADRB1\*01 en pacientes con PMR aislado [105]. Estas observaciones ponen de manifiesto las diferencias en la asociación de los alelos HLA-DRB1 entre la ACG y la PMR.

#### 2.5.1.2. Asociaciones HLA de clase I

Otros estudios han reportado asociaciones débiles con alelos de MHC de clase I como *HLA-A \* 31*, *HLA-B \* 8*, *HLACw3*, *HLA-Cw6* [17, 106, 107].

Otros datos publicados posteriormente [21] sugieren que polimorfismos de MHC de clase I pueden estar involucrados en la predisposición genética a ACG, probablemente al influir en la presentación de antígenos a las células T. Específicamente, *HLA-B\*15* se ha asociado con ACG en una población caucásica del noroeste de España.

Otra molécula interesante dentro de la familia de moléculas HLA de clase I no clásicas son las moléculas MICA que junto con las MIC-B forman dicha familia [108]. Estas moléculas son ligandos de los receptores NKG2D expresados en la superficie de células T CD8+ y NK [109], son altamente polimórficas en humanos, con más de 50 alelos descritos.

El gen *MICA* se localiza entre las regiones de clase I y clase III del MHC [108], aproximadamente a 46 kb de los genes HLA-B. El gen *MICA* codifica una molécula inducible por estrés con tres dominios extracelulares ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ), un dominio transmembrana (TM) y una cola citoplasmática (CY) [108].

En el exón 5 del gen *MICA*, que codifica la región transmembrana de la molécula, se describió un microsatélite polimórfico que consiste en una serie de repeticiones (GCT)<sub>n</sub> cuyos alelos determinan la presencia de un número variable de residuos de alanina [110]. Además la variante alélica *MICA 5.1* consiste en la inserción nucleotídica de una G entre el segundo y el tercer triplete

de repeticiones, (GCT →GGCT), causando la alteración del marco de lectura y generando como consecuencia un codón de parada prematuro [111]. Una estimulación por antígenos de naturaleza desconocida, probablemente de origen infeccioso, podría desencadenar la expresión de proteínas de choque térmico en el tejido de la arteria induciendo la expresión de MICA.

La localización de los genes *MICA* en la región HLA y su asociación con otras enfermedades autoinmunes sugirió que el gen *MICA* podía ser un buen gen candidato para el desarrollo de ACG, de manera que Gonzalez-Gay et al. llevaron a cabo un estudio para evaluar la contribución de los polimorfismos de los genes *MICA* y *HLA-B* en la patogenia de la ACG. Como resultado de dicho estudio se proporcionaron por primera vez evidencias de que los genes *MICA* y *HLA-B* están asociados independientemente con la susceptibilidad genética a ACG, sugiriendo que varios genes en el MHC pueden tener efectos independientes en la susceptibilidad a esta vasculitis sistémica [21].

### 2.5.2 Asociaciones con los genes que codifican citocinas

Ya que tanto la ACG como PMR se caracterizan por una fuerte respuesta de fase aguda sistémica, los factores genéticos de moléculas que intervienen en la inflamación pueden jugar un papel crucial en el riesgo a esta patología. Teniendo en cuenta esto, en esta sección vamos a describir las asociaciones significativas para la predisposición genética a la ACG de los genes que codifican los componentes clave del proceso de inflamación que han sido reportados hasta el momento. Dichos genes codifican variedad de citocinas y factores de crecimiento, en particular, interleucina (IL) -6, interferón (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral (TNF)  $\alpha$ , IL - 10, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), enzimas metaloproteinasas - 9 (MMP - 9), óxido nítrico sintasa endotelial, mieloperoxidasa, y el patrón molecular asociado a patógenos receptores Toll-like receptor de reconocimiento de 4 (TLR4), aunque los resultados no siempre son consistentes a través de las poblaciones [58].



El **gen del Factor de necrosis tumoral - alfa (TNF -  $\alpha$ )** se localiza dentro de la región MHC de clase III y codifica una citoquina proinflamatoria implicada en la regulación de las células inmunes, es producido por los macrófagos activados, las células T CD4 + y las células NK [112].

En pacientes con ACG con una fuerte respuesta inflamatoria sistémica, se han detectado niveles elevados de TNF y una alta producción de esta citoquina se asoció con un tratamiento más largo con corticosteroides para estos pacientes [113].

En un estudio llevado a cabo en España [75], se evidenció que la ACG y la PMR están asociadas con diferentes polimorfismos de microsátélites del TNF. De modo que, mientras que la ACG está fuertemente asociada con el alelo del microsátélite TNF- $\alpha$ 2 independientemente de los alelos del HLA-DRB1, en pacientes con PMR aislada, existe una asociación positiva con el TNF-b3, que también es independiente de los alelos del HLA-DRB1. Así que, los pacientes con ACG sin síntomas de PMR y los pacientes con PMR aislada podrían ser diferenciados por la frecuencia del alelo TNF- $\alpha$ . Los autores también observaron que la frecuencia del microsátélite TNF $\alpha$ 10 fue significativamente menor en los pacientes con ACG sin manifestaciones PMR en comparación con aquellos que muestran PMR o con PMR aislada, lo que apoya a la idea de que la ACG asociada con PMR es diferente de la ACG sin PMR y más similar a la PMR aislada.

EL **interferón gamma (IFN- $\gamma$ )** es una citoquina clave en el sistema inmunológico, está implicado en la inmunidad innata y adaptativa contra patógenos intracelulares y el control de tumores. Es producido predominantemente por las células NK, T CD4 + y CD8 +. El interferón gamma es una de las citoquinas más característica del perfil Th1. La variación genética y desarreglos en la regulación de la expresión génica de esta citoquina se han asociado con un amplio espectro de enfermedades inflamatorias crónicas y enfermedades autoinmunes [114]. La ACG se considera una enfermedad Th1 típica, y el IFN- $\gamma$  producido por las células T CD4 + ha sido descrito como una de las poblaciones de células dominantes en los infiltrados arteriales. Se ha observado que el IFN- $\gamma$  sigue siendo liberado en las lesiones de esta vasculitis incluso después de meses de tratamiento con corticoides [50]. Sin embargo, en un estudio en el que se analizaron tres polimorfismos diferentes del locus *IFN- $\gamma$* , no se observó asociación con la enfermedad global lo que sugiere que las variantes funcionales del *IFN- $\gamma$*  pueden influir en la gravedad de la enfermedad en lugar de la susceptibilidad de la misma [85].

La **interleucina 10 (IL-10)** es una citoquina antiinflamatoria producida por monocitos, células T (células Th2 y CD8), queratinocitos y células B activadas. Tiene un efecto pleiotrópico (actúan sobre muchos tipos celulares) en el sistema inmune. Actúa como inhibidor de macrófagos y células dendríticas activadas, por lo tanto participa en el control de reacciones inmunitarias innatas e inmunidad celular y expresión de moléculas del MHC clase II. También mejora la supervivencia de células B, la proliferación y la producción de anticuerpos, puede bloquear la actividad de NF- $\kappa$ B, y está involucrado en la regulación de la vía de señalización JAK-STAT [115]. Se ha demostrado que hay asociación entre ACG y diferentes variantes genéticas funcionales de IL-10, concretamente las variantes; rs1800896\*A/G, rs1800872\*A/C y rs1800871\*C/T se asocian con un aumento en el riesgo a desarrollar fenómenos cardiovasculares [116]. Esta asociación también se ha visto en otras enfermedades reumáticas como AR [117], LES [118] y SS [119], entre otras. Además dos estudios independientes en poblaciones española e italiana indicaron que variantes en la región del promotor de IL-10 están implicadas en la susceptibilidad genética a ACG [88, 89]. En la población española la variante que se ha visto asociada a ACG es el polimorfismo rs1800896 mientras que en la población italiana, la variante que se ha visto asociada es rs1800872. En cualquier caso, el haplotipo que contiene el alelo menor de los tres SNPs (rs1800896\*G - rs1800871\*Trs - 1800872\*A) está fuertemente asociada en ambos estudios ( $P < 0,0001$ ).

La **interleucina 4 (IL-4)** es una glucoproteína del grupo de las citocinas, producida por las células T de tipo 2 (Th2), basófilos, mastocitos y eosinófilos activados. Actúa como antiinflamatorio al bloquear la síntesis de IL-1, TNF-alfa, IL-6 y la proteína inflamatoria del macrófago. Entre otras funciones, promueve la diferenciación de linfocitos Th2, la proliferación y diferenciación de linfocitos B y es un potente inhibidor de la apoptosis [120].

Diferentes variantes genéticas de *IL-4* han mostrado evidencias de una asociación con la predisposición a desarrollar ACG, y estas asociaciones aumentaron sustancialmente su importancia estadística cuando se tuvo en cuenta el *HLA-DRB1 \* 04*, lo que sugiere una posible interacción entre ambos loci [85].

La **interleucina 6 (IL-6)** es una glucoproteína segregada por muchos tipos de células diferentes, incluyendo los macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Localizado en el cromosoma 7, su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta a TNF $\alpha$ . Es una citocina con actividad antiinflamatoria y proinflamatoria [121]. Se ha demostrado que un

polimorfismo del promotor de este gen (rs1800795 \* G / C) influye en los niveles de expresión de IL- 6, y su desregulación se ha implicado en el desarrollo de la fenotipos clínicos en numerosas enfermedades autoinmunes como SSc, LES and AR [122-124], respectivamente.

En estudios llevados a cabo en pacientes de ACG se ha puesto de manifiesto una correlación entre la concentración de IL-6 y los síntomas clínicos [63, 125].

Estudios independientes realizados en Italia y en España no han demostrado el hecho de una asociación entre el polimorfismo promotor rs1800795 y la predisposición a esta enfermedad [78, 126]. Si bien, el estudio llevado a cabo en la población española sugirió que este polimorfismo puede estar relacionada con el desarrollo de PMR en pacientes con ACG, especialmente en aquellos que son portadores del alelo *HLADRBI* \* 04 [78]. Sin embargo, un estudio reciente en una cohorte independiente española identificó a dos variantes genéticas de *IL-6* asociadas con ACG (rs1546762, situada en la región del promotor, y rs7805828, situado aguas arriba de el extremo 3' del gen) [79].

La **interleucina 18 (IL-18)** también llamada “factor inductor de interferón gamma”, es una citoquina proinflamatoria producida por los macrófagos, linfocitos NK y linfocitos T. Esta citoquina juega un importante papel en la inflamación crónica y tiene un papel importante en la patogenia de diferentes enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico [127]. Se ha observado un aumento significativo en la expresión del ARNm de IL18 en individuos portadores de del alelo C en el polimorfismo rs360719 de IL18 en células de sangre periférica [128]. También se ha visto un aumento en los niveles de expresión de IL-18 en biopsias de pacientes de ACG y el SNP rs1946518\* G / T ha sido asociado recientemente con la susceptibilidad a ACG [94].

La **proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1)** también se conoce como ligando de quimioquina 2 con motivo C-C (CCL2), es una pequeña citoquina que pertenece a la familia de las quimioquinas CC. MCP-1 recluta monocitos, células T de memoria, y las células dendríticas a los sitios de la inflamación producida por cualquier tipo de lesión tisular o infección, aunque también puede estar implicada en la inflamación crónica [129]. El hecho de que esta quimioquina haya sido detectada en la mayoría de las células mononucleares, algunas células de músculo liso y células gigantes de las biopsias de arterias de pacientes de ACG, sugiere que puede jugar un papel en la infiltración de monocitos de la pared de la arteria que conduce a la lesión vascular en esta

vasculitis [130]. Además, se observó un aumento de la expresión de MCP1 en pacientes con ACG y otras enfermedades autoinmunes, incluyendo AR y aterosclerosis [130, 131]. Los diferentes polimorfismos del gen MCP1 se asociaron con la gravedad clínica de diferentes enfermedades autoinmunes así como con complicaciones de las arterias coronarias [132-134].

En cuanto a la ACG, se observaron diferencias significativas en la frecuencia de un haplotipo compuesto por tres SNPs, situados en el intrón 1, el exón 2 y la región 3'UTR del gen, entre los pacientes españoles y controles [87]. Además, también se ha reportado la asociación entre el SNP rs1860190 \*A/T y la ACG en la población española [79].

El **ligando de quimioquina 5 con motivo C-C (CCL5)** también conocida como RANTES (regulated and normal T cell expressed and secreted). CCL5 codifica un factor quimiotáctico potente para monocitos, células T, basófilos, eosinófilos y mastocitos que expresan el receptor CCR5 [135]. Esta citocina es uno de los principales factores supresores del VIH-1 producidos por las células CD8+. Suprime la replicación in vitro de las cepas R5 del VIH-1, que utilizan CCR5 como correceptor. Estudios llevados a cabo, sugieren que en pacientes con PMR los niveles séricos de esta quimioquina están aumentados y la terapia con corticoides parece normalizar dichos niveles [136]. En un estudio que se realizó con ACG se investigó la posible implicación del polimorfismo rs2107538 \*G/A y aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de los alelos de casos de ACG y controles, se mostró una asociación con PMR aislada [76].

#### **La interleucina 2 (IL-2)/ interleucina 21 (IL-21)**

La IL-2 es una proteína que actúa como factor de crecimiento de los linfocitos T, induce todos los tipos de subpoblaciones de linfocitos y activa la proliferación de linfocitos B. La IL-2 también regula la respuesta inmunitaria, interviene en la reacción inflamatoria estimulando la síntesis de interferón, induce la liberación de IL-1, TNF-alfa y TNF-Beta. Esta citoquina actúa sobre las mismas células que la producen o sobre células adyacentes lo que hace referencia a su función como factor de crecimiento y supervivencia autocrino y paracrino respectivamente. Además, la IL-2 es necesaria para el establecimiento de la memoria inmunitaria celular, así como para el reconocimiento de autoantígenos y antígenos foráneos. En resumen, la IL-2 es esencial para la diferenciación de las células T reguladoras [137]. La IL-21 es otra citoquina con actividad inmunorreguladora. IL-21 juega un papel tanto en la respuesta inmunes innata como en la

adaptativa mediante la inducción de la diferenciación, la proliferación y la activación de múltiples células diana incluyendo los macrófagos, las células NK, células B y células T citotóxicas [138]. Un SNP localizado entre ambos locis, el rs6822844\*G/T, ha sido asociado con varias enfermedades autoinmunes [139-141]. No está claro si esta señal refleja una asociación específica con IL2 o IL21, probablemente debido al gran desequilibrio de ligamiento en esta región [142]. En otro estudio realizado en una cohorte española se investigó la posible implicación de este polimorfismo en la susceptibilidad a la ACG, obteniéndose como resultado una mayor frecuencia del alelo menor de dicho SNP en pacientes con complicaciones isquémicas severas y cuando el análisis se llevó a cabo en pacientes con claudicación mandibular, se alcanzó la significación estadística lo que sugiere que la región genómica IL-2/IL-21 puede contribuir a la expresión fenotípica de la enfermedad [96].

El **receptor beta 2 de la IL-12 (IL12RB2)** es una subunidad del receptor de la IL - 12 cuya expresión está regulada por el IFN- $\gamma$ . IL12RB2 desempeña un papel importante en la diferenciación celular y se cree que contribuye a la respuesta inflamatoria [143]. Teniendo en cuenta que Th1 y Th17 son desempeñan un importante papel en la fisiopatología de la ACG [144], se realizó un estudio en una cohorte española para evaluar si este gen puede representar un factor de riesgo genético para la ACG. Como resultado de dicho estudio se obtuvo una significativa asociación entre el polimorfismo rs3790567\*A/G de IL12RB2 y la susceptibilidad a la enfermedad, particularmente con el subgrupo de pacientes que muestran complicaciones visuales isquémicas, lo que sugiere un potencial efecto de las células Th1 y Th17 en el desarrollo de estas manifestaciones [96].

### 2.5.3 Asociaciones con moléculas implicadas en la función endotelial

Los polimorfismos genéticos en los genes que codifican para las moléculas de adhesión de células endoteliales han sido considerados como posibles factores de susceptibilidad clave que influyen en las enfermedades vasculares, puesto que la disfunción de la célula endotelial puede conducir al desarrollo de condiciones inflamatorias crónicas.

La **molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1)** es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulina con un papel importante en las interacciones entre las células inmunes y endoteliales durante el proceso inflamatorio [145].

Las moléculas de adhesión participan en el tráfico de linfocitos entre los órganos de producción, maduración y tejidos. La adhesión leucocitaria se incrementa en sitios de inflamación local, favoreciendo el rodamiento celular de leucocitos sobre las células endoteliales cercanas a los focos de inflamación.

Se ha observado que los niveles elevados en suero de ICAM- 1 se correlacionaron con la enfermedad en pacientes con ACG, y también se detectó la expresión de esta molécula en la membrana sinovial de pacientes con PMR, así como en infiltrados de la arteria temporal en la ACG, que sugiere que esta proteína puede ser un componente relevante de los procesos inflamatorios de estas manifestaciones clínicas [64].

Un SNP no sinónimo localizado en el exón 4, el rs1799969 \* A/G, se asoció con la predisposición a la ACG y PMR y con un mayor riesgo de recaída / recurrencia en pacientes con PMR en una cohorte italiana [77]. Sin embargo, este hallazgo no se repitió en un estudio posterior realizado en una población española [146].

El **factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF**, por Vascular Endothelial Growth Factor) es una proteína señalizadora implicada en la formación de vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario (vasculogénesis) y tiene un papel fundamental en el crecimiento de vasos nuevos en el adulto (angiogénesis). Promueve angiogénesis en los procesos de inflamación crónica, cicatrización y en tumores. VEGF es secretado por muchas células del mesénquima y del estroma. VEGF induce moléculas de adhesión en las células endoteliales durante la inflamación y estimula la proliferación y diferenciación de estas células en los sitios de angiogénesis [147].

En la ACG, el VEGF ha sido propuesto como uno de las principales moléculas que influyen en la progresión de dicha vasculitis, jugando un doble papel actuando por un lado como un factor proinflamatorio y por otro actuando en la compensación isquémica [148]. Señalar que ha sido detectado un aumento de los niveles circulantes de VEGF en pacientes de PMR [149] evidenciando que estas altas concentraciones pueden estar relacionadas con la isquemia del nervio óptico en pacientes de ACG [150].

Los portadores de una variante genética funcional situada en la región del promotor de VEGF (rs2010963 \* G/C), se ha reportado que afecta a la expresión del gen y a los niveles circulantes de la proteína [151], y ha sido asociado con susceptibilidad a la ACG [82]. En otro estudio en una

cohorte española, se observó una asociación específica de esta variante de VEGF con la presencia de manifestaciones isquémicas severas en pacientes con ACG [115], y muy recientemente se ha informado que otras tres variantes genéticas de VEGF (rs1885657 \* C/T, rs699946 \* A/G y rs699947 \* A/C), confieren riesgo genético a desarrollar esta vasculitis [79].

La **óxido nítrico sintetasa (NOS)** es una oxidorreductasa responsable de la síntesis de óxido nítrico (ON). Es la enzima responsable de transformar la L-arginina en óxido nítrico (ON) en una catálisis orgánica de oxidorreducción (reacción RedOx), sin gasto de energía o ATP, así que, está implicado en una amplia variedad de procesos biológicos. El óxido nítrico ha sido descrito como un mediador clave del equilibrio Th1/Th2 en la autoinmunidad, y un aumento de los niveles de ON se correlacionan con el desarrollo de diferentes enfermedades reumáticas como la AR [152].

En la ACG Se ha observado que los macrófagos expresan NOS2A [153] y se ha visto que la producción de ON por la iNOS puede tener un papel importante en la limitación de la reacción inflamatoria [154].

En un polimorfismo dentro del promotor de NOS2A ha sido asociado con la ACG en una cohorte del noroeste de España [86]. Además, hay evidencias recientes que han confirmado que la variación genética dentro de este locus también puede ser crucial en la predisposición de la ACG, ya que otra variante en el promotor de NOS2A, la rs2779251 \* A/G, mostró un efecto protector altamente significativo para la ACG [79].

Por otro lado, NOS3, que también se conoce como NOS constitutiva (cNOS) o NOS endotelial (eNOS), es expresado constitutivamente por las células endoteliales que revisten el tejido vascular [155]. Esta producción de ON por las células endoteliales es necesaria para la regulación de la vasodilatación local, para evitar la agregación de las plaquetas, la adhesión de las células del sistema inmunitario, y para reducir selectivamente la expresión endotelial de moléculas de adhesión y citoquinas proinflamatoria [156].

En consecuencia, es posible que el mal funcionamiento del sistema ON pueda estar implicado en el daño vascular de la ACG. De hecho, los estudios sobre las poblaciones italianas y españolas señalaron a NOS3 como un gen de susceptibilidad para la ACG [80, 81]. Por primera vez, un SNP no sinónimo en el exón 7 (rs1799983 \* T/G, Glu298 Asp) mostró una clara asociación con la enfermedad [80], mientras que un estudio en la población española mostró la asociación de un haplotipo que incluye a esta variante genética, una repetición en tándem en el intrón 4 y un

promotor del SNP en la posición -78 (rs2070744 \* T/C) [81]. Por lo tanto, aunque se necesitan estudios posteriores para confirmar esta asociación, es posible que estas variantes puedan estar influyendo en el fenotipo de la enfermedad mediante la generación de estrés oxidativo.

La **matriz metalopeptidasa 9 (MMP-9)** una proteína que pertenece a la familia MMP, estas proteínas son enzimas dependientes de zinc con actividad proteolítica de la matriz extracelular que están involucradas en multitud de procesos fisiológicos y patológicos [157]. MMP9 codifica una proteína clave en el sistema proteolítico que rompe la membrana basal, permitiendo la progresión de las células inmunes hacia las paredes de la arteria durante la inflamación. Desempeña un importante papel en los procesos de remodelación vascular y el desarrollo de la lesión aterosclerótica [158].

En las lesiones de la ACG se ha detectado una expresión elevada de MMP9 en los infiltrados de los vasos inflamados [159].

Dentro de la región promotora de la MMP9, se ha visto que un SNP funcional (rs3918242 \* C/T) conduce a un aumento de la actividad del promotor y esto se ha asociado con la aterosclerosis y los aneurismas de la aorta [160].

Por otra parte, en un estudio realizado en una pequeña cohorte de pacientes de ACG de raza caucásica estadounidense no se encontraron evidencias de dicha asociación con este polimorfismo. Sin embargo, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de los alelos entre casos y controles de ACG en otra variante no sinónima de MMP9 (rs2250889 \* C/G) [91].

#### [2.5.4. Asociaciones con genes de la respuesta inmunitaria](#)

Como era de esperar, se ha reportado también polimorfismos en genes implicados en la respuesta inflamatoria e inmune a contribuir a la susceptibilidad genética a ACG.

El **receptor tipo Toll 4 (TLR4)** pertenece a la familia TLR que constituyen una familia de proteínas que forman parte del sistema inmunitario innato. Este grupo de proteínas transmembrana son expresadas por diferentes tipos de células, incluyendo las células inmunes que juegan un papel



fundamental en el reconocimiento de patógenos y la activación de la inmunidad innata. Estas moléculas reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y juegan un papel fundamental en la inflamación [161].

Uno de los miembros de esta familia, es de TLR - 4, que ha sido implicado en eventos de transducción de señales inducido por lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas, así como estructuras de hongos y patógenos microbacterianos [162].

En un estudio llevado a cabo en una cohorte española de gran tamaño en pacientes de ACG, se ha visto una asociación significativa entre un polimorfismo no sinónimo de TLR4 (rs4986790 \* A/G Asp299Gly) sugiriendo que este gen puede desempeñar un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad [93]. Curiosamente, esta variante del gen TLR4 mostró un efecto aditivo con polimorfismos de la IL18 en la susceptibilidad de la ACG [94]. Aunque esta asociación no se confirmó completamente en dos estudios posteriores en poblaciones caucásicas independientes [163, 164], si que se observó una tendencia a la asociación cuando los tres estudios fueron metaanalizados (P = 0,082; OR = 1,46, IC del 95%: 0,95, 2,25) [163]. Por otra parte una reciente publicación de un meta-análisis y una revisión sistemática de diferentes vasculopatías (incluyendo ACG, BD y Púrpura de Schönlein-Henoch) indicó que esta variante puede representar un verdadero factor de riesgo genético para la vasculitis en general y para la ACG en particular [165]. Se ha demostrado que un polimorfismo de TLR4 (rs4986790 \* A/G), mediante señales LPS-TLR4, afecta al dominio extracelular de la proteína, influyendo así en el proceso inflamatorio [166].

Teniendo en cuenta que la activación de TLR - 4 a través de LPS, promueve la activación de las células dendríticas, es probable que esta proteína promueva la inducción del proceso inflamatorio en la ACG [60].

El **CD24** también conocido como antígeno estable al calor, representa otro posible factor de riesgo genético para la ACG. Codifica una molécula de adhesión celular expresada en la superficie celular de diferentes tipos de células inmunes, incluyendo células T, células B, granulocitos, macrófagos, y células dendríticas, y parece jugar un papel en la selección y maduración de las células durante la hematopoyesis así como en la activación de células T CD4 + y CD8 + [167, 168].

La molécula CD24 ha sido implicada en diferentes procesos de malignidades de tumor ya que aumenta el potencial metastásico de las células malignas, debido a su capacidad para unirse a P-

selectina lo que promueve la difusión de células tumorales y el reclutamiento de células T a los sitios de inflamación [169-172].

El análisis de los dos polimorfismos de *CD24* que parecen ser funcionales en una población española, un SNP codificante (rs8734 \* C / T) y una delección de TG en la región 3' del gen (rs3838646 \* TG / DEL), sugirieron claramente que este gen está implicado en la susceptibilidad a la ACG. En particular, la delección del dinucleótido mostró un considerable aumento en el riesgo de ACG con respecto a los controles (OR = 2,31).

Los **receptores de Fc y (Fc y Rs)** pertenecen a la familia de receptores Fc que son proteínas de la superficie celular de la superfamilia de las inmunoglobulina, que se encuentra en la membrana de algunas células inmunes, tales como células B , células NK , macrófagos , neutrófilos y mastocitos. Los receptores Fc están clasificados según el isotipo de anticuerpo que reconocen, de esta manera se encuentran Receptores para Ig G, Ig E, Ig A. El nombre pasa a escribirse entonces indicando el isotipo con una letra del alfabeto griego. Así que el receptor Fc de la IgG es RFcγ, dichos receptores son cruciales para la inducción de fagocitosis de patógenos opsonizadas o células infectadas. También, están involucrados en la liberación de citoquinas, incluyendo el TNF [173]. Diferentes polimorfismos de los genes *FCGR* (*FCGR2A*, *FCGR3A*, y *FCGR3B* y *FCGR2B*) se analizaron en un estudio caso-control en una pequeña cohorte española, en el cual los autores descubrieron asociaciones significativas con la ACG para un polimorfismo de *FCGR2A*, rs1801274 \* G en homocigosis (*FCGR2A* - 131RR) y el rs396991 \* T de *FCGR3A*. Además, los haplotipos rs1801274 \* G- rs396991 \* T (*FCGR2A 131R* - *FCGR3A 158F*) se asoció con al menos 3 veces más riesgo en ACG [90].

La enzima **Mieloperoxidasa (MPO)** que se expresa abundantemente en neutrófilos y monocitos y secretada durante su activación [174]. Es responsable de la actividad microbicida contra un amplio espectro de organismos, catalizando la oxidación del ion cloruro a ácido hipocloroso, que es un agente antimicrobiano con potentes propiedades proinflamatorias que pueden causar daño vascular. Además, esta proteína causa la modificación oxidativa de la lipoproteína de baja densidad a una forma de alta absorción que se considera que está implicada en la aterogénesis [175]. De hecho, hay evidencia que sugiere que el aumento de los niveles de MPO en suero puede representar un marcador de riesgo para la aterosclerosis y la enfermedad de la arteria coronaria [176]. Además, algunos autoanticuerpos, tales como ANCA, se dirigen contra MPO en las vasculitis

[177]. Por otra parte, datos anteriores sugirieron que los genotipos relacionados con la baja expresión del gen MPO tienen un papel protector en la enfermedad de la arteria coronaria [178]. El polimorfismo rs2333227\* G/A, que afecta a la expresión de MPO [179], se asoció con la predisposición a ACG [92]. Teniendo esto en cuenta, es probable que la MPO represente un componente clave en las enfermedades inflamatorias vasculares, proporcionando un mecanismo para la disfunción endotelial y el daño de la pared del vaso.

## 2.6 Bases genéticas comunes en autoinmunidad.

Gracias a numerosos estudios se sabe que las enfermedades autoinmunes comparten la característica de ser patologías genéticas complejas en las que múltiples genes intervienen en el desarrollo de la enfermedad, y que un cierto porcentaje del componente genético de las enfermedades autoinmunes es compartido entre ellas [180-183].

En los últimos años gracias a los nuevos avances en las técnicas de genotipado y al proyecto del HapMap ha sido posible el desarrollo de los estudios de asociación del genoma completo (GWAS). Hasta la fecha numerosos GWAS han aparecido en diversas enfermedades, incluyendo la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis sistémica o la espondilitis anquilosante, entre otras. Estos estudios han confirmado regiones de asociación ya conocidas de susceptibilidad a estas enfermedades como los genes *HLA*, *PTPN22*, *STAT4*, *IRF5* e *IL23R*, entre otros. Además, se han identificado nuevas e interesantes regiones de susceptibilidad que necesitan ser confirmadas en estudios de replicación para poder esclarecer el papel de esas nuevas regiones en la susceptibilidad a la enfermedad. En este sentido, algunos de estos genes están implicados en la susceptibilidad genética a varias enfermedades autoinmunes, lo que apoya la teoría de un origen genético compartido en autoinmunidad. De modo que podemos decir que gracias a los GWAS se ha confirmado con claridad la existencia de un componente genético común de autoinmunidad.

Se conoce que una parte importante del componente genético de la susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes reside en el MHC, si bien los genes responsables dentro de esta región no están completamente identificados. A pesar de que la mayoría de las enfermedades autoinmunes presentan un pico de asociación con el MHC, los alelos HLA asociados a cada enfermedad son diferentes. Por otro lado, es evidente que otros genes fuera del MHC contribuyen al desarrollo de dichas enfermedades autoinmunes.

Al igual que ocurre con otras enfermedades autoinmunes, la ACG comparte gran similitudes genéticas con otros desordenes autoinmunes como es el caso de la AR. Al igual que en el caso de la AR, la ACG también es una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica en las que predominan las células CD4 +, y factores ambientales y genéticos parecen contribuir a su etiología [11, 184].

Así se conoce que tanto la AR como la ACG se han asociado con un aumento de la respuesta inflamatoria y se han descrito asociaciones con los alelos HLA -DRB1 \* 04 [185].

En muchos casos, no se han identificado los alelos causales precisos o genes que impulsan estas asociaciones. Sin embargo, algunos loci que muestran asociaciones con múltiples enfermedades pertenecen a categorías de genes asociados que, a su vez, implican la participación de vías funcionales particulares. Estos incluyen la señalización intracelular que conduce a la activación de células T y B, la señalización por citocinas y receptores de citocinas, y las vías que median la inmunidad innata y las respuestas microbianas. Esto pone de manifiesto el hecho de que la mayoría de los genes recientemente identificados se pueden asignar a algunas vías moleculares inmunológicas compartidas.

Y aunque la mayoría de los estudios de asociación genómica se han centrado en una serie de casos de ascendencia europea, estudios de otras poblaciones muestran que algunas asociaciones se observan entre las distintas poblaciones.

Algunos de los genes que se han visto asociados a numerosas enfermedades autoinmunes están incluidos en la siguiente tabla.

**Tabla 7.** Principales señales de asociaciones seleccionadas en las enfermedades autoinmunes.

Gen	Localización cromosómica	posible función y mecanismo de acción	Asociación
Activación de linfocitos y señalización intracelular			
HLA	6p21	Presentación del antígeno; señales que modulan finamente la presentación de antígenos	La mayoría de los trastornos autoinmunes
PTPN22	1p13	Modulación de la activación del receptor de linfocitos	DMT1, AR, LES, enfermedad de Graves, enfermedad de Crohn
CTLA4	2q33	Transmisión de señales inhibitoras en las células T	DMT1, AR, CD, alopecia areata
TAGAP	6q25	Expresión en células T activadas	AR, Crohn, CD, DMT1
PTPN2	18p11	Expresión en células T; papel en el crecimiento y la diferenciación celular	DMT1, Crohn, CD
TYK2	19p13	Quinasa Janus aguas abajo de los receptores de citoquinas	Psoriasis, DMT1, LES, Crohn, ME
TNFAIP3	6q23	Regulación de ubiquitinación; baja regulación de factor nuclear kappa B	AR, LES
TNIP1	5q33	Regulación de la activación del factor nuclear kappa B	LES, psoriasis
PRKCQ	10p15	Activación de células T y señalización	DMT1, AR
Citoquinas y receptores de citoquinas			
IL23R	1p31	Selección de subconjuntos de células, incluyendo Th17; múltiple señales de asociación	Crohn, CU, psoriasis, espondilitis anquilosante, cirrosis biliar primaria
IL2RA	10p15	Uno de los componentes de la IL-2 señalización del receptor	DMT1, ME, AR, Crohn, vitiligo, alopecia areata
IL-2/IL21	4q26	Factores de crecimiento de células T; múltiples asociaciones que flanquean ambas citocinas	CD, Crohn, CU, AR, DMT1
IL7R	5p13	Diferenciación y activación de las células T afectadas por la IL-7	ME, cirrosis biliar primarias, alopecia areata
IL12B	5q33	Subunidad común a la IL-12 y la IL-23	Crohn, UC, psoriasis, LES
IL10	1q32	Regulación de las citoquinas, MHC de clase II y moléculas co-estimuladoras	LES, DMT1, Crohn, UC
Inmunidad innata y reconocimiento microbiano			
IRF5	7q32	Inducción de interferones	LES, AR, cirrosis biliar primaria, ES
IFIH1	2q24	Reconocimiento de ARN de picornavirus	DMT1, psoriasis, deficiencia selectiva de IgA
Factores de transcripción			
STAT4	2q32	Mediación de múltiples señales de citoquinas, incluyendo la IL-12	LES, AR, cirrosis biliar primaria, ES
STAT3	17q21	Mediación de múltiples señales de citoquinas	Crohn, ME
Otras vías o mecanismos			
FCGR2A	1p23	Receptor de superficie celular en las células fagocíticas	LES, AR, UC
CCR6	6q27	Expresión en células dendríticas inmaduras y células T memoria	Crohn, AR, Graves, vitiligo
ITGAM	16p11	Adhesión de leucocitos; cambio de aminoácido implicado como un alelo causal	LES
UBASH3A	21q22	Asociación con la ubiquitina y la proteína que contiene el dominio SH3	DMT1, AR, CD
UBE2L3	22q11	Enzima de conjugación de ubiquitina	AR, CD, LES

Para una mejor comprensión es conveniente dividir el sistema inmunológico en los sistemas innatos y adaptativos, aunque en realidad están altamente integrados y son interdependientes. El sistema inmune innato es filogenéticamente más antigua y está diseñado para la participación inmediata de los agentes patógenos por un conjunto altamente conservados de los receptores de reconocimiento de patrones, como los receptores TLR, junto con una respuesta defensiva inmediata de la célula. En contraste, el sistema inmune adaptativo se compone principalmente de células T y B, que utilizan sistemas de receptores altamente diversos seleccionados somáticamente del reconocimiento del antígeno (receptor de células T y la inmunoglobulina de superficie, respectivamente) que puede reconocer millones de antígenos extraños distintas, y por la formación de la memoria inmunológica. Las células autorreactivas B y T que son un componente normal del sistema inmune y se mantienen bajo control por una variedad de mecanismos, muchos de los cuales parecen ser alterados por loci genéticos implicados en la autoinmunidad. Algunos son mecanismos centrales en el timo y la médula ósea que elimina o deshabilita clones que reaccionan espontáneamente; otros incluyen células reguladoras especializadas, como las células T reguladoras.

Se ha demostrado que muchas de las enfermedades relacionadas con la inmunidad no sólo se caracterizan por un alto número de células T sino también por un desequilibrio en los subconjuntos de células T. Este desequilibrio se podría explicar en cierta medida por un efecto genético en la diferenciación de células T. La mayoría de los genes que estaban identificados están involucrados específicamente en la diferenciación de las células Th1, células Th17 y células T reguladoras ( $T_{reg}$ ).

La IL23R y la IL21 están asociadas con casi todas las enfermedades relacionadas con la inmunidad, un alelo de IL23R se ha asociado con la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, y otro alelo se ha asociado con psoriasis [186-188].

Esta asociación podría deberse al efecto de diferentes variantes causales en diferentes haplotipos o una diferencia biológica en la función de IL-23 y la señalización de IL-23R en las diferentes enfermedades. Por ejemplo, la IL-23 estimula la supervivencia y la proliferación de las células Th17, y por lo tanto sirve como un regulador clave de citoquinas. El efecto de la variante IL23R en células Th17 pueden ser beneficiosos o perjudicial, dependiendo de la enfermedad.

Así, la IL-23 [189] se ha visto asociada en varias enfermedades autoinmunes, incluyendo modelos de ratón de esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis inducida por colágeno, y dermatitis [190].

Por otro lado, no es sorprendente que muchas de las asociaciones genéticas más fuertes estén implicadas en las vías de las citoquinas. Por ejemplo, la IL-2 y su receptor (codificado por IL2RA, IL2RB e IL2RG) son cruciales para la activación y función de las células T reguladoras, y en la prevención del desarrollo de la autoinmunidad. Así, los marcadores genéticos del gen que codifica la IL-2 han demostrado asociación con la enfermedad celíaca [191], colitis ulcerosa [192] artritis reumatoide y diabetes de tipo 1 [193].

Mientras que, el papel de IL2RA en la autoinmunidad ha sido corroborado por las asociaciones entre el locus y enfermedades tales como la diabetes tipo 1, la esclerosis múltiple [194, 195] artritis reumatoide [196], y enfermedad de Crohn [197].

La IL2RA y el locus que incluye IL2 e IL21 [191, 194, 198-201] alteran las funciones de las células Treg y predisponer a la autoinmune. También se han observado altos niveles de IL - 21 en los intestinos de los pacientes con enfermedad celíaca y la enfermedad de Crohn [202, 203].

Cada vez hay más evidencia de que las células Treg están menos activas en enfermedades inmunes crónicas [204, 205] mientras que el receptor de IL-2. Una deficiencia combinada de IL2RA y CTLA4 en ratones causa enfermedad autoinmune severa [206, 207].

Otros ejemplos de genes que se han visto asociados a múltiples enfermedades autoinmunes son los genes CTLA4 y PTPN22 [186, 200, 208-210].

El cambio causal en la fosfatasa intracelular *PTPN22*, debido a una sustitución específica de aminoácidos (arginina por triptófano) en la posición 620 de la proteína, es un factor de riesgo para la diabetes tipo 1 [211] y la artritis reumatoide [212], entre otras, pero también confiere protección contra la enfermedad de Crohn [213] y al mismo tiempo, no tiene efecto sobre el riesgo de esclerosis múltiple [214].

Este cambio de aminoácidos interrumpe la unión entre PTPN22 y una quinasa intracelular llamada Csk, y esto a su vez altera la capacidad de respuesta de los receptores de ambas células T y B. Los ratones que carecen PTPN22 han aumentado de manera espectacular la activación de las células T



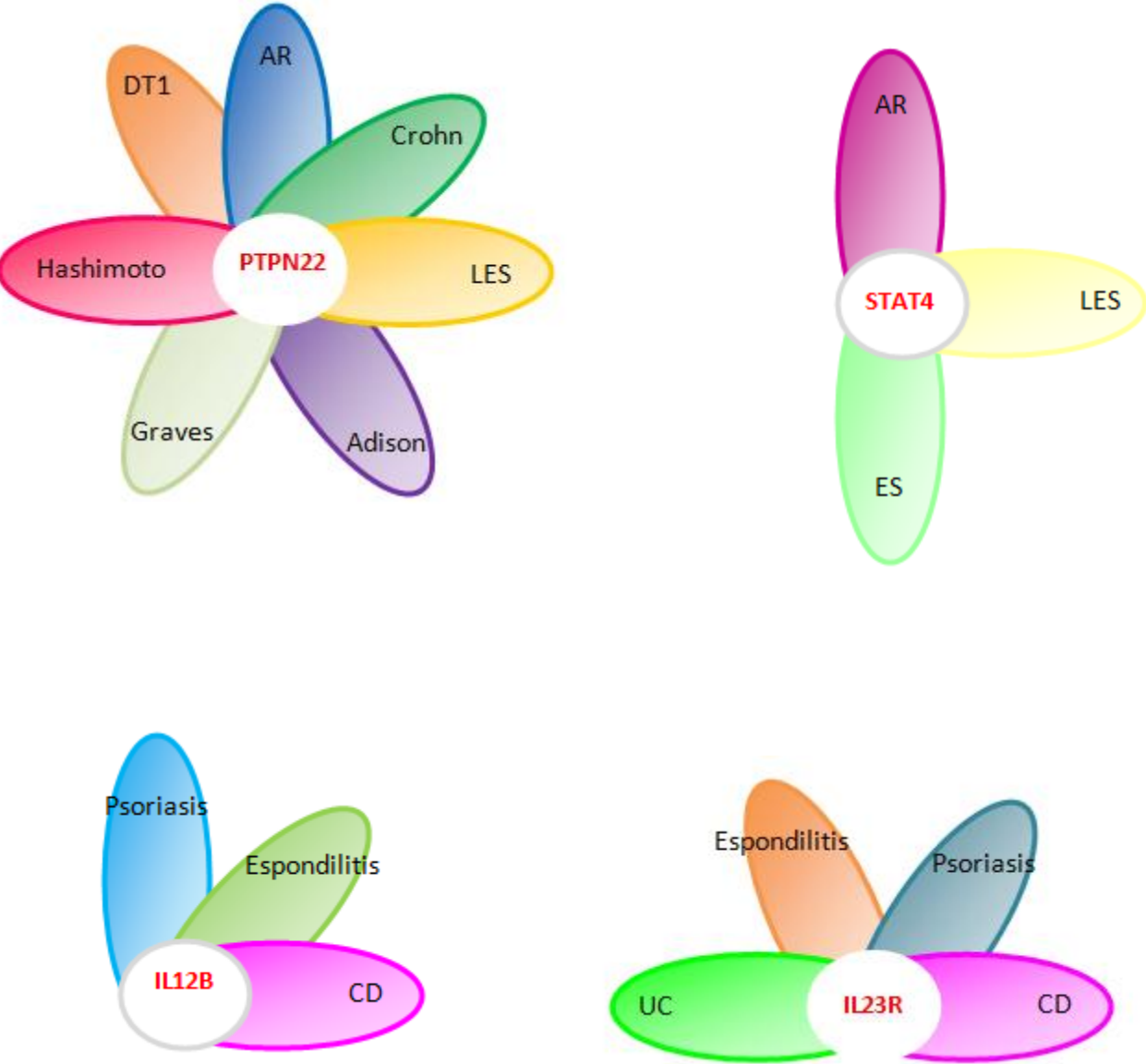
[215] y datos recientes indican que un fenotipo similar de mayor capacidad de respuesta de linfocitos está asociada con el alelo de riesgo PTPN22 [216, 217].

Por lo tanto, la genética de PTPN22 muestra el profundo efecto de los cambios sutiles en los umbrales intracelulares de señalización sobre la susceptibilidad a enfermedades relacionadas con la inmunidad [218].

IRF5 está involucrada en la vía del IFN $\alpha$ , y está asociado con varias enfermedades autoinmune e inflamatorias. De modo que se ha visto que hay asociaciones genéticas entre el aumento de la expresión de IRF5 y LES, AR [219] y cirrosis biliar primaria [220, 221].

De igual modo, se ha puesto de manifiesto que TNFAIP3 que codifica la proteína A20, la cual es requerida para la terminación del factor nuclear kappa B (NF-kB) [222]. La deficiencia genética de A20 en ratones conduce a la activación persistente de NF-kB, [223, 224] y la pérdida de A20 disminuye la tolerancia del sistema inmune innato [225]. TNFAIP3 se asocia con LES [226], AR [227] y la enfermedad celíaca [228].

Figura 8. Representación esquemática de genes asociados con enfermedades autoinmunes.



### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue identificar nuevos marcadores de riesgo genético a la ACG, con el propósito de obtener un mejor conocimiento de las bases moleculares que subyacen en la susceptibilidad y principales manifestaciones clínicas de dicha enfermedad. El hecho de poder definir marcadores genéticos implicados en la predisposición a la arteritis de células gigantes y/o a sus manifestaciones clínicas permitiría la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

Para llevar a cabo este objetivo, la estrategia usada fue el estudio de asociación de genes candidatos funcionales empleando la metodología de casos-controles poblacional.

Los genes estudiados se seleccionaron según su implicación funcional en la fisiopatología de la ACG. Se seleccionaron genes implicados en el proceso inflamatorio, ya que se trata básicamente de una enfermedad inflamatoria de los vasos sanguíneos, que afecta a las arterias de mediano y gran tamaño, preferentemente aquellas del arco aórtico con distribución extracraneal, en especial la arteria temporal, también se seleccionaron genes que se han visto que están asociadas a otras enfermedades autoinmunes con las que ACG comparte vías inmunológicas comunes. Teniendo en cuenta esto, fueron seleccionados los siguientes genes: *ITGAM*, *CD226*, *TRAF6*, *CCR6*, *NLRP1*, *CSK* y *PTPN22*.

Los objetivos específicos para este trabajo fueron los siguientes:

1. Evaluar la posible asociación del polimorfismo rs1143679 del gen *ITGAM* en la predisposición genética a la ACG.
2. Estudiar el papel de los SNPs rs34794968, rs763361 y rs727088 de la región génica *CD226* en la susceptibilidad a la ACG en nuestra población.
3. Investigar si el polimorfismo rs540386 del gen *TRAF6* se encuentra asociado a la ACG.
4. Comprobar si el polimorfismo rs3093024 del gen *CCR6* puede estar implicado en la susceptibilidad a la ACG.
5. Determinar la influencia del polimorfismo rs8182352 del gen *NLRP1* en la susceptibilidad y/o manifestaciones clínicas de la ACG.
6. Analizar el papel de los genes *PTPN22* y *CSK* previamente asociados con la autoinmunidad, en la predisposición y fenotipos clínicos de la ACG.

#### 4. ANEXO PUBLICACIONES

# A Nonsynonymous Functional Variant of the *ITGAM* Gene Is Not Involved in Biopsy-proven Giant Cell Arteritis

F. DAVID CARMONA, AURORA SERRANO, LUIS RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, SANTOS CASTAÑEDA, JOSÉ A. MIRANDA-FILLOY, INMACULADA C. MORADO, JAVIER NARVÁEZ, ROSER SOLANS, BERNARDO SOPEÑA, BEGOÑA MARÍ-ALFONSO, AINHOA UNZURRUNZAGA, NORBERTO ORTEGO-CENTENO, RICARDO BLANCO, EUGENIO DE MIGUEL, ANA HIDALGO-CONDE, JAVIER MARTÍN, and MIGUEL A. GONZÁLEZ-GAY

**ABSTRACT. Objective.** To investigate whether a functional integrin alpha M (*ITGAM*) variant is involved in susceptibility to and clinical manifestations of giant cell arteritis (GCA).

**Methods.** A Spanish cohort of 437 white patients with biopsy-proven GCA and 1388 healthy controls were genotyped using the TaqMan allele discrimination technology.

**Results.** No association was observed between *ITGAM* rs1143679 and GCA ( $p = 0.80$ , OR 0.97). Similarly, subphenotype analyses did not yield significant differences between the case subgroups and the control set or between GCA patients with or without the main specific features of GCA.

**Conclusion.** Our results suggest that the *ITGAM* rs1143679 variant does not play an important role in the pathophysiology of GCA. (First Release Oct 1 2011; *J Rheumatol* 2011;38:2598–601; doi:10.3899/jrheum.110685)

*Key Indexing Terms:*

GIANT CELL ARTERITIS  
SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISM

TEMPORAL ARTERITIS  
*ITGAM* rs1143679

Integrin alpha M (*ITGAM*) encodes the alpha subunit of the  $\alpha$ M $\beta$ 2-integrin. A nonsynonymous single-nucleotide polymorphism (SNP) at exon 3 of the *ITGAM* gene, rs1143679, produces a functional modification in the protein by changing the 77th amino acid residue arginine to histidine (R77H). This genetic variant has been reported to be one of the signals most highly associated with systemic lupus erythematosus (SLE),

and the most likely causal polymorphism within the *ITGAM* region in several populations of different ethnicity<sup>1,2</sup>. There is evidence suggesting that *ITGAM* rs1143679 is also involved in the pathogenesis of systemic sclerosis (SSc)<sup>3</sup>.

Giant cell arteritis (GCA) is a complex polygenic autoimmune disease characterized by inflammatory lesions of blood vessels, mainly involving medium- and large-size arteries. It

From the Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada; Department of Rheumatology, Hospital Clínico San Carlos, Madrid; Department of Rheumatology, Hospital de la Princesa, IIS-Princesa, Madrid; Department of Rheumatology, Hospital Xeral-Calde, Lugo; Department of Rheumatology, Hospital Universitario de Bellvitge-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona; Department of Internal Medicine, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona; Thrombosis and Vasculitis Unit, Department of Internal Medicine, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Vigo; Department of Internal Medicine, Corporació Sanitaria Parc Taulí, Instituto Universitario Parc Taulí, UAB, Sabadell, Barcelona; Department of Internal Medicine, Hospital de Galdakano, Vizcaya; Department of Internal Medicine, Hospital Clínico San Cecilio, Granada; Department of Rheumatology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, IFIMAV, Santander; Department of Rheumatology, Hospital Universitario de La Paz, Madrid; and Department of Internal Medicine, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, Spain.

Supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias, grants PI06-0024 and PS09/00748 (Spain), and by RETICS Program RD08/0075 (RIER) from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). F.D. Carmona was supported by Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) through the JAE-DOC program.

F.D. Carmona, PhD; A. Serrano, BSc, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC; L. Rodríguez-Rodríguez, MD, Department of Rheumatology, Hospital Clínico San Carlos; S. Castañeda, MD, PhD, Department of Rheumatology, Hospital de la Princesa, IIS-Princesa; J.A. Miranda-Filloy, MD, Department of Rheumatology,

Hospital Xeral-Calde; I.C. Morado, MD, Department of Rheumatology, Hospital Clínico San Carlos; J. Narváez, MD, PhD, Department of Rheumatology, Hospital Universitario de Bellvitge-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat; R. Solans, MD, PhD, Department of Internal Medicine, Hospital Vall d'Hebron; B. Sopena, MD, PhD, Thrombosis and Vasculitis Unit, Department of Internal Medicine, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo; B. Marí-Alfonso, MD, Department of Internal Medicine, Corporació Sanitaria Parc Taulí, Instituto Universitario Parc Taulí, UAB; A. Unzurrunzaga, MD, Department of Internal Medicine, Hospital de Galdakano; N. Ortego-Centeno, MD, Department of Internal Medicine, Hospital Clínico San Cecilio; R. Blanco, MD, PhD, Department of Rheumatology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, IFIMAV; E. de Miguel, MD, PhD, Department of Rheumatology, Hospital Universitario de La Paz; A. Hidalgo-Conde, MD, Department of Internal Medicine, Hospital Universitario Virgen de la Victoria; J. Martín, MD, PhD, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC; M.A. González-Gay, MD, PhD, Department of Rheumatology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, IFIMAV.

F.D. Carmona and A. Serrano share first authorship, and M.A. González-Gay and J. Martín share senior authorship of this report.

Address correspondence to F.D. Carmona, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n 18100-Armilla, Granada, Spain.

E-mail: dcarmona@ipb.csic.es

Accepted for publication July 21, 2011.

represents the most common vasculitis in elderly individuals from Western countries<sup>4</sup>.

Accumulation of polyclonal T lymphocytes in the arterial lesions has been observed in patients with GCA, and it was hypothesized that integrin-type adhesion receptors may play a key role in this process<sup>5</sup>. Our objective was to determine whether the *ITGAM* functional polymorphism rs1143679 is implicated in the genetic susceptibility and specific clinical features of GCA.

## MATERIALS AND METHODS

**Study population.** A Spanish cohort of 437 white patients with GCA and 1388 unrelated healthy controls recruited in the same geographic areas and matched by age, sex, and ethnicity was analyzed. All patients had a positive temporal artery biopsy<sup>6</sup> and fulfilled the 1990 American College of Rheumatology classification criteria for GCA<sup>7</sup>. Table 1 shows their main clinical characteristics, as defined<sup>6,8</sup>.

Written informed consent from subjects and approval of the local ethical committees were obtained.

**Genotyping methods.** DNA was extracted from peripheral blood cells using standard procedures. All participants were genotyped for the *ITGAM* variant rs1143679 using the TaqMan allele discrimination assay technology (assay ID: C\_2847895\_1\_) in a 7900HT Fast Real-time polymerase chain reaction system, both from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

**Statistical analysis.** The overall statistical power of the analysis was 70% to detect associations, with OR = 1.3 at the 5% significance level, according to Power Calculator for Genetic Studies 2006 software (Center for Statistical Genetics, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA; Website: <http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/CaTS/>). Plink (v1.07; Center for Human Genetic Research, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA; Website: <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) was used to perform 2x2 contingency tables and chi-square test and/or Fisher's exact test. OR and 95% CI were obtained according to Woolf's method. P values < 0.05 were considered statistically significant.

**Table 1.** Main clinical features of 437 white Spanish patients with biopsy-proven giant cell arteritis (GCA). The control group included in the analysis with this GCA cohort was composed of 825 women (59.4%) and 563 men (40.6%).

Feature	Number (%)
Age at diagnosis, yrs, median (IQR)	75 (69–79)
Women	288 (65.8)
Men	149 (34.2)
Headache	348 (83.9)
Abnormal temporal artery on examination	256 (63.7)
Polymyalgia rheumatica	208 (48.6)
Jaw claudication	184 (43.6)
Arm-leg claudication	26 (6.2)
Visual ischemic manifestations*	111 (26.1)
Permanent visual loss	49 (11.6)
Stroke	19 (4.6)
Severe ischemic manifestations**	217 (51.3)
Irreversible occlusive disease†	82 (19.7)

\* Transient visual loss including amaurosis fugax, permanent visual loss, or diplopia<sup>6</sup>. \*\* At least one of the following: visual manifestations, cerebrovascular accidents (stroke and/or transient ischemic attacks), jaw claudication, or limb claudication<sup>6</sup>. † At least one of the following: permanent visual loss, stroke, and/or occlusive disease in the extremities<sup>8</sup>. IQR: interquartile range.

## RESULTS

No divergence from Hardy-Weinberg equilibrium was observed ( $p < 0.05$ ) in controls or cases, and control allele frequencies were similar to those reported in the white European population<sup>9</sup>.

Table 2 shows the genotype and minor allele frequencies of the control cohort and the different case sets. No significant differences were detected between the allele frequencies of the patients with biopsy-proven GCA and the control group ( $p = 0.80$ , OR 0.97). To test for a possible gender-specific association, the female patients with GCA ( $n = 288$ ) were compared with female controls ( $n = 825$ ). No association of this polymorphism was observed in women ( $p = 0.65$ , OR 1.06).

GCA patients were further subdivided into those positive for polymyalgia rheumatica (PMR), visual ischemic manifestations (VIM), severe ischemic manifestations (SIM), and irreversible occlusive disease (IOD). However, analysis of data stratified according to the different phenotypes of clinical expression of this vasculitis revealed no significant heterogeneity between the GCA subgroups and the control population (PMR-positive vs controls,  $p = 0.71$ , OR 0.95; VIM-positive vs controls,  $p = 0.58$ , OR 0.89; SIM-positive vs controls,  $p = 0.75$ , OR 0.95; IOD-positive vs controls,  $p = 0.61$ , OR 0.89). Similar negative results were also observed when GCA patients with and without specific clinical disease features were compared to one another (Table 3). Finally, no significant deviation in genotype frequencies was evident in any of the comparisons above (data not shown).

## DISCUSSION

Shared immunological pathways have been proposed to underlie different autoimmune conditions<sup>10</sup>. *ITGAM* rs1143679 has been associated with other autoimmune diseases, including SLE and SSc<sup>1,2,3</sup>. Previous studies in SLE predicted that the R77H substitution caused by this nonsynonymous SNP alter the structure and function of this integrin, and may contribute to endothelial injury and impairment of immune complex clearance in patients with SLE<sup>11,12</sup>. Because integrin molecules have been proposed to be crucial in the vasculopathy of GCA<sup>5</sup>, *ITGAM* represented a good susceptibility candidate locus for investigation. The power of this study and the differences in the effect magnitude between SSc and SLE make it difficult to draw definitive conclusions. However, considering the well-defined clinical cohort we analyzed, and that our statistical analysis had enough power to detect a possible moderate signal, it is unlikely that this gene may play a relevant role in GCA.

Recent studies in rheumatoid arthritis (RA) also described a lack of association with rs1143679<sup>13</sup>. It could be speculated that common pathways involving the  $\alpha$ M $\beta$ 2-integrin were restricted to specific subgroups of patients with RA and/or GCA that share more similarity with SLE and SSc. For instance, variation in the *IRF5* gene has been associated with a subgroup of RA cases (not clearly delimited to date) with a

Table 2. Genotype and allele distribution of *ITGAM* rs1143679 in patients with biopsy-proven giant cell arteritis (GCA) and healthy controls.

Sample	Genotype, N (%)			MAF, %	p	Allelic Model OR (95% CI)
	AA	GA	GG			
Controls, n = 1388	36 (2.59)	341 (24.57)	1011 (72.84)	14.88		
GCA, n = 437	8 (1.83)	111 (25.40)	318 (72.77)	14.53	0.801	0.97 (0.78–1.21)
PMR, n = 208	3 (1.44)	53 (25.48)	152 (73.08)	14.18	0.710	0.95 (0.70–1.27)
VIM, n = 111	1 (0.90)	28 (25.23)	82 (73.87)	13.51	0.582	0.89 (0.60–1.33)
SIM, n = 217	3 (1.38)	56 (25.81)	158 (72.81)	14.29	0.747	0.95 (0.71–1.27)
IOD, n = 82	1 (1.22)	20 (24.39)	61 (74.39)	13.41	0.608	0.89 (0.59–1.41)

p values and OR were obtained from comparison of the different disease groups versus controls. \* OR for the minor allele. MAF: minor allele frequency; PMR: polymyalgia rheumatica; VIM: visual ischemic manifestations; SIM: severe ischemic manifestations; IOD: irreversible occlusive disease.

Table 3. Genotype distribution and minor allele frequency (MAF) of *ITGAM* rs1143679 in patients with biopsy-proven giant cell arteritis (GCA) according to presence or absence of specific disease manifestations.

Manifestation	With Manifestations		Without Manifestations		p	Allelic Model OR (95% CI)*
	Genotypic Frequencies	MAF, %	Genotypic Frequencies	MAF, %		
Polymyalgia rheumatica	3/53/152	14.18	5/57/158	15.23	0.67	0.92 (0.63–1.34)
Visual ischemic manifestations	1/28/82	13.51	7/81/226	15.13	0.56	0.88 (0.56–1.36)
Severe ischemic manifestations	3/56/158	14.29	5/52/149	15.05	0.75	0.94 (0.64–1.38)
Irreversible occlusive disease	1/20/61	13.41	7/88/239	15.27	0.55	0.86 (0.52–1.41)

\* OR for the minor allele.

pattern of association very similar to that described in patients with SLE<sup>14</sup>; no association of *IRF5* rs2004640 and CGGGG insertion/deletion gene polymorphisms in the susceptibility to and clinical expression of GCA was described<sup>15</sup>. It should be noted that, despite not achieving statistical significance, all the OR that we observed were in the same direction; this might suggest a hypothetical role of *ITGAM* in a specific subgroup of patients that could not be categorized using the current definitions to describe the clinical features of GCA. However, the direction of the OR was the opposite of those reported for SLE and SSc<sup>1,2,3</sup> and thus the previous assumption does not seem feasible. Another possibility could be that this gene is only weakly involved in predisposition to GCA, and the lack of high power of our study (e.g., > 90% to detect associations with OR = 1.2) did not make it possible to observe statistical significance. Further studies are needed to clarify whether the non-synonymous change caused by *ITGAM* rs1143679 is a key event in the development of autoimmunity or if it is only associated with some SLE-related manifestations.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Sofía Vargas, Sonia García, and Gema Robledo for their excellent technical assistance, and all the patients and controls for kindly providing their essential collaboration. We thank Banco Nacional de ADN (University of Salamanca, Spain) for supplying part of the control material.

## REFERENCES

- Nath SK, Han S, Kim-Howard X, Kelly JA, Viswanathan P, Gilkeson GS, et al. A nonsynonymous functional variant in integrin- $\alpha$ (M) (encoded by *ITGAM*) is associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2008;40:152-4.
- Han S, Kim-Howard X, Deshmukh H, Kamatani Y, Viswanathan P, Guthridge JM, et al. Evaluation of imputation-based association in and around the integrin- $\alpha$ -M (*ITGAM*) gene and replication of robust association between a non-synonymous functional variant within *ITGAM* and systemic lupus erythematosus (SLE). *Hum Mol Genet* 2009;18:1171-80.
- Carmona FD, Simeon CP, Beretta L, Carreira P, Vonk MC, Rios-Fernandez R, et al. Association of a non-synonymous functional variant of the *ITGAM* gene with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2011 May 13 [E-pub ahead of print].
- Gonzalez-Gay MA, Amoli MM, Garcia-Porrúa C, Ollier WE. Genetic markers of disease susceptibility and severity in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Semin Arthritis Rheum* 2003;33:38-48.
- Schaufelberger C, Stemme S, Andersson R, Hansson GK. T lymphocytes in giant cell arteritic lesions are polyclonal cells expressing alpha beta type antigen receptors and VLA-1 integrin receptors. *Clin Exp Immunol* 1993;91:421-8.
- Gonzalez-Gay MA, Lopez-Díaz MJ, Barros S, García-Porrúa C, Sánchez-Andrade A, Paz-Carreira J, et al. Giant cell arteritis: laboratory tests at the time of diagnosis in a series of 240 patients. *Medicine* 2005;84:277-90.
- Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, Stevens MB, Arend WP, Calabrese LH, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1122-8.
- Rueda B, Lopez-Nevot MA, Lopez-Díaz MJ, Garcia-Porrúa C, Martín J, Gonzalez-Gay MA. A functional variant of vascular endothelial growth factor is associated with severe ischemic complications in giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2005;32:1737-41.
- Suarez-Gestal M, Calaza M, Endreffy E, Pullmann R, Ordi-Ros J, Sebastiani GD, et al. Replication of recently identified systemic lupus erythematosus genetic associations: a case-control study. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R69.

---

# Autoimmune disease-associated *CD226* gene variants are not involved in giant cell arteritis susceptibility in the Spanish population

---

A. Serrano<sup>1</sup>, F.D. Carmona<sup>1</sup>, J.A. Miranda-Fillooy<sup>2</sup>, S. Castañeda<sup>3</sup>,  
L. Rodríguez-Rodríguez<sup>4</sup>, I.C. Morado<sup>4</sup>, C. Gómez-Vaquero<sup>5</sup>, R. Solans<sup>6</sup>, B. Sopena<sup>7</sup>,  
R. Blanco<sup>8</sup>, A. Unzurrunzaga<sup>9</sup>, N. Ortego-Centeno<sup>10</sup>, B. Marí-Alfonso<sup>11</sup>, E. de Miguel<sup>12</sup>,  
A. Hidalgo-Conde<sup>13</sup>, J. Martín<sup>1</sup>, M.A. González-Gay<sup>8</sup>

---

<sup>1</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada; <sup>2</sup>Dept. of Rheumatology, Hospital Xeral-Calde, Lugo; <sup>3</sup>Dept. of Rheumatology, Hospital de la Princesa, IIS-Princesa, Madrid; <sup>4</sup>Dept. of Rheumatology, Hospital Clínico San Carlos, Madrid; <sup>5</sup>Dept. of Rheumatology, Hospital Universitario de Bellvitge-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona; <sup>6</sup>Dept. of Internal Medicine, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona; <sup>7</sup>Thrombosis and Vasculitis Unit, Dept. of Internal Medicine, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Vigo; <sup>8</sup>Dept. of Rheumatology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, IFIMAV, Santander; <sup>9</sup>Dept. of Internal Medicine, Hospital de Galdakano, Vizcaya; <sup>10</sup>Dept. of Internal Medicine, Hospital Clínico San Cecilio, Granada; <sup>11</sup>Dept. of Internal Medicine, Corporació Sanitaria Parc Taulí, Institut Universitari Parc Taulí, UAB, Sabadell, Barcelona; <sup>12</sup>Dept. of Rheumatology, Hospital Universitario de La Paz, Madrid; <sup>13</sup>Dept. of Internal Medicine, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, Spain.

Aurora Serrano, F. David Carmona, José A. Miranda-Fillooy, Santos Castañeda, Luis Rodríguez-Rodríguez, Inmaculada C. Morado, Carmen Gómez-Vaquero, Roser Solans, Bernardo Sopena, Ricardo Blanco, Ainhoa Unzurrunzaga, Norberto Ortego-Centeno, Begoña Marí-Alfonso, Eugenio de Miguel, Ana Hidalgo-Conde, Javier Martín, Miguel A. González-Gay

Please address correspondence to:  
Javier Martín, MD, PhD,  
Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, IPBLN-CSIC,  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n 18100 Armilla (Granada), Spain.  
E-mail: martin@ipb.csic.es

Received on September 8, 2011; accepted in revised form on December 13, 2011.

© Copyright CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2012.

**Key words:** GCA, temporal arteritis, SNP, *CD226*, rs727088, rs34794968, rs763361

Competing interests: none declared.

## ABSTRACT

**Objectives.** *CD226* genetic variants have been associated with a number of autoimmune diseases. The aim of this study was to investigate the potential implication of the *CD226* loci in the susceptibility to and main clinical manifestations of giant cell arteritis (GCA). **Methods.** A Spanish Caucasian cohort of 455 patients diagnosed with biopsy-proven GCA and 1414 healthy controls were included in the study. Three *CD226* polymorphisms, rs727088, rs34794968 and rs763361, were genotyped using the TaqMan<sup>®</sup> allelic discrimination technology. PLINK software was used for the statistical analyses.

**Results.** No significant association between the *CD226* polymorphisms and susceptibility to GCA was found (rs727088:  $p=0.92$ ,  $OR=1.01$ ,  $CI$  95% 0.86–1.18; rs34794968:  $p=0.61$ ,  $OR=1.04$ ,  $CI$  95% 0.89–1.22; rs763361:  $p=0.88$ ,  $OR=0.99$ ,  $CI$  95% 0.84–1.16). Similarly, when patients were stratified according to the specific clinical features of GCA such as polymyalgia rheumatica, visual ischaemic manifestations or irreversible occlusive disease, no association was observed either between the case subgroups and the control set or between GCA patients with and without the specific features of the disease. Furthermore, the haplotype analysis revealed no significant association with the clinical manifestations of the disease.

**Conclusion.** Our results show that the three *CD226* polymorphisms analysed do not play a relevant role in the susceptibility to GCA and clinical manifestations of this vasculitis.

## Introduction

*CD226*, also known as DNAX accessory molecule 1 (DNAM-1), PTA1, and

TLISA1, is a 67KDa type I membrane intracellular adhesion protein that belongs to the immunoglobulin superfamily (IgSF). It has only two immunoglobulin-like extracellular domains and it is constitutively expressed on the majority of natural killer cells, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell, monocytes, platelets and a subset of B-cells (1). *CD226* plays an important role in T-cell activation, differentiation and cytotoxicity, and is involved in adhesion of platelets and megakaryocytic cells to vascular endothelial cells (2, 3). *CD226* is involved in LFA-1-mediated costimulatory signals for triggering naive T-cell differentiation and proliferation (4). In addition, DNAM-1 is a tyrosinephosphorylated signal-transducing molecule that participates in primary adhesion during cytotoxic T-lymphocyte (CTL)-mediated cytotoxicity (5).

The *CD226* gene has been associated with multiple autoimmune diseases (6). A non-synonymous variant of *CD226* in exon 7, rs763361, predisposes to type 1 diabetes (T1D), coeliac disease (CED), multiple sclerosis (MS), autoimmune thyroid disease, rheumatoid arthritis (RA), Wegener's granulomatosis (WG), and, recently, systemic sclerosis (SSc) (7-10). Moreover, a three-variant haplotype in *CD226* comprising rs763361, rs34794968, and rs727088 (ATC), in the last exon of this gene, have been recently found to be associated with systemic lupus erythematosus (SLE) (11). Giant cell arteritis (GCA), also called temporal arteritis or Horton's arteritis, is a systemic vasculitis that affects vessels of medium and large calibre with a predisposition for the involvement of cranial arteries that supply the aortic arch especially extracranial territories, mainly branches of the external carotid (12, 13). GCA is the most common



**Table I.** Main clinical features of 455 Spanish Caucasian patients with biopsy-proven GCA.

Feature	Variable
Age at diagnosis, years, median (IQR)	75 (69–79)
Women	313 (68.8)
Men	142 (31.2)
Headache	359 (78.9)
Abnormal temporal artery on examination	265 (58.2)
Polymyalgia rheumatica	215 (47.3)
Jaw claudication	190 (41.8)
Arm-leg claudication	27 (5.9)
Visual ischaemic manifestations*	116 (25.5)
Permanent visual loss	49 (10.8)
Stroke	19 (4.2)
Severe ischaemic manifestations**	227 (49.9)
Irreversible occlusive disease***	83 (18.2)

IQR: interquartile range.

\*Transient visual loss including amaurosis fugax, permanent visual loss, or diplopia<sup>6</sup>.

\*\*At least one of the following features: visual manifestations, cerebrovascular accidents (stroke and/or transient ischemic attacks), jaw claudication, or limb claudication.

\*\*\*At least one of the following features: permanent visual loss, stroke and/or occlusive disease in the extremities.

vasculitis in elderly individuals and it is suffered mainly by women. It is also more prevalent in Caucasians, especially in populations of Scandinavian descent (14, 15).

The inflammatory activity of vascular

lesions in GCA is mediated by adaptive immune responses, with CD4<sup>+</sup> T-cells undergoing clonal expansion in the vessel wall and releasing interferon (IFN)- $\gamma$  (16). Cellular immune responses involving T-cells, antigen-presenting cells, and macrophages are fundamental elements in GCA. At least two distinct CD4 T-cell subsets promote vascular inflammation in GCA. In early disease, antigen presenting cells promote differentiation of Th17 as well as Th1 cells (18). Vascular lesions contain mainly T-cells that are activated, macrophages and multinucleated giant cells, so it was hypothesised that CD226, which is involved in adhesion and costimulation of T-cells, may play a key role in this process (18).

Taking this into account, along with the fact that shared immunological pathways have been proposed for the basis of the pathology of different autoimmune diseases (19), the aim of this study was to investigate the possible genetic association of CD226 with the susceptibility to GCA.

**Patients and methods**

*Study population*

Four hundred and fifty-five patients diagnosed with biopsy-proven GCA and

1414 unrelated healthy controls were included in this study, after obtaining informed written consent and approval from the local ethical committees.

The age at diagnosis of the biopsy-proven patients (median [IQR]) was 75 (69–79) years. Women with biopsy-proven GCA (313 [68.8%]) outnumbered men (142 [31.2%]). The median age of controls was 74 years (67% women). The main clinical features of this series of biopsy-proven GCA are shown in Table I.

All patients fulfilled the 1990 American College of Rheumatology criteria for the classification of GCA (20). Inclusion criteria (presence of pathological findings of biopsy-proven GCA in a temporal artery biopsy) (21) and clinical features of the patient population including headache, polymyalgia rheumatica (PMR), jaw claudication, peripheral arteriopathy manifested by arm or leg claudication, visual ischaemic manifestations (VIM), permanent visual loss, stroke, severe ischaemic manifestations (SIM – encompassing visual manifestations, cerebrovascular accidents, jaw claudication or limb claudication of recent onset), and the presence of irreversible occlusive disease (IOD – if patients experienced at

**Table II.** Genotype and allele distribution of CD226 rs727088, rs34794968 and rs763361 in biopsy-proven GCA patients and healthy controls.

SNP	1/2	Subgroup (n)	Genotype, n (%)			MAF (%)	Allele test	
			1/1	1/2	2/2		p-value <sup>#</sup>	OR [CI 95%] <sup>§</sup>
rs727088	G/A	Controls (n=1356)	301 (22.20)	661 (48.75)	394 (29.06)	46.57		
		GCA (n=402)	86 (21.39)	204 (50.75)	112 (27.86)	46.77	0.922	1.01 [0.86–1.18]
		PMR+ (n=194)	40 (20.62)	100 (51.55)	54 (27.84)	46.39	0.976	1.00 [0.75–1.32]
		VIM+ (n=104)	26 (25.00)	48 (46.15)	30 (28.85)	48.08	0.547	1.10 [0.80–1.52]
		SIM+ (n=198)	48 (24.24)	99 (50.00)	51 (25.76)	49.24	0.091	1.28 [0.96–1.69]
		IOD+ (n=73)	19 (26.03)	34 (46.58)	20 (27.40)	49.32	0.402	1.17 [0.81–1.67]
rs34794968	A/C	Controls (n=1377)	230 (16.70)	644 (46.77)	503 (36.53)	40.09		
		GCA (n=398)	71 (17.84)	185 (46.48)	142 (35.68)	41.08	0.615	1.04 [0.89–1.22]
		PMR+ (n=189)	31 (16.40)	89 (47.09)	69 (36.51)	39.95	0.669	0.94 [0.71–1.25]
		VIM+ (n=100)	19 (19.00)	46 (46.00)	35 (35.00)	42.00	0.620	1.09 [0.78–1.51]
		SIM+ (n=199)	40 (20.10)	93 (46.73)	66 (33.17)	43.47	0.079	1.30 [0.97–1.73]
		IOD+ (n=74)	13 (17.57)	35 (47.30)	26 (35.14)	41.22	0.798	1.05 [0.73–1.51]
rs763361	T/C	Controls (n=1342)	298 (22.21)	640 (47.69)	404 (30.10)	46.05		
		GCA (n=399)	83 (20.80)	199 (49.87)	117 (29.32)	45.74	0.877	0.99 [0.84–1.16]
		PMR+ (n=193)	39 (20.21)	97 (50.26)	57 (29.53)	45.34	0.984	1.00 [0.75–1.32]
		VIM+ (n=101)	24 (23.76)	46 (45.54)	31 (30.69)	46.53	0.659	1.08 [0.78–1.48]
		SIM+ (n=194)	49 (25.26)	91 (46.91)	54 (27.84)	48.71	0.047*	1.33 [1.00–1.78]
		IOD+ (n=73)	19 (26.03)	32 (43.84)	22 (30.14)	47.95	0.441	1.15 [0.80–1.66]

\*Benjamini and Hochberg (1995) step-up FDR correction: p=0.091.

<sup>#</sup>All p-values have been calculated for the allelic model. <sup>§</sup>Odds ratio for the minor allele. MAF: minor allele frequency; GCA: giant cell arteritis; PMR: polymyalgia rheumatica; VIM: visual ischaemic manifestations; SIM: severe ischaemic manifestations; IOD: irreversible occlusive disease.

**Table III.** Genotype distribution and minor allele frequency (MAF) of *CD226* rs727088, rs34794968 and rs763361 in biopsy-proven GCA patients according to the presence (with) or absence (without) of specific manifestations of the disease.

		With		Without		Test statistic	
		Genotypic frequencies	MAF (%)	Genotypic frequencies	MAF (%)	<i>p</i> -value <sup>#</sup>	OR [95% CI] <sup>§</sup>
rs727088	Polymyalgia rheumatica	40/100/54	46.39	43/100/57	46.5	0.976	1.00 [0.75–1.32]
	Visual ischaemic manifestations	26/48/30	48.08	57/148/82	45.64	0.547	1.10 [0.80–1.52]
	Severe ischaemic manifestations	48/99/51	49.24	35/95/61	43.19	0.091	1.28 [0.96–1.69]
	Irreversible occlusive disease	19/34/20	49.32	62/157/90	45.47	0.402	1.18 [0.81–1.67]
rs34794968	Polymyalgia rheumatica	31/89/69	39.95	38/89/72	41.46	0.669	0.94 [0.71–1.25]
	Visual ischaemic manifestations	19/46/35	42.00	50/128/107	40.00	0.620	1.09 [0.78–1.51]
	Severe ischaemic manifestations	40/93/66	43.47	29/79/76	37.23	0.079	1.30 [0.97–1.73]
	Irreversible occlusive disease	13/35/26	41.22	54/134/114	40.07	0.798	1.05 [0.73–1.51]
rs763361	Polymyalgia rheumatica	39/97/57	45.34	41/96/59	45.41	0.984	1.00 [0.75–1.32]
	Visual ischaemic manifestations	24/46/31	46.53	56/143/86	44.74	0.659	1.08 [0.78–1.48]
	Severe ischaemic manifestations	49/91/54	48.71	31/96/63	41.58	0.047*	1.33 [1.00–1.78]
	Irreversible occlusive disease	19/32/22	47.95	59/152/93	44.41	0.441	1.15 [0.80–1.66]

\*Benjamini and Hochberg (1995) step-up FDR correction:  $p=0.091$ .

<sup>#</sup>All *p*-values have been calculated for the allelic model. <sup>§</sup>Odds ratio for the minor allele; MAF: minor allele frequency; GCA: giant cell arteritis.

least one of the following complications: permanent visual loss, stroke or limb claudication of recent onset), were described previously (22–26).

The control samples were obtained from the Spanish National Bank of DNA with the same criteria for sex and region of origin.

#### Genotyping methods and statistical analysis

DNA was extracted from peripheral blood cells using standard procedures. All participants were genotyped for the *CD226* single-nucleotide-polymorphisms (SNP), rs763361 and rs3479968, located in exon 7, and rs727088 in the 3'UTR region. The SNPs were analysed using the TaqMan<sup>®</sup> allelic discrimination assay technology in a 7900HT Real-Time polymerase chain reaction (PCR) System from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

The statistical power of the analysis was >93% to detect associations with OR=1.3 at 5% significant level for the three SNPs, according to Power Calculator for Genetic Studies 2006 software (27).

PLINK (v1.07) software (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) (28) was used for individual population association tests (significance was calculated by 2x2 contingency tables and Fisher's exact test or  $\chi^2$  when appropriate), and haplotype analysis. Odds ratios (OR) and 95% confidence inter-

vals (CI) were obtained according to Woolf's method. *p*-values lower than 0.05 were considered as statistically significant. Benjamini and Hochberg False Discovery Rate Method correction (FDR) was applied for multiple test correction (29).

We also analysed the *CD226* rs727088-rs34794968-rs763361 haplotype using PLINK and Haploview (v.4.2) (30). Allelic combinations with a frequency lower than 5% in control groups were excluded from the analysis.

#### Results

After genotyping, no evidence of departure from Hardy-Weinberg equilibrium was observed in either case or control populations at the 5% significance level.

Table II shows the genotype and minor allele frequencies (MAF) of the control cohort and the different case sets analysed. No significant differences were detected between the allele frequencies of the GCA patients and controls for the 3 SNPs.

To examine whether the *CD226* locus might influence the clinical manifestations of the disease or not, GCA patients were subdivided according to the presence of PMR, VIM, SIM and IOD. However, no significant differences were found for the analysis between the different case subgroups and the control population (Table II). Although

no significant differences were found, there was a trend when we compared SIM+ versus controls in the three SNPs analysed/studied.

Moreover, similar negative results were also observed when GCA patients with and without specific clinical features of the disease were compared (Table III). Considering the *CD226* haplotype block association described in SLE (11), we decided to analyse the possible effect of this haplotype in GCA patients. However, in this analysis, we did not observe significant association with GCA susceptibility (Table IV).

#### Discussion

*CD226* gene polymorphisms have been correlated with an increasing number of autoimmune diseases that often share some common pathogenic pathways (31). *CD226* plays an important role in T-cell activation, differentiation and cytotoxicity, and it is involved in adhesion of platelets and megakaryocytic cells to vascular endothelial cells (2, 3). Interestingly, the inflammatory activity of vascular lesions in GCA is mediated by adaptive immune responses, with CD4<sup>+</sup> T-cells (16, 18). There is an immune-mediating factor in the process of GCA, and both the innate immune system and the adaptive, are involved (32). Two pathogenic pathways mediated by Th17 and Th1 cells contribute to the systemic and vascular manifesta-

**Table IV.** Pooled-analysis of rs727088-rs34794968-rs763361 allelic combinations according to disease.

	Allelic combination		
	ACC	GAT	GCT
GCA, n (%)	1321 (53.9)	962 (39.2)	169 (6.9)
Controls, n (%)	374 (53.4)	285 (40.7)	42 (6.0)
<i>p</i> -value	0.888	0.710	0.323
OR [95% CI]	0.98 [0.83–1.16]	1.06 [0.89–1.26]	0.88 [0.62–1.24]
PMR+, n (%)	184 (54.1)	136 (40.0)	20 (5.9)
Controls, n (%)	1321 (53.9)	962 (39.2)	169 (6.9)
<i>p</i> -value	0.717	0.923	0.373
OR [95% CI]	1.01 [0.80–1.27]	1.03 [0.82–1.30]	0.88 [0.55–1.41]
VIM+, n (%)	93 (52.0)	76 (42.5)	10 (5.6)
Controls, n (%)	1321 (53.9)	962 (39.2)	169 (6.9)
<i>p</i> -value	0.877	0.630	0.538
OR [95% CI]	0.93 [0.68–1.25]	1.15 [0.84–1.56]	0.87 [0.46–1.65]
SIM+, n (%)	178 (51.6)	148 (42.9)	19 (5.5)
Controls, n (%)	1321 (53.9)	962 (39.2)	169 (6.9)
<i>p</i> -value	0.277	0.177	0.646
OR [95% CI]	0.91 [0.73–1.14]	1.17 [0.93–1.46]	0.82 [0.51–1.33]
IOD+, n (%)	69 (52.7)	53 (40.5)	9 (6.9)
Controls, n (%)	1321 (53.9)	962 (39.2)	169 (6.9)
<i>p</i> -value	0.603	0.648	0.889
OR [95% CI]	0.95 [0.67–1.35]	1.06 [0.74–1.51]	1.09 [0.55–2.15]

GCA: giant cell arteritis; PMR: polymyalgia rheumatica; VIM: visual ischaemic manifestations; SIM: severe ischaemic manifestations; IOD: irreversible occlusive disease.

tions of GCA (33). Similar to T1D, MS, RA and WG, in which distinct T-cell alterations are also common, *CD226* polymorphisms could predispose to the altered T-cell response in GCA (9).

As reported in RA, a chronic inflammatory autoimmune disease in which joints also show predominance of CD4<sup>+</sup> Th1 cells, environmental and genetic factors seem to contribute to the etiology of GCA (14, 34). Both RA and GCA are associated with increased inflammatory response and share association with HLA-DRB1\*04 alleles (35). Genome-wide association studies (GWAS) have identified shared non-HLA gene variants that influence susceptibility to unrelated to autoimmune diseases. Association of *CD226* rs763361 with RA has recently been described (6, 36).

Taking into account these considerations, an important step forward in our understanding of the pathogenesis of GCA might be to determine whether *CD226* is also a good susceptibility candidate locus to GCA or not. Therefore, we performed a case-control study to establish any genetic linkage of *CD226* with GCA. In this regard, our study constituted the first attempt to determine

the potential influence of three *CD226* genetic variants (rs763361, rs34794968 and rs727088) in both GCA susceptibility and phenotypic expression of this vasculitis. However, our data showed no significant association between the analysed *CD226* polymorphisms with disease susceptibility or with specific features of GCA, although trends of association between the three genetic variants and SIM were suggested. Considering that the study had enough power to detect a possible moderate signal, it is unlikely that this gene might play a relevant role in GCA.

The reasons for this discrepancy in terms of genetic association between two CD4 T + cell-mediated inflammatory diseases like RA and GCA are unknown. However, despite having similar HLA-DRB1\*04 association, former genetic studies did not disclose association of biopsy-proven GCA patients with non-*HLA* genes such as *PTPN22*, *STAT4* and *TRAF1/C5* that were associated with RA in independent Caucasians cohorts, including the Spanish population (37–43).

These negative results are in keeping with former studies of our group that

did not disclose association between polymorphisms in inflammatory pathway genes and biopsy-proven GCA (44–46). However, we cannot exclude that association between GCA and other *CD226* gene variants different from the polymorphisms assessed in the present study may exist.

In conclusion, although further studies in other populations with different genetic backgrounds are recommended to fully exclude an influence of the rs763361, rs34794968 and rs727088 *CD226* gene polymorphisms in GCA, our results suggest no evidence for a contribution of these *CD226* gene variants in the pathogenesis of GCA.

### Acknowledgements

The authors thank Gema Robledo, Sofía Vargas and Sonia Rodríguez for their excellent technical assistance, and all the patients and healthy controls for kindly accepting their essential collaboration. We also thank the Banco Nacional de ADN (University of Salamanca, Spain) for supplying the control material.

### Authors' contributions

Aurora Serrano and F. David Carmona contributed equally to this work. Javier Martín and Miguel A. González-Gay share senior authorship.

### Funding

This study was supported by 'Fondo de Investigaciones Sanitarias' through grants PI06-0024 and PS09/00748 (Spain), and partially supported by the RETICS Programme RD08/0075 (RIER) from the 'Instituto de Salud Carlos III' (ISCIII). FDCL was supported by Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) through the programme JAE-DOC.

### References

- XU Z, JIN B: A novel interface consisting of homologous immunoglobulin superfamily members with multiple functions. *Cell Mol Immunol* 2010; 7: 11–9.
- SHERRINGTON PD, SCOTT JL, JIN B *et al.*: TLIISA1 (PTA1) activation antigen implicated in T cell differentiation and platelet activation is a member of the immunoglobulin superfamily exhibiting distinctive regulation of expression. *J Biol Chem* 1997; 272: 21735–44.
- KOJIMA H, KANADA H, SHIMIZU S *et al.*:

- CD226 mediates platelet and megakaryocytic cell adhesion to vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 36748-53.
4. SHIBUYA K, SHIRAKAWA J, KAMEYAMA T *et al.*: CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte function-associated antigen 1 costimulatory signal for naive T cell differentiation and proliferation. *J Exp Med* 2003; 198: 1829-39.
  5. SHIBUYA A, CAMPBELL D, HANNUM C *et al.*: DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* 1996; 4: 573-81.
  6. HAFLE J, MAIER LM, COOPER JD *et al.*: CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases. *Genes Immun* 2009; 10: 5-10.
  7. TODD JA, WALKER NM, COOPER JD *et al.*: Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* 2007; 39: 857-64.
  8. MAITIAK, KIM-HOWARD X, VISWANATHAN P *et al.*: Non-synonymous variant (Gly307Ser) in CD226 is associated with susceptibility to multiple autoimmune diseases. *Rheumatology* 2010; 49: 1239-44.
  9. WIECZOREK S, HOFFMAN S, CHAN A *et al.*: Novel association of the CD226 (DNAM-1) Gly307Ser polymorphism in Wegener's granulomatosis and confirmation for multiple sclerosis in German patients. *Genes Immun* 2009; 10: 591-5.
  10. DIEUDE P, GUEDJ M, TRUCHETET ME *et al.*: Association of the CD226 Ser (307) variant with systemic sclerosis: evidence of a contribution of costimulation pathways in systemic sclerosis pathogenesis. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 1097-105.
  11. LOFGREN SE, DELGADO-VEGA AM, GALANT CJ *et al.*: A 3'-untranslated region variant is associated with impaired expression of CD226 in T and natural killer T cells and is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 3404-14.
  12. SALVARANI C, CANTINI F, BOIARDI L, HUNDER GG: Polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis. *N Engl J Med* 2002; 347: 261-71.
  13. GONZALEZ-GAY MA, VAZQUEZ-RODRIGUEZ TR, LOPEZ-DIAZ MJ *et al.*: Epidemiology of giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Arthritis Rheum* 2009; 61: 1454-61.
  14. GONZALEZ-GAY MA, GARCIA-PORRUA C: Epidemiology of the vasculitides. *Rheum Dis Clin North Am* 2001; 27: 729-49.
  15. GONZALEZ-GAY MA, MIRANDA-FILLOY JA, LOPEZ-DIAZ MJ *et al.*: Giant cell arteritis in northwestern Spain: a 25-year epidemiologic study. *Medicine* (Baltimore). 2007; 86: 61-8.
  16. WEYAND CM, MA-KRUPA W, PRYSHCHEP O, GROSCHEL S, BERNARDINO R, GORONZY JJ: Vascular dendritic cells in giant cell arteritis. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1062: 195-208.
  17. WEYAND CM, YOUNGE BR, GORONZY JJ: IFN-gamma and IL-17: the two faces of T-cell pathology in giant cell arteritis. *Curr Opin Rheumatol* 2011; 23: 43-9.
  18. LY KH, REGENT A, TAMBY MC, MOUTHON L: Pathogenesis of giant cell arteritis: More than just an inflammatory condition? *Autoimmun Rev* 2010; 9: 635-45.
  19. ZHERNAKOVA A, VAN DIEMEN CC, WIJMEGA C: Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 43-55.
  20. HUNDER GG, BLOCH DA, MICHEL BA *et al.*: The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1122-8.
  21. GONZALEZ-GAY MA, GARCIA-PORRUA C, LLORCA J, GONZALEZ-LOUZAO C, RODRIGUEZ-LEDO P: Biopsy-negative giant cell arteritis: clinical spectrum and predictive factors for positive temporal artery biopsy. *Semin Arthritis Rheum* 2001; 30: 249-56.
  22. PALOMINO-MORALES R, TORRES O, VAZQUEZ-RODRIGUEZ TR *et al.*: Association between toll-like receptor 4 gene polymorphism and biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2009; 36: 1501-6.
  23. GONZALEZ-GAY MA, GARCIA-PORRUA C, VAZQUEZ-CARUNCHO M: Polymyalgia rheumatica in biopsy proven giant cell arteritis does not constitute a different subset but differs from isolated polymyalgia rheumatica. *J Rheumatol* 1998; 25: 1750-5.
  24. GONZALEZ-GAY MA, BARROS S, LOPEZ-DIAZ MJ, GARCIA-PORRUA C, SANCHEZ-ANDRADE A, LLORCA J: Giant cell arteritis: disease patterns of clinical presentation in a series of 240 patients. *Medicine* 2005; 84: 269-76.
  25. GONZALEZ-GAY MA, LOPEZ-DIAZ MJ, BARROS S *et al.*: Giant cell arteritis: laboratory tests at the time of diagnosis in a series of 240 patients. *Medicine* 2005; 84: 277-90.
  26. RUEDA B, LOPEZ-NEVOT M, LOPEZ-DIAZ M *et al.*: A functional variant of vascular endothelial growth factor is associated with severe ischemic complications in giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2005; 32: 1737-41.
  27. SKOL A, SCOTT L, ABECASIS G, BOEHNKE M: Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet* 2006; 38: 209-13.
  28. PURCELL S, NEALE B, TODD-BROWN K *et al.*: PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 559-75.
  29. BENJAMINI Y, HOCHBERG Y: Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B* 1995; 57: 289-300.
  30. BARRETT JC, FRY B, MALLER J, DALY MJ: Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; 21: 263-5.
  31. MAIER LM, HAFLE DA: Autoimmunity risk alleles in costimulation pathways. *Immunol Rev* 2009; 229: 322-36.
  32. WEYAND CM, GORONZY JJ: Giant-cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Ann Intern Med* 2003; 139: 505-15.
  33. DENG J, YOUNGE BR, OLSHEN RA, GORONZY JJ, WEYAND CM: Th17 and Th1 T-cell responses in giant cell arteritis. *Circulation* 2010; 121: 906-15.
  34. OROZCO G, RUEDA B, MARTIN J: Genetic basis of rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother* 2006; 60: 656-62.
  35. GONZALEZ-GAY MA, AMOLI MM, GARCIA-PORRUA C, OLLIER WE: Genetic markers of disease susceptibility and severity in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Semin Arthritis Rheum* 2003; 33: 38-48.
  36. DESHMUKH HA, MAITI AK, KIM-HOWARD XR *et al.*: Evaluation of 19 Autoimmune Disease-associated Loci with Rheumatoid Arthritis in a Colombian Population: Evidence for Replication and Gene-Gene Interaction. *J Rheumatol* in press.
  37. TAN RJ, GIBBONS LJ, POTTER C *et al.*: Investigation of rheumatoid arthritis susceptibility genes identifies association of AFF3 and CD226 variants with response to anti-tumour necrosis factor treatment. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1029-35.
  38. BARTON A, WORTHINGTON J: Genetic susceptibility to rheumatoid arthritis: an emerging picture. *Arthritis Rheum* 2009; 61: 1441-6.
  39. OROZCO G, SANCHEZ E, GONZALEZ-GAY MA *et al.*: Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 219-24.
  40. OROZCO G, ALIZADEH BZ, DELGADO-VEGA AM *et al.*: Association of STAT4 with rheumatoid arthritis: a replication study in three European populations. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 1974-80.
  41. GONZALEZ-GAY MA, OLIVER J, OROZCO G, GARCIA-PORRUA C, LOPEZ-NEVOT MA, MARTIN J: Lack of association of a functional single nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with susceptibility to biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2005; 32: 1510-2.
  42. PALOMINO-MORALES R, VAZQUEZ-RODRIGUEZ TR, MORADO IC *et al.*: Lack of association between STAT4 gene polymorphism and biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2009; 36: 1021-5.
  43. TORRES O, PALOMINO-MORALES R, VAZQUEZ-RODRIGUEZ TR *et al.*: Lack of association between TRAF1/C5 gene polymorphisms and biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2010; 37: 131-5.
  44. RODRIGUEZ-RODRIGUEZ L, CASTAÑEDA S, VÁZQUEZ-RODRIGUEZ TR *et al.*: Role of the rs6822844 gene polymorphism at the IL2-IL21 region in biopsy-proven giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29: 12-6.
  45. TORRES O, PALOMINO-MORALES R, VAZQUEZ-RODRIGUEZ T *et al.*: Lack of association between IFNGR1 gene polymorphisms and biopsy-proven giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28: 31-4.
  46. TORRES O, PALOMINO-MORALES R, VAZQUEZ-RODRIGUEZ TR *et al.*: Lack of association between hypoxia inducible factor-1 alpha gene polymorphisms and biopsy-proven giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28: 40-5.

# Evaluation of a Shared Autoimmune Disease-associated Polymorphism of TRAF6 in Systemic Sclerosis and Giant Cell Arteritis

F. DAVID CARMONA, AURORA SERRANO, LUIS RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, JOSÉ LUIS CALLEJAS, CARMEN P. SIMEÓN, PATRICIA CARREIRA, SANTOS CASTAÑEDA, ROSER SOLANS, RICARDO BLANCO, the Spanish Scleroderma Group, the Spanish Giant Cell Arteritis Group, MIGUEL A. GONZÁLEZ-GAY, and JAVIER MARTÍN

**ABSTRACT. Objective.** We evaluated whether a single-nucleotide polymorphism (SNP) of the *TRAF6* gene previously associated with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis may be a common risk factor for systemic sclerosis (SSc) and giant cell arteritis (GCA).

**Methods.** A total of 1185 patients with SSc, 479 patients with biopsy-proven GCA, and 1442 unrelated healthy controls of white Spanish origin were genotyped for the rs540386 variant using a specifically designed TaqMan® allele discrimination assay.

**Results.** No significant associations of this SNP with global SSc or GCA were found. This was also the case when the potential associations of the *TRAF6* polymorphism with the main clinical phenotypes of the 2 diseases (e.g., limited cutaneous and diffuse cutaneous SSc, or presence of polymyalgia rheumatica and visual ischemic manifestations in GCA) were assessed.

**Conclusion.** Our data do not support a role of the rs540386 *TRAF6* variant as a key component of the genetic network underlying SSc and GCA. (J Rheumatol First Release May 15 2012; doi:10.3899/jrheum.120038)

## Key Indexing Terms:

GIANT CELL ARTERITIS SYSTEMIC SCLEROSIS *TRAF6* rs540386 AUTOIMMUNITY

From the Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada; Department of Rheumatology, Hospital Clínico San Carlos, Madrid; Department of Internal Medicine, Hospital Clínico San Cecilio, Granada; Department of Internal Medicine, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona; Department of Rheumatology, Hospital 12 de Octubre, Madrid; Department of Rheumatology, Hospital de la Princesa, IIS-Princesa, Madrid; and Department of Rheumatology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, IFIMAV, Santander, Spain.

Supported by GENFER from the Spanish Society of Rheumatology, SAF2009-11110 from the Spanish Ministry of Science, CTS-4977 and CTS-180 from Junta de Andalucía, Fondo de Investigaciones Sanitarias (Spain) through grants PI06-0024 and PS09/00748; and by RETICS Program RD08/0075 (RIER) from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII); and by the Orphan Disease Program grant from EULAR. Dr. Callejas and Dr. Martín are funded by Consejería de Salud, Junta de Andalucía, through PI-0590-2010. F.D. Carmona was supported by Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) through the JAE-DOC program.

F.D. Carmona, PhD; A. Serrano, BSc; J. Martín, MD, PhD, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC; L. Rodríguez-Rodríguez, MD, PhD, Department of Rheumatology, Hospital Clínico San Carlos; J.L. Callejas, MD, PhD, Department of Internal Medicine, Hospital Clínico San Cecilio; C.P. Simeón, MD, PhD; R. Solans, MD, PhD, Department of Internal Medicine, Hospital Vall d'Hebron; P. Carreira, MD, PhD, Department of Rheumatology, Hospital 12 de Octubre; S. Castañeda, MD, PhD, Department of Rheumatology, Hospital de la Princesa, IIS-Princesa; R. Blanco, MD, PhD; M.A. González-Gay, MD, PhD, Department of Rheumatology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, IFIMAV.

F.D. Carmona and A. Serrano share first authorship of this report; J. Martín and M.A. González-Gay share senior authorship.

Address correspondence to F.D. Carmona, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain.

E-mail: dcarmona@ipb.csic.es

Accepted for publication March 7, 2012.

Autoimmune diseases are complex multifactorial disorders caused by a combination of environmental and genetic factors, each with generally modest effects independently, that lead to an imbalance of the immune system<sup>1</sup>. Accumulating knowledge suggests a shared genetic basis underlying autoimmunity, and the hypothesis that a common network of genetic risk variants may influence the development of different autoimmune diseases is gaining interest<sup>2</sup>.

Recent studies have reported an association between the tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6 (*TRAF6*) gene on 11p12 and rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE)<sup>3,4</sup>. TRAF proteins are cytoplasmic adapter molecules with a pivotal role in the immune response that have been shown to interact with numerous members of the TNF receptor family, although *TRAF6* is also involved in the regulation of other receptors, including interleukin 1R, interleukin 18R, and Toll-like receptors (TLR)<sup>5</sup>.

To evaluate the possible involvement of *TRAF6* in the pathogenesis of general autoimmunity, we analyzed whether an intronic single-nucleotide polymorphism (SNP) of this gene that has been associated with SLE and RA is also involved in other autoimmune diseases; these included systemic sclerosis (SSc), a chronic fibrotic autoimmune disorder with a genetic background similar to that in SLE<sup>6</sup>, and giant cell arteritis (GCA), a vasculitis characterized by inflammatory lesions of medium- and large-size arteries that shares some genetic associations with RA<sup>7</sup>.

## MATERIALS AND METHODS

**Study population.** A white Spanish cohort of 1185 patients with SSc, 483 patients with GCA, and 1442 unrelated healthy controls was analyzed. All patients fulfilled the respective American College of Rheumatology criteria for each disease<sup>8,9</sup>. Additionally, the GCA condition was confirmed by a positive temporal artery biopsy. The Spanish National DNA Bank provided the control samples, which had the same criteria for sex and geographic origin. Our study was approved by the local ethical committees and informed written consent was obtained from all participants. Clinical features of the patients have been described previously<sup>10,11</sup>.

SSc subgroups were established based on the extent of skin involvement and autoantibody status as limited cutaneous SSc (lcSSc), diffuse cutaneous SSc (dcSSc), positive for anticentromere antibodies (ACA), and positive for antitopoisomerase antibodies (ATA), as well as for the presence of pulmonary fibrosis<sup>12</sup>. GCA subsets were established according to the presence/absence of polymyalgia rheumatica, visual ischemic manifestations, severe ischemic manifestations (comprising visual manifestations, cerebrovascular accidents, jaw claudication, or limb claudication of recent onset), and irreversible occlusive disease (if patients experienced at least 1 of the following complications: permanent visual loss, stroke, or limb claudication of recent onset), as described<sup>10</sup>.

**Genotyping methods.** DNA was extracted from peripheral blood cells using standard procedures. All participants were genotyped for the *TRAF6* variant rs540386 using a predesigned TaqMan<sup>®</sup> allele discrimination assay (ID: C\_2408956\_10) in a 7900HT Fast Real-time polymerase chain reaction system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

**Statistical analyses.** PLINK (v1.07) software (Harvard University, Cambridge, MA, USA; <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) was used to construct 2 × 2 contingency tables and chi-square test and/or Fisher's exact test, when necessary. OR and 95% CI were obtained according to Woolf's method. P values < 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

The overall statistical power of the study is shown in Table 1. No deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was observed ( $p = 0.05$ ).

We first investigated the possible implication of the rs540386 *TRAF6* variant in the genetic susceptibility to SSc and GCA and their major clinical subphenotypes by comparing the allele frequencies of the different case sets with that of the control population (Table 2). No statistical significance was observed for the global disease analyses (SSc vs controls:  $p = 0.39$ , OR = 0.93; GCA vs controls:  $p = 0.94$ , OR = 0.99) or when the different clinical subgroups were tested.

To further examine the potential role of the rs540386 genetic variant in SSc and GCA, a new comparison between patients positive for each specific clinical characteristic and patients without the corresponding manifestation was performed (Table 3). These analyses yielded similar negative results.

Table 1. Overall statistical power of the study for rs540386 in each analyzed disease at the 5% significance level.

Condition	OR 1.1	OR 1.2	OR 1.3	OR 1.4	OR 1.5
SSc	0.23	0.66	0.94	0.99	1.00
GCA	0.14	0.41	0.73	0.92	0.98

SSc: systemic sclerosis; GCA: giant cell arteritis.

Finally, no significant heterogeneity between cases and controls was detected when the genotype, recessive, and dominant models were applied (Table 4).

## DISCUSSION

*TRAF6* is a ubiquitin ligase that mediates signal transduction pathways from the TNF and interleukin 1/TLR superfamilies, which implies that this protein is an important regulator of a wide spectrum of physiological processes including innate and adaptive immunity. *TRAF6* is a key component of B cell activation and it has been reported that development of regulatory T cells (Treg), which are crucial in the maintenance of immune tolerance, requires *TRAF6* expression in thymocytes<sup>13,14</sup>. *TRAF6* has been associated with SLE and RA; members of the TLR signaling pathway upstream and downstream of *TRAF6*, such as *TNFAIP3*, *IRF5*, *IRF7*, and *IRAK1*, are known risk factors for SSc and other autoimmune diseases<sup>1,3,4,6</sup>.

Taking this into account, we considered *TRAF6* an interesting candidate gene that could be involved in the predisposition to general autoimmunity. However, our data show no significant association of the analyzed polymorphism with the susceptibility and main clinical manifestations of SSc and GCA, although this same SNP has been described as strongly associated with SLE and RA<sup>3,4</sup>. Since the cohorts in our study were large and well defined, it is unlikely that the observed lack of association might have been due to a type II error as a consequence of low statistical power. Supporting this assumption, data from a genome-wide association study (GWAS) of SSc from our group<sup>15</sup> found no positive association signals within the *TRAF6* genomic region, which included 15 SNP (most of them closely linked with rs540386 in the CEU population of the HapMap project, Figure 1). However, no GWAS data are available for GCA, and replication in other populations, desirably of white origin, would be needed to draw definitive conclusions. Moreover, the possibility exists that a different *TRAF6* SNP from rs540386 could be associated with SSc and GCA, as reported recently in SLE by Namjou, *et al*<sup>4</sup>.

Cumulative evidence indicates that the different clinical autoimmune outcomes would be a consequence of the presence in the genome of a set of common and disease-specific susceptibility loci interacting with epigenetic and environmental triggers<sup>2</sup>. In this regard, an increasing number of genetic loci outside the HLA region have been convincingly associated with a diverse range of autoimmune diseases, such as *PTPN22*, *TNFAIP3*, *STAT4*, *CTLA4*, *IRF5*, *IL23R*, *IL2/IL21*, and *IL2RA*, among others<sup>1</sup>. Our results suggest that *TRAF6*, or at least the SLE- and RA-associated rs540386 genetic variant, may not be a shared autoimmunity locus but a susceptibility factor specifically associated with the pathogenesis of certain autoimmune diseases. Further studies are needed to elucidate the extent of the common genetic contribution to autoimmunity.

**Table 2.** Genotype and minor allele frequency (MAF) of *TRAF6* rs540386 in patients with systemic sclerosis (SSc) and giant cell arteritis (GCA) and healthy controls from Spain.

	CC	Genotype, N (%) TC	TT	MAF, %	p*	Allele test OR (95% CI)**
Controls (n = 1442)	1102 (76.42)	319 (22.12)	21 (1.46)	12.52		
SSc						
SSc, n = 1185	924 (77.97)	244 (20.59)	17 (1.43)	11.73	0.385	0.93 (0.79–1.10)
lcSSc, n = 818	634 (77.51)	170 (20.78)	14 (1.71)	12.10	0.684	0.96 (0.80–1.16)
dcSSc, n = 367	290 (79.02)	74 (20.16)	3 (0.82)	10.90	0.232	0.85 (0.66–1.11)
ACA+, n = 545	425 (77.98)	111 (20.37)	9 (1.65)	11.83	0.559	0.94 (0.76–1.16)
ATA+, n = 259	206 (79.54)	52 (20.08)	1 (0.39)	10.42	0.180	0.81 (0.60–1.10)
PF+, n = 286	223 (77.97)	59 (20.63)	4 (1.40)	11.71	0.594	0.93 (0.70–1.22)
GCA						
GCA, n = 479	364 (75.99)	111 (23.17)	4 (0.84)	12.42	0.938	0.99 (0.79–1.24)
PMR+, n = 213	166 (77.93)	46 (21.60)	1 (0.47)	11.27	0.464	0.89 (0.64–1.22)
VIM+, n = 130	100 (76.92)	30 (23.08)	0 (0.00)	11.54	0.647	0.91 (0.61–1.36)
SIM+, n = 242	183 (75.62)	58 (23.97)	1 (0.41)	12.40	0.941	0.99 (0.74–1.32)
IOD+, n = 85	69 (81.18)	16 (18.82)	0 (0.00)	9.41	0.232	0.73 (0.43–1.23)

\* All p values have been calculated for the allelic model. \*\* OR for the minor allele. lcSSc: limited cutaneous SSc; dcSSc: diffuse cutaneous SSc; ACA: anti-centromere antibodies; ATA: antitopoisomerase antibodies; PF: pulmonary fibrosis; PMR: polymyalgia rheumatica; VIM: visual ischemic manifestations; SIM: severe ischemic manifestations; IOD: irreversible occlusive disease.

**Table 3.** Genotype distribution and minor allele frequency (MAF) of *TRAF6* rs540386 in systemic sclerosis (SSc) and giant cell arteritis (GCA) patients according to the presence or absence of specific clinical manifestations.

Manifestation	With Manifestations		Without Manifestations		p**	Allele Test OR (95% CI)***
	Genotypic Frequencies	MAF, %	Genotypic Frequencies	MAF, %		
SSc						
SSc subtype*	3/74/290	10.90	14/170/634	12.10	0.400	0.89 (0.67–1.17)
Anticentromere antibodies	9/111/425	11.83	7/125/465	11.64	0.886	1.02 (0.79–1.32)
Antitopoisomerase antibodies	1/52/206	10.42	14/178/662	12.06	0.310	0.85 (0.62–1.17)
Pulmonary fibrosis	4/59/223	11.71	11/170/623	11.94	0.885	0.98 (0.73–1.32)
GCA						
Polymyalgia rheumatica	1/46/166	11.27	3/62/192	13.23	0.363	0.83 (0.56–1.24)
Visual ischemic manifestations	0/30/100	11.54	4/78/255	12.76	0.612	0.89 (0.57–1.39)
Severe ischemic manifestations	1/58/183	12.40	3/50/170	12.56	0.941	0.99 (0.67–1.46)
Irreversible occlusive disease	0/16/69	9.41	4/85/269	12.99	0.202	0.70 (0.40–1.22)

\* With: diffuse cutaneous SSc; without: limited cutaneous SSc. \*\* P value for the allelic model. \*\*\* OR for the minor allele.

**Table 4.** Genotype and recessive and dominant models for the minor allele of *TRAF6* rs540386 in global systemic sclerosis (SSc) and giant cell arteritis (GCA) compared with controls.

	Controls N (%)	SSc N (%)	p	OR (95% CI)	GCA N (%)	p	OR (95% CI)
CC	1102 (76.42)	924 (77.97)			364 (75.99)		
CT	319 (22.12)	244 (20.59)	0.632*	NA	111 (23.17)	0.572*	NA
TT	21 (1.46)	17 (1.43)			4 (0.84)		
CC + CT	1421 (98.54)	1168 (98.57)	0.963	0.98 (0.51–1.88)	475 (99.16)	0.305	0.57 (0.19–1.67)
TT	21 (1.46)	17 (1.43)			4 (0.84)		
CC	1102 (76.42)	924 (77.97)			364 (75.99)		
TT + CT	340 (23.58)	261 (22.03)	0.346	0.92 (0.76–1.10)	115 (24.01)	0.848	1.02 (0.80–1.31)

\* P value for the genotype distribution. NA: not applicable.

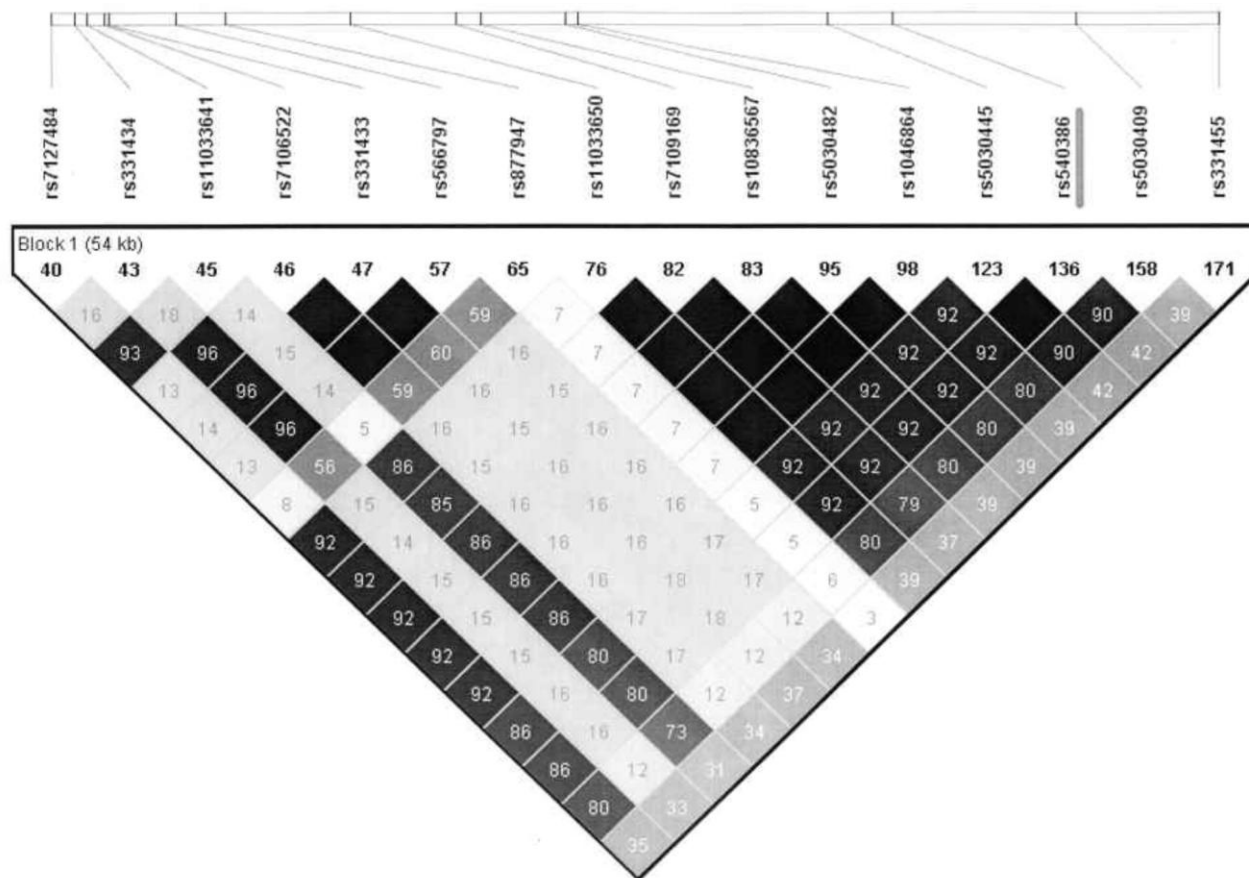


Figure 1. Linkage disequilibrium plot of *TRAF6* variants in the CEU population of the HapMap project, including rs540386 and 15 additional polymorphisms analyzed in a systemic sclerosis genome-wide association study within this locus<sup>15</sup>. R<sup>2</sup> values are shown. The underlined polymorphism corresponds to the *TRAF6* variant analyzed in this study.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Sofía Vargas, Sonia García, and Gema Robledo for excellent technical assistance, and all the patients and controls for their essential collaboration. Banco Nacional de ADN (University of Salamanca, Spain) is thanked for supplying the control material.

## APPENDIX

List of study collaborators. Members of the Spanish Scleroderma Group: Norberto Ortego-Centeno and Raquel Ríos, Unidad de Enfermedades Sistémicas Autoinmunes, Department of Internal Medicine, Hospital Clínico Universitario San Cecilio, Granada; Nuria Navarrete, Department of Internal Medicine, Hospital Virgen de las Nieves, Granada; Rosa García Portales, Department of Rheumatology, Hospital Virgen de la Victoria, Málaga; María Teresa Camps, Department of Internal Medicine, Hospital Carlos Haya, Málaga; Antonio Fernández-Nebro, Department of Rheumatology, and María F. González-Escribano, Department of Immunology, Hospital Virgen del Rocío, Sevilla; Julio Sánchez-Román, Francisco José García-Hernández, and M. Jesús Castillo, Department of Internal Medicine, Hospital Virgen del Rocío, Sevilla; M. Ángeles Aguirre and Inmaculada Gómez-Gracia, Department of Rheumatology, Hospital Reina Sofía, Córdoba; Benjamín Fernández-Gutiérrez, Department of Rheumatology, Hospital Clínico San Carlos, Madrid; Esther Vicente, Department of Rheumatology, Hospital La Princesa, Madrid; José Luis Andreu and Mónica Fernández de Castro, Department of Rheumatology, Hospital Puerta del Hierro, Madrid; Paloma García de la Peña, Department of Rheumatology, Hospital Madrid Norte Sanchinarro, Madrid; Francisco Javier López-Longo and Lina Martínez,

Department of Rheumatology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid; Vicente Fonollosa, Department of Internal Medicine, Hospital Valle de Hebrón, Barcelona; Gerard Espinosa, Department of Internal Medicine, Hospital Clinic, Barcelona; Iván Castellví, Department of Rheumatology, Hospital Sant Pau, Barcelona; Carlos Tolosa, Department of Internal Medicine, Hospital Parc Tauli, Sabadell; Anna Pros, Department of Rheumatology, Hospital Del Mar, Barcelona; Mónica Rodríguez Carballeira, Department of Internal Medicine, Hospital Universitari Mútua Terrasa, Barcelona; Francisco Javier Narváez, Department of Rheumatology, Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona; Bernardino Díaz, Luis Trapiella, and María Gallego, Department of Internal Medicine, Hospital Central de Asturias, Oviedo; María del Carmen Freire and Inés Vaquero, Unidad de Trombosis y Vasculitis, Department of Internal Medicine, Hospital Xeral-Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Vigo; María Victoria Egurbide, Department of Internal Medicine, Hospital de Cruces, Barakaldo; Luis Sáez-Comet, Department of Internal Medicine, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza; Federico Díaz and Vanesa Hernández, Department of Rheumatology, Hospital Universitario de Canarias, Tenerife; Emma Beltrán, Department of Rheumatology, Hospital del Doctor Peset Aleixandre, Valencia; José Andrés Román-Ivorra, Department of Rheumatology, Hospital Universitari i Politecnico La Fe, Valencia; Francisco J. Blanco García, María Ángeles Robles, and Natividad Oreiro, Department of Rheumatology, INIBIC-Hospital Universitario A Coruña, La Coruña, Spain.

Members of the Spanish GCA Group: José A. Miranda-Filloo, Department of Rheumatology, Hospital Xeral-Calde, Lugo; Inmaculada C. Morado, Department of Rheumatology, Hospital Clínico San Carlos, Madrid; Javier Narváez and Carmen Gómez-Vaquero, Department of Rheumatology,



Hospital Universitario de Bellvitge-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona; Bernardo Sopena, Thrombosis and Vasculitis Unit – Internal Medicine Department, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Vigo; Ainhoa Unzurrunzaga, Department of Internal Medicine, Hospital de Galdakano, Vizcaya; Begoña Marí-Alfonso, Department of Internal Medicine, Corporació Sanitària Parc Taulí, Instituto Universitario Parc Taulí, UAB, Sabadell, Barcelona; Eugenio de Miguel, Department of Rheumatology, Hospital Universitario de La Paz, Madrid; Ana Hidalgo-Conde, Department of Internal Medicine, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga; Julio Sánchez, Department of Rheumatology, Hospital 12 de Octubre, Madrid; María J. García, Department of Rheumatology, Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

## REFERENCES

1. Cho JH, Gregersen PK. Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *N Engl J Med* 2011;365:1612-23.
2. Zhernakova A, van Diemen CC, Wijmenga C. Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. *Nat Rev Genet* 2009;10:43-55.
3. Raychaudhuri S, Thomson BP, Remmers EF, Eyre S, Hinks A, Guiducci C, et al. Genetic variants at CD28, PRDM1 and CD2/CD58 are associated with rheumatoid arthritis risk. *Nat Genet* 2009;41:1313-8.
4. Namjou B, Choi CB, Harley ITW, Alarcón-Riquelme ME, Kelly JA, Glenn SB, et al. Evaluation of TRAF6 in a large multi-ancestral lupus cohort. *Arthritis Rheum* 2012 Jan 9 [E-pub ahead of print].
5. Ha H, Han D, Choi Y. TRAF-mediated TNFR-family signaling. *Curr Protoc Immunol* 2009;Chapter 11:Unit 11.9D.
6. Martin JE, Bossini-Castillo L, Martin J. Unraveling the genetic component of systemic sclerosis. *Hum Genet* 2012 Jan 5 [E-pub ahead of print].
7. Gonzalez-Gay MA, Vazquez-Rodriguez TR, Lopez-Diaz MJ, Miranda-Filloo JA, Gonzalez-Juanatey C, Martin J, et al. Epidemiology of giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Arthritis Rheum* 2009;61:1454-61.
8. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 1980;23:581-90.
9. Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, Stevens MB, Arend WP, Calabrese LH, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1122-8.
10. Carmona FD, Serrano A, Rodriguez-Rodriguez L, Castaneda S, Miranda-Filloo JA, Morado IC, et al. A nonsynonymous functional variant of the ITGAM gene is not involved in biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2011;38:2598-601.
11. Carmona FD, Gutala R, Simeon CP, Carreira P, Ortego-Centeno N, Vicente-Rabaneda E, et al. Novel identification of the IRF7 region as an anticentromere autoantibody propensity locus in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2012;71:114-9.
12. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): Classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202-5.
13. Shimo Y, Yanai H, Ohshima D, Qin J, Motegi H, Maruyama Y, et al. TRAF6 directs commitment to regulatory T cells in thymocytes. *Genes Cells* 2011;16:437-47.
14. Chung JY, Lu M, Yin Q, Lin SC, Wu H. Molecular basis for the unique specificity of TRAF6. *Adv Exp Med Biol* 2007;597:122-30.
15. Radstake TR, Gorlova O, Rueda B, Martin JE, Alizadeh BZ, Palomino-Morales R, et al. Genome-wide association study of systemic sclerosis identifies CD247 as a new susceptibility locus. *Nat Genet* 2010;42:426-9.

---

---

# A case-control study suggests that the *CCR6* locus is not involved in the susceptibility to giant cell arteritis

---

A. Serrano<sup>1</sup>, F.D. Carmona<sup>1</sup>, S. Castañeda<sup>2</sup>, J.A. Miranda-Fillooy<sup>3</sup>, I.C. Morado<sup>4</sup>, C. Gomez-Vaquero<sup>5</sup>, R. Solans<sup>6</sup>, B. Sopena<sup>7</sup>, R. Blanco<sup>8</sup>, A. Unzurrunzaga<sup>9</sup>, N. Ortego-Centeno<sup>10</sup>, B. Marí-Alfonso<sup>11</sup>, A. Hidalgo-Conde<sup>12</sup>, J. Hernández-Rodríguez<sup>13</sup>, M.C. Cid<sup>13</sup>, J. Martín<sup>1</sup>, M.A. González-Gay<sup>8</sup>

---

<sup>1</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada; <sup>2</sup>Dept. of Rheumatology, Hospital de la Princesa, IIS-Princesa, Madrid; <sup>3</sup>Dept. of Rheumatology, Hospital Xeral-Calde, Lugo; <sup>4</sup>Dept. of Rheumatology, Hospital Clínico San Carlos, Madrid; <sup>5</sup>Dept. of Rheumatology, Hospital Universitario de Bellvitge-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona; <sup>6</sup>Dept. of Internal Medicine, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona; <sup>7</sup>Thrombosis and Vasculitis Unit-Internal Medicine Department, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo; <sup>8</sup>Dept. of Rheumatology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, IFIMAV, Santander; <sup>9</sup>Dept. of Internal Medicine, Hospital de Galdakano, Vizcaya; <sup>10</sup>Dept. of Internal Medicine, Hospital Clínico San Cecilio, Granada; <sup>11</sup>Dept. of Internal Medicine, Corporació Sanitaria Parc Taulí, Instituto Universitario Parc Taulí, UAB, Sabadell, Barcelona; <sup>12</sup>Dept. of Internal Medicine, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga; <sup>13</sup>Vasculitis Research Unit, Dept. of Autoimmune and Systemic Diseases, Hospital Clínic, University of Barcelona, (IDIBAPS), Barcelona, Spain.

Aurora Serrano, F. David Carmona, Santos Castañeda, José A. Miranda-Fillooy, Inmaculada C. Morado, Carmen Gomez-Vaquero, Roser Solans, Bernardo Sopena, Ricardo Blanco, Ainhoa Unzurrunzaga, Norberto Ortego-Centeno, Begoña Marí-Alfonso, Ana Hidalgo-Conde, José Hernández-Rodríguez, Maria C. Cid, Javier Martín, Miguel A. González-Gay

Please address correspondence to: Javier Martín, MD, PhD, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, IPBLN-CSIC, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla (Granada), Spain. E-mail: martin@ipb.csic.es

Received on March 22, 2012; accepted in revised form on June 13, 2012.

© Copyright CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2012.

**Key words:** GCA, temporal arteritis, SNP, *CCR6*, rs3093024

Competing interests: none declared.

## ABSTRACT

**Background.** Polymorphisms of the *CC chemokine receptor 6 (CCR6) gene* have been recently reported to be associated with a number of autoimmune diseases.

**Objective.** We aimed to investigate the possible influence of *CCR6 rs3093024 gene variant* in the susceptibility to and clinical expression of GCA.

**Methods.** The *CCR6 polymorphism rs3093024* was genotyped in a total of 463 Spanish patients diagnosed with biopsy-proven GCA and 920 healthy controls using a TaqMan<sup>®</sup> allelic discrimination assay. PLINK software was used for the statistical analyses.

**Results.** No significant association between this *CCR6 variant* and GCA was observed ( $p=0.42$ ,  $OR=0.94$ ,  $CI95\% 0.79-1.10$ ). Similarly, when patients were stratified according to the specific clinical features of GCA such as polymyalgia rheumatica, visual ischaemic manifestations or irreversible occlusive disease, no statistical significant difference was detected either between the case subgroups and the control set or between GCA patients with and without the specific features of the disease.

**Conclusion.** Our results suggest that the *CCR6 rs3093024 polymorphism* may not play a relevant role in the GCA pathophysiology.

## Introduction

*CCR6* encodes a member of the beta chemokine receptor family, which is predicted to be a seven transmembrane protein similar to the G protein-coupled receptors. This gene encodes an important receptor involved in the regulation of several aspects of the immunity, including the ability to mediate the recruitment of immature and mature dendritic cells (DCs), and profes-

sional antigen presenting cells (APCs) to the sites of epithelial inflammation. The ligand of this receptor is the macrophage inflammatory protein 3 alpha (MIP-3 alpha) (1). *CCR6* has been shown to be important for B-lineage maturation and antigen-driven B-cell differentiation, and it may regulate the migration and recruitment of dendritic and T cells during inflammatory and immunological responses. Alternatively spliced transcript variants have been described for this gene. It is likely that the IL23 produced by DC acts to sustain dermal *CCR6*-expressing Th17 cells, which then produce IL22.

Recent studies have focused on the involvement of *CCR6* in the pathogenesis of several autoimmune diseases such as Crohn's disease (2), Graves' disease (4), psoriasis (4), and rheumatoid arthritis (RA) (5).

Giant cell arteritis (GCA), also known as temporal arteritis and Horton's syndrome, is a systemic vasculitis affecting medium and large size arteries with a predisposition for the involvement of cranial arteries that supply the aortic arch especially extracranial territories, mainly branches of the external carotid (6, 7). The fundamental inflammatory lesion is composed of T cells and macrophages that have infiltrated through all layer of the arterial wall and the appearance of multinucleated giant cells (8). GCA is the most common type of vasculitis affecting people aged  $\geq 50$  years and it is suffered mainly by women. It is more frequent in Caucasians, with a higher prevalence in populations of Scandinavian origin (9, 10).

The inflammatory activity of vascular lesions in GCA emphasises the role of the adaptive immunity. At least two separate lineages of CD4 T cells may participate in the vascular inflammation

undergoing clonal expansion in the vessel walls and releasing interferon (IFN)- $\gamma$  (11). Additionally, recent studies have described a distinctive population of DCs localised at the adventitia media border of normal medium sized arteries that appear to play a critical role in the initiation of this vasculitis. Cellular immune responses implicating T cells and APCs are crucial elements in GCA. At the disease onset, APCs contribute to differentiation of Th17 as well as Th1 cells (12). On the other hand, the vascular lesions contain mainly activated T cells, macrophages and multinucleated giant cells (13, 14).

It is known that chemokines and chemokine receptors play key roles in the early inflammatory response, as these molecules are directly involved in the chemoattractant process that recruit T cells and phagocytes to inflammation sites (15, 16). On the other hand, it has been proposed that shared immunological pathways may constitute the basis of the pathology of different autoimmune diseases. In this regard, like RA, GCA is also a complex polygenic disease in which more than 1 genetic locus is likely to contribute to disease susceptibility and clinical expression. Taking these considerations into account, since *CCR6* single-nucleotide-polymorphism (SNP) rs3093024 was previously found associated with susceptibility to RA (17), in the present study we sought to determine whether this *CCR6* gene variant may be associated with susceptibility to GCA. We also aimed to determine if this gene polymorphism might influence the expression of the main clinical manifestations of GCA in a large series of biopsy-proven GCA patients.

**Patients and methods**

*Study population*

After obtaining informed written consent and authorisation from the local ethical committees, we studied 463 patients diagnosed with biopsy-proven GCA and 920 unrelated healthy controls recruited in the same geographic regions and matched by age, gender, and ethnicity with the GCA patients. The main clinical characteristics of the analysed cohort are shown in Table I.

Definitions for specific features of the disease including headache, polymyalgia rheumatica (PMR), jaw claudication, peripheral arteriopathy manifested by arm or leg claudication, visual ischaemic manifestations (VIM), permanent visual loss, stroke, severe ischaemic manifestations (SIM- encompassing visual manifestations, cerebrovascular accidents, jaw claudication or limb claudication of recent onset) and the presence of irreversible occlusive disease (IOD- if patients experienced at least one of the following complications: permanent visual loss, stroke or limb claudication of recent onset), were also previously described (18-22).

All patients fulfilled the 1990 American College of Rheumatology criteria for the classification of GCA (23). All GCA patients had a positive temporal artery biopsy showing disruption of the internal elastic laminae with infiltration of mononuclear cells into the arterial wall, with or without giant cells (24).

*Genotyping methods and statistical analysis*

DNA was obtained from peripheral blood mononuclear cells, using standard methods. All samples were genotyped for the *CCR6* single-nucleotide-polymorphism (SNP) rs3093024 by using predesigned TaqMan<sup>®</sup> allelic discrimination assay technology in a

7900HT Real-Time polymerase chain reaction (PCR) System, from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

The statistical power of the analysis was 82% to detect associations with odds ratios (ORs)=1.2 at the 5% significant level, according to Power Calculator for Genetic Studies 2006 software (25).

Plink software (v1.07; <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) (26) was used for the statistical analyses. To test for individual population association, 2x2 contingency tables and  $\chi^2$  or Fisher's exact test, when appropriate, were performed. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were obtained according to Woolf's method. *p*-values lower than 0.05 were considered as statistically significant.

**Results**

The genotyping success rate was higher than 90% in both GCA patients and controls. After genotyping, no evidence of departure from Hardy-Weinberg equilibrium was observed in either case or control populations at the 5% significance level.

Table II shows the genotype and minor allele frequencies (MAFs) of the control cohort and the different case sets analysed. No significant differences were detected between the allele frequencies of the GCA patients and controls.

**Table I.** Main clinical features of 463 Spanish Caucasian patients with biopsy-proven GCA.

Feature	Variable
Age at diagnosis, years, median (IQR)	75 (69–79)
Women	321 (69.3)
Men	142 (30.6)
Headache	366 (79.0)
Abnormal temporal artery on examination	272 (58.7)
Polymyalgia rheumatica	217 (46.8)
Jaw claudication	191 (41.3)
Arm-leg claudication	28 (6.0)
Visual ischaemic manifestations*	120 (25.9)
Permanent visual loss	53 (11.4)
Stroke	20 (4.3)
Severe ischaemic manifestations**	231 (49.9)
Irreversible occlusive disease***	87 (18.7)

IQR: interquartile range. Rest of values are expressed as number and percentages (%).

\*Transient visual loss including amaurosis fugax, permanent visual loss, or diplopia.

\*\*At least one of the following features: visual manifestations, cerebrovascular accidents (stroke and/or transient ischaemic attacks), jaw claudication, or limb claudication.

\*\*\*At least one of the following features: permanent visual loss, stroke and/or occlusive disease in the extremities.

**Table II.** Genotype and allele distribution of *CCR6* rs3093024 in biopsy-proven GCA patients and healthy controls.

SNP	Subgroup (n)	Genotype, n (%)			MAF (%)	Allele test	
		AA	AG	GG		p-value*	OR [95%CI]**
rs3093024	Controls (n=866)	195 (22.52)	420 (48.50)	251 (28.98)	46.77		
	GCA (n=429)	92 (21.45)	203 (47.32)	134 (31.24)	45.10	0.425	0.94 [0.79–1.10]
	PMR+ (n=206)	50 (24.27)	90 (43.69)	66 (32.04)	46.12	0.812	0.97 [0.79–1.21]
	VIM+ (n=110)	23 (20.91)	60 (54.55)	27 (24.55)	48.18	0.692	1.06 [0.80–1.40]
	SIM+ (n=211)	44 (20.85)	106 (50.24)	61 (28.91)	45.97	0.769	0.97 [0.78–1.20]
	IOD+ (n=84)	20 (23.81)	44 (52.38)	20 (23.81)	50.00	0.423	1.14 [0.83–1.56]

\*All p-values have been calculated for the allelic model. \*\*Odds ratio for the minor allele. MAF: minor allele frequency; GCA: giant cell arteritis; PMR: polymyalgia rheumatica; VIM: visual ischaemic manifestations; SIM: severe ischaemic manifestations; IOD: irreversible occlusive disease.

**Table III.** Genotype distribution and minor allele frequency (MAF) of *CCR6* rs3093024 in biopsy-proven GCA patients according to the presence (with) or absence (without) of specific manifestations of the disease.

SNP	Subgroup	With		Without		Test Statistic	
		Genotypic frequencies	MAF (%)	Genotypic frequencies	MAF (%)	p-value*	OR [95%CI]**
rs3093024	PMR	50/90/66	46.12	40/109/64	44.37	0.611	1.07 [0.82–1.41]
	VIM	23/60/27	48.18	67/138/101	44.44	0.340	1.16 [0.85–1.58]
	SIM	44/106/61	45.97	46/90/67	44.83	0.741	1.05 [0.80–1.38]
	IOD	20/44/20	50.00	70/148/105	44.58	0.209	1.24 [0.88–1.75]

\*All p-values have been calculated for the allelic model. \*\*Odds ratio for the minor allele. MAF: minor allele frequency; GCA: giant cell arteritis; PMR: polymyalgia rheumatica; VIM: visual ischaemic manifestations; SIM: severe ischaemic manifestations; IOD: irreversible occlusive disease.

To examine whether the *CCR6* locus might influence the clinical manifestations of the disease, GCA patients were subdivided according to the presence of PMR, VIM, SIM and IOD. However, no significant differences were found in the analyses between the different case subgroups and the control population (Table II). Moreover, similar negative results were also observed when GCA patients with and without specific clinical features of the disease were compared (Table III).

**Discussion**

*CCR6* is believed to be involved in leukocyte recruitment and inflammatory response (27). There are data suggesting that inappropriate activation, maturation and retention of DCs in the adventitia constitutes one of the earliest steps in the pathogenesis of GCA and that subsequent events are dependent on DC-induced T cell activation (28, 29). GCA and RA are complex autoimmune diseases in which both environmental and genetic factors contribute to their etiology (9, 30). These inflammatory conditions share some genetic associations, including HLA-DRB1\*04 alleles (31). An increasing number of common

susceptibility loci among different autoimmune diseases have been identified by genome-wide association studies (GWAS) in the last years (32-35), thus suggesting a shared underlying immunological mechanisms. In this regard, polymorphisms within the *CCR6* gene have been associated with different immune-mediated diseases including RA (5, 17).

Taken together all these considerations, we aimed to determine whether *CCR6* might also be a susceptibility locus for GCA. However, in this study that was the first attempt to determine the potential influence of the *CCR6* genetic variant rs3093024 in both GCA susceptibility and phenotypic expression of this vasculitis, no association between this gene variant and GCA was found.

These results are in line with former studies of our group that did not disclose association between polymorphisms in inflammatory pathway genes and biopsy-proven GCA (36-38). Nevertheless, a possible association between GCA and other *CCR6* gene variants different from that analysed here may not be discarded.

Finally, although we recruited the largest series of biopsy-proven GCA pa-

tients included in a genetic study on this disease so far, the statistical power was still moderate to detect a low signal, and this could be considered a limitation of this study.

In conclusion, our results indicate no evidence for a contribution of the analysed *CCR6* gene variant in the susceptibility to or clinical manifestations of GCA. Further studies in populations with different genetic backgrounds may be necessary to fully exclude the contribution of *CCR6* gene polymorphisms in the pathogenesis of GCA.

**Acknowledgements**

The authors thank Gema Robledo, Sofía Vargas and Sonia García for their excellent technical assistance, and all the patients and healthy controls for kindly giving their essential collaboration.

**Authors' contributions**

A. Serrano and F.D. Carmona contributed equally to this work. J. Martín and M.A. González-Gay share senior authorship.

**Funding**

This study was supported by 'Fondo de Investigaciones Sanitarias' through

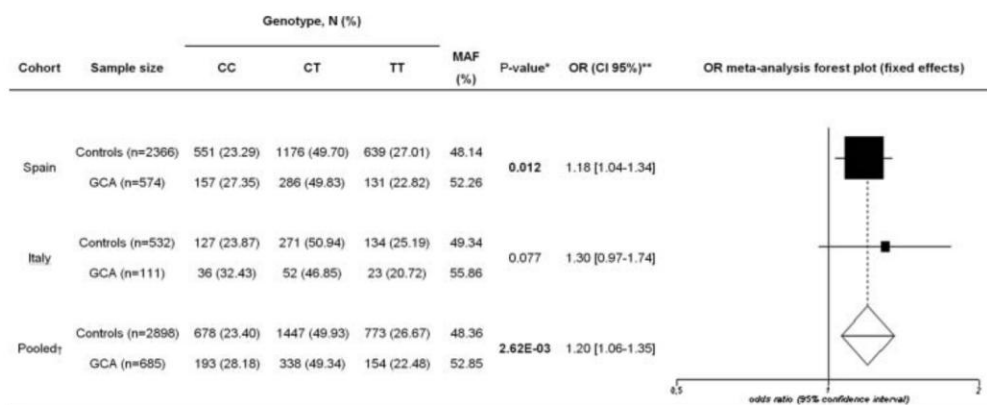
grants PI06-0024 and PS09/00748 (Spain), and partially supported by RETICS Program RD08/0075 (RIER) from 'Instituto de Salud Carlos III' (ISCIII). FDCL was supported by Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) through the programme JAE-DOC.

## References

- SCHUTYSER E, STRUYF S, VAN DAMME J: The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 409-26.
- BARRETT JC, HANSOUL S, NICOLAE DL *et al.*: Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 2008 Aug; 40: 955-62.
- CHU X, PAN CM, ZHAO SX *et al.*: A genome-wide association study identifies two new risk loci for Graves' disease. *Nat Genet* 2011; 43: 897-901.
- MABUCHIT, CHANG TW, QUINTER S, HWANG ST: Chemokine receptors in the pathogenesis and therapy of psoriasis. *J Dermatol Sci* 2012; 65: 4-11.
- STAHL EA, RAYCHAUDHURI S, REMMERS EF *et al.*: Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet* 2010; 42: 508-14.
- SALVARANI C, CANTINI F, BOIARDI L, HUNDER GG: Polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis. *N Engl J Med* 2002; 347: 261-71.
- GONZALEZ-GAY MA, VAZQUEZ-RODRIGUEZ TR, LOPEZ-DIAZ MJ *et al.*: Epidemiology of giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Arthritis Rheum* 2009; 61:1454-61.
- LIE JT: Illustrated histopathologic classification criteria for selected vasculitis syndromes. American College of Rheumatology Subcommittee on Classification of Vasculitis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1074-87.
- GONZALEZ-GAY MA, GARCIA-PORRUA C: Epidemiology of the vasculitides. *Rheum Dis Clin North Am* 2001; 27: 729-49.
- GONZALEZ-GAY MA, MIRANDA-FILLOY JA, LOPEZ-DIAZ MJ *et al.*: Giant cell arteritis in northwestern Spain: a 25-year epidemiologic study. *Medicine* (Baltimore) 2007; 86: 61-8.
- WEYAND CM, MA-KRUPA W, PRYSHCHER O, GROSCHEL S, BERNARDINO R, GORONZY JJ: Vascular dendritic cells in giant cell arteritis. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1062: 195-208.
- WEYAND CM, YOUNGE BR, GORONZY JJ: IFN-gamma and IL-17: the two faces of T-cell pathology in giant cell arteritis. *Curr Opin Rheumatol* 2011; 23: 43-9.
- CID MC, CAMPO E, ERCILLA G *et al.*: Immunohistochemical analysis of lymphoid and macrophage cell subsets and their immunologic activation markers in temporal arteritis. Influence of corticosteroid treatment. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 884-93.
- ANDERSSON R, JONSSON R, TARKOWSKI A, BENGSSON BA, MALMVALL BE: T cell subsets and expression of immunological activation markers in the arterial walls of patients with giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 915-23.
- ROSSI D, ZLOTNIK A: The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 217-42.
- YOSHIE O, IMAI T, NOMIYAMA H: Chemokines in immunity. *Adv Immunol* 2001; 78: 57-110.
- KOCHI Y, OKADA Y, SUZUKI A *et al.*: A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Nat Genet* 2010; 42: 515-9.
- PALOMINO-MORALES R, TORRES O, VAZQUEZ-RODRIGUEZ TR *et al.*: Association between toll-like receptor 4 gene polymorphism and biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2009; 36: 1501-6.
- GONZALEZ-GAY MA, GARCIA-PORRUA C, VAZQUEZ-CARUNCHO M: Polymyalgia rheumatica in biopsy-proven giant cell arteritis does not constitute a different subset but differs from isolated polymyalgia rheumatica. *J Rheumatol* 1998; 25: 1750-5.
- GONZALEZ-GAY MA, BARROS S, LOPEZ-DIAZ MJ, GARCIA-PORRUA C, SANCHEZ-ANDRADE A, LLORCA J: Giant cell arteritis: disease patterns of clinical presentation in a series of 240 patients. *Medicine* (Baltimore) 2005; 84: 269-76.
- GONZALEZ-GAY MA, LOPEZ-DIAZ MJ, BARROS S *et al.*: Giant cell arteritis: laboratory tests at the time of diagnosis in a series of 240 patients. *Medicine* (Baltimore) 2005; 84: 277-90.
- RUEDA B, LOPEZ-NEVOT M, LOPEZ-DIAZ M *et al.*: A functional variant of vascular endothelial growth factor is associated with severe ischemic complications in giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2005; 32: 1737-41.
- HUNDER GG, BLOCH DA, MICHEL BA *et al.*: The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1122-8.
- GONZALEZ-GAY MA, GARCIA-PORRUA C, LLORCA J, GONZALEZ-LOUZA O, RODRIGUEZ-LEDO P: Biopsy-negative giant cell arteritis: clinical spectrum and predictive factors for positive temporal artery biopsy. *Semin Arthritis Rheum* 2001; 30: 249-56.
- SKOL A, SCOTT L, ABECASIS G, BOEHNK M: Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet* 2006; 38: 209-13.
- PURCELL S, NEALE B, TODD-BROWN K *et al.*: PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 559-75.
- PERKINS EA, LANDIS D, CAUSEY MPH ZL *et al.*: Association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in CCR6, TAGAP and TNFAIP3 with rheumatoid arthritis in African Americans. *Arthritis Rheum* 2011.
- KRUPA WM, DEWAN M, JEON MS *et al.*: Trapping of misdirected dendritic cells in the granulomatous lesions of giant cell arteritis. *Am J Pathol* 2002; 161: 1815-23.
- MA-KRUPA W, JEON MS, SPOERL S, TEDDER TF, GORONZY JJ, WEYAND CM: Activation of arterial wall dendritic cells and breakdown of self-tolerance in giant cell arteritis. *J Exp Med* 2004; 199: 173-83.
- OROZCO G, RUEDA B, MARTIN J: Genetic basis of rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother* 2006; 60: 656-62.
- GONZALEZ-GAY MA, AMOLI MM, GARCIA-PORRUA C, OLLIER WE: Genetic markers of disease susceptibility and severity in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Semin Arthritis Rheum* 2003; 33: 38-48.
- CHO JH, GREGERSEN PK: Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *N Engl J Med* 2011; 365: 1612-23.
- ZENEWICZ LA, ABRAHAM C, FLAVELL RA, CHO JH: Unraveling the genetics of autoimmunity. *Cell* 2010; 140: 791-7.
- COTSAPAS C, VOIGHT BF, ROSSIN E *et al.*: Pervasive sharing of genetic effects in autoimmune disease. *PLoS Genet* 2011; 7: e1002254.
- ZHERNAKOVA A, VAN DIEMEN CC, WIJENGA C: Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 43-55.
- TORRES O, PALOMINO-MORALES R, VAZQUEZ-RODRIGUEZ T *et al.*: Lack of association between IFNGR1 gene polymorphisms and biopsy-proven giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28: 31-4.
- RODRIGUEZ-RODRIGUEZ L, CASTANEDA S, VAZQUEZ-RODRIGUEZ TR *et al.*: Role of the rs6822844 gene polymorphism at the IL2-IL21 region in biopsy-proven giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29 (Suppl. 64): S12-16.
- TORRES O, PALOMINO-MORALES R, VAZQUEZ-RODRIGUEZ TR *et al.*: Lack of association between hypoxia inducible factor-1 alpha gene polymorphisms and biopsy-proven giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28 (Suppl. 57): 40-5.

## Evidence of association of the *NLRP1* gene with giant cell arteritis

Recent studies have focused attention on the involvement of *NLRP1* to confer susceptibility for extended autoimmune/inflammatory disorders, being considered a common risk factor in autoimmunity.<sup>1-3</sup> *NLRP1* provides a scaffold for the assembly of the inflammasome that activates caspases 1 and 5, required for processing and activation of the proinflammatory cytokines interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-18 and IL-33 and promoting inflammation.<sup>4</sup> In this study, we examined for the first time whether *NLRP1* is associated with giant cell arteritis (GCA), a chronic systemic vasculitis affecting large and medium-sized arteries derived from the aorta, in particular the cranial branches of the carotid artery. GCA is the most common vasculitis in the elderly in Western countries with a female predominance.<sup>5</sup> To investigate the possible genetic association of *NLRP1* with this disease, we genotyped a single-nucleotide polymorphism (rs8182352), which has been reported to confer risk to the development of autoimmune processes in previous studies,<sup>1,2</sup> in a total of 3583 individuals, comprising a discovery set from Spain (574 patients diagnosed with biopsy-proven GCA and 2366 healthy controls) and a replication set of subjects from Italy (111 biopsy-proven GCA patients and 532 controls) using a predesigned TaqMan allele discrimination assay. All individuals were of European Caucasian origin. Patients were stratified according to the presence or absence of polymyalgia rheumatica, visual ischaemic manifestations and irreversible occlusive disease, as previously described.<sup>6,7</sup> Approval from the local ethical committees and informed written consent from all participants were obtained. The analysed genetic variant rs8182352 showed statistically significant differences between GCA patients and unaffected



**Figure 1** Genotype distribution and minor allele frequency (MAF) of the *NLRP1* polymorphism rs8182352 in giant cell arteritis (GCA) patients and healthy controls from Caucasian Spanish and Italian populations. The overall statistical power of the analysis was 88% to detect associations with OR=1.2 at the 5% significant level, according to Power Calculator for Genetic Studies 2006 software (<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/CaTS/>). After genotyping, no evidence of departure from Hardy–Weinberg equilibrium was observed in either case or control populations ( $p=0.05$ ). All statistical analyses of allele frequencies were performed using Plink V.1.07 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>). To test for associations, p values were obtained by performing  $2 \times 2$  contingency tables and  $\chi^2$  test and/or Fisher's exact test, when appropriate. ORs and 95% CI were calculated according to Woolf's method. p Values lower than 0.05 were considered as statistically significant. Combined OR was calculated according to a fixed-effects model (Mantel–Haenszel meta-analysis) and the heterogeneity of the ORs among all populations was calculated using the Breslow–Day test. The forest plot was performed with StatsDirect V.2.4.6 (Altrincham, UK). \*p Value for the allelic model. \*\*OR for the minor allele.

controls in the Spanish cohort ( $p=0.012$ , OR=1.18, CI 95% =1.04 to 1.34) and in the combined meta-analysis ( $p=2.62 \times 10^{-3}$ , OR=1.20, CI 95%=1.06 to 1.35) including the Italian cohort (figure 1). Moreover, homozygous carriers of the allele C+ allele C (CC) genotype evidenced increased GCA risk in the combined data in comparison with non-CC carriers ( $p=9.6 \times 10^{-3}$ , OR=1.29, CI 95%=1.07 to 1.55). Despite their different geographical origin, we previously reported no differences in the clinical spectrum of the disease between both populations,<sup>9</sup> and the combinability test according to Breslow–Day method showed no significant heterogeneity in the ORs. When cases were meta-analysed against controls according to the specific clinical features of GCA, only a significant association with visual ischaemic manifestations was observed ( $p=0.014$ , OR=1.29, CI 95%=1.05 to 1.58). In addition, no statistically significant differences were observed when the subphenotype analysis was performed comparing GCA patients positive against those negative for the analysed clinical characteristic (data not shown).

This study shows for the first time that *NLRP1* rs8182352, a polymorphism with no predicted functional role, is associated with GCA in two different European populations. It has been proposed that *NLRP1* is an important regulator of different inflammatory and autoimmunity processes, mainly because of its ability to form the inflammasome that plays a pivotal role in the activation of IL-18 and IL-33.<sup>4</sup> Previous studies evidenced that IL-18, which is expressed by a wide range of immune cells and can mediate both Th1 and Th2 driven immune responses, contributes to the pathogenesis of GCA.<sup>9</sup> Furthermore, this vasculitis is associated with increased inflammatory response,<sup>6</sup> and IL-33 has been characterised as a critical component of the inflammatory disease, with immune cell activation.<sup>10</sup>

In conclusion, we have identified *NLRP1* as a novel GCA susceptibility gene, thus adding another piece to the genetic puzzle underlying the pathogenesis of this complex disease. Our data suggest that the inflammasome may represent a potential target for future therapeutic intervention. However, further studies may be performed to elucidate the possible

causal variant/s of this association and its functional consequence, which is a limitation of this study.

**Aurora Serrano,<sup>1</sup> F David Carmona,<sup>1</sup> Santos Castañeda,<sup>2</sup> Roser Solans,<sup>3</sup> José Hernández-Rodríguez,<sup>4</sup> María C Cid,<sup>4</sup> Sergio Prieto-González,<sup>4</sup> José A Miranda-Filloy,<sup>5</sup> Luis Rodríguez-Rodríguez,<sup>6</sup> Inmaculada C Morado,<sup>6</sup> Carmen Gomez-Vaquero,<sup>7</sup> Ricardo Blanco,<sup>8</sup> Bernardo Sopeña,<sup>9</sup> Norberto Ortego-Centeno,<sup>10</sup> Ainhoa Unzurrunzaga,<sup>11</sup> Begoña Marí-Alfonso,<sup>12</sup> Julio Sánchez-Martín,<sup>13</sup> María Jesús García-Villanueva,<sup>14</sup> Ana Hidalgo-Conde,<sup>15</sup> Giulia Pazzola,<sup>16</sup> Luigi Boiardi,<sup>16</sup> Carlo Salvarani,<sup>16</sup> Miguel A González-Gay,<sup>8</sup> Javier Martín<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada, Spain

<sup>2</sup> Department of Rheumatology, Hospital de la Princesa, IIS-Princesa, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Department of Internal Medicine, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

<sup>4</sup> Vasculitis Research Unit, Department of Autoimmune and Systemic Diseases, Hospital Clínic, University of Barcelona, (IDIBAPS), Barcelona, Spain

<sup>5</sup> Department of Rheumatology, Hospital Xeral-Calde, Lugo, Spain

<sup>6</sup> Department of Rheumatology, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

<sup>7</sup> Department of Rheumatology, Hospital Universitario de Bellvitge-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>8</sup> Department of Rheumatology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, IFIMAV, Santander, Cantabria, Spain

<sup>9</sup> Thrombosis and Vasculitis Unit-Internal Medicine Department, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Vigo, Spain

<sup>10</sup> Department of Internal Medicine, Hospital Clínico San Cecilio, Granada, Spain

<sup>11</sup> Department of Internal Medicine, Hospital de Galdakano, Vizcaya, Spain

<sup>12</sup> Department of Internal Medicine, Corporació Sanitaria Parc Taulí, Institut Universitari Parc Taulí, UAB, Sabadell, Barcelona, Spain

<sup>13</sup> Department of Rheumatology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>14</sup> Department of Rheumatology, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

<sup>15</sup> Department of Internal Medicine, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, Spain

<sup>16</sup> Unita Operativa di Reumatologia, Azienda Ospedaliera ASMN, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, Reggio Emilia, Italy

**Correspondence to** Dr Javier Martín, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, IPBLN-CSIC, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, Armilla (Granada) 18100, Spain; [martin@ipb.csic.es](mailto:martin@ipb.csic.es)

AS and FDC contributed equally. MAG-G and JM share senior authorship.

**Acknowledgements** The authors thank Sofía Vargas, Sonia García and Gema Robledo for their excellent technical assistance, and all the patients and healthy controls for kindly accepting to collaborate. This study was supported by 'Fondo de Investigaciones Sanitarias' through grants PI06-0024 and PS09/00748 (Spain), and partially supported by RETICS Program RD08/0075 (RIER) from 'Instituto de Salud Carlos III' (ISCIII). FDC was supported by Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) through the programme JAE-DOC.

**Contributors** AS, FDC, MAG-G and JM were involved in the conception and design of the study. AS and FDC contributed in the analysis and interpretation of data and in drafting the article. SC, RS, JH-R, MCC, SP-G, JAM-F, LR-R, ICM, CG-V, RB, BS, NO-C, AU, BM-A, JS-M, MJG-V, AH-C, GP, LB, CS and MAG-G collected samples and participated in analysis and interpretation of data. SC, RS, JH-R, MCC, SP-G, JAM-F, LR-R, ICM, CG-V, RB, BS, NO-C, AU, BM-A, JS-M, MJG-V, AH-C, GP, LB, CS, MAG-G and JM revised critically the manuscript draft. All authors approved the final version of the manuscript.

**Funding** None.

**Competing interests** None.

**Patient consent** Obtained.

**Ethics approval** Approval from the local ethical committees of all centres involved in the study was obtained in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

Received 3 September 2012

Accepted 27 November 2012

Published Online First 19 December 2012

*Ann Rheum Dis* 2013;**72**:628–630. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202609

## REFERENCES

1. **Dieude P**, Guedj M, Wipff J, *et al*. NLRP1 influences the systemic sclerosis phenotype: a new clue for the contribution of innate immunity in systemic sclerosis-related fibrosing alveolitis pathogenesis. *Ann Rheum Dis* 2010;**70**:668–74.
2. **Jin Y**, Mailloux CM, Gowan K, *et al*. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med* 2007;**356**:1216–25.
3. **Magitta NF**, Bøe WAS, Johansson S, *et al*. A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. *Genes Immun* 2009;**10**:120–4.
4. **Tschopp J**, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;**4**:95–104.
5. **Gonzalez-Gay MA**, Vazquez-Rodriguez TR, Lopez-Diaz MJ, *et al*. Epidemiology of giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Arthritis Rheum* 2009;**61**:1454–61.
6. **Gonzalez-Gay MA**, Lopez-Diaz MJ, Barros S, *et al*. Giant cell arteritis: laboratory tests at the time of diagnosis in a series of 240 patients. *Medicine (Baltimore)* 2005;**84**:277–90.
7. **Rueda B**, Lopez-Nevot M, Lopez-Diaz M, *et al*. A functional variant of vascular endothelial growth factor is associated with severe ischemic complications in giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2005;**32**:1737–41.
8. **Gonzalez-Gay MA**, Boiardi L, Garcia-Porrua C, *et al*. Geographical and genetic factors do not account for significant differences in the clinical spectrum of giant cell arteritis in southern europe. *J Rheumatol* 2004;**31**:520–3.
9. **Palomino-Morales RJ**, Vazquez-Rodriguez TR, Torres O, *et al*. Association between IL-18 gene polymorphisms and biopsy-proven giant cell arteritis. *Arthritis Res Ther* 2010;**12**:R51.
10. **Xu D**, Jiang HR, Kewin P, *et al*. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;**105**:10913–18.



## CONCISE REPORT

# Identification of the *PTPN22* functional variant R620W as susceptibility genetic factor for giant cell arteritis

A Serrano,<sup>1</sup> A Márquez,<sup>1</sup> S L Mackie,<sup>2</sup> F D Carmona,<sup>1</sup> R Solans,<sup>3</sup> J A Miranda-Filloo,<sup>4</sup> J Hernández-Rodríguez,<sup>5</sup> M C Cid,<sup>5</sup> S Castañeda,<sup>6</sup> IC Morado,<sup>7</sup> J Narváez,<sup>8</sup> R Blanco,<sup>9</sup> B Sopeña,<sup>10</sup> M J García-Villanueva,<sup>11</sup> J Monfort,<sup>12</sup> N Ortego-Centeno,<sup>13</sup> A Unzurrunzaga,<sup>14</sup> B Marí-Alfonso,<sup>15</sup> J Sánchez-Martín,<sup>16</sup> E de Miguel,<sup>17</sup> C Magro,<sup>18</sup> E Raya,<sup>18</sup> N Braun,<sup>19</sup> J Latus,<sup>19</sup> O Molberg,<sup>20</sup> B A Lie,<sup>21,22</sup> F Moosig,<sup>23</sup> T Witte,<sup>24</sup> A W Morgan,<sup>2</sup> M A González-Gay,<sup>9</sup> J Martín,<sup>1</sup> UK GCA Consortium Spanish GCA Consortium

**Handling editor** Tore K Kvien

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203641>).

For numbered affiliations see end of article.

## Correspondence to

Dr Ana Márquez, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Parque Tecnológico Ciencias de la Salud. Avenida del Conocimiento s/n 18016-Armilla (Granada), Spain; [anamaort@ipb.csic.es](mailto:anamaort@ipb.csic.es)

AS, AM and SLM contributed equally to this work. MAGG and JM share senior authorship.

Received 18 March 2013  
Revised 2 July 2013  
Accepted 9 July 2013

## ABSTRACT

**Objective** To analyse the role of the *PTPN22* and *CSK* genes, previously associated with autoimmunity, in the predisposition and clinical phenotypes of giant cell arteritis (GCA).

**Methods** Our study population was composed of 911 patients diagnosed with biopsy-proven GCA and 8136 unaffected controls from a Spanish discovery cohort and three additional independent replication cohorts from Germany, Norway and the UK. Two functional *PTPN22* polymorphisms (rs2476601/R620W and rs33996649/R263Q) and two variants of the *CSK* gene (rs1378942 and rs34933034) were genotyped using predesigned TaqMan assays.

**Results** The analysis of the discovery cohort provided evidence of association of *PTPN22* rs2476601/R620W with GCA ( $P_{FDR}=1.06E-04$ ,  $OR=1.62$ ,  $CI\ 95\% 1.29$  to  $2.04$ ). The association did not appear to follow a specific GCA subphenotype. No statistically significant differences between allele frequencies for the other *PTPN22* and *CSK* genetic variants were evident either in the case/control or in stratified case analysis. To confirm the detected *PTPN22* association, three replication cohorts were genotyped, and a consistent association between the *PTPN22* rs2476601/R620W variant and GCA was evident in the overall meta-analysis ( $P_{MH}=2.00E-06$ ,  $OR=1.51$ ,  $CI\ 95\% 1.28$  to  $1.79$ ).

**Conclusions** Our results suggest that the *PTPN22* polymorphism rs2476601/R620W plays an important role in the genetic risk to GCA.

## INTRODUCTION

Giant cell arteritis (GCA) is a chronic vasculitis that shows a complex aetiology derived from the interaction between both genetic and environmental factors.<sup>1</sup> Similar to most immune-related disorders, the highest susceptibility signals belong to the human leukocyte antigen region. However, different studies have highlighted that genes involved in inflammation pathways may also be implicated in GCA susceptibility.<sup>2</sup> In spite of these findings, the genetic background of this condition is still poorly understood.

Although the aetiology of GCA remains unclear, it is well known that innate and adaptive immune responses are involved in its pathogenesis. Several lines of evidence indicate that this vasculitis is a T cell-mediated disease with both Th17 and Th1 cells contributing to inflammation. While Th1 response is associated with chronically persistent vascular lesions, Th17 immunity appears to be more important for acute manifestations, both systemically and in the blood vessels.<sup>3 4</sup>

The *PTPN22*/*CSK* pathway is a master regulator of autoimmunity, with a key role in the negative control of the signalling mediated by the T cell receptor (TCR).<sup>5</sup> Interestingly, several single-nucleotide polymorphisms (SNPs) located within these two genes have been associated with autoimmunity,<sup>6–11</sup> suggesting that this is one of the molecular pathways shared by different autoimmune disorders.

Regarding *PTPN22*, it has been reported that two autoimmune disease-associated variants, rs2476601 (R620W) and rs33996649 (R263Q) influence the function of the protein.<sup>12 13</sup> On the other hand, two *CSK* polymorphisms, rs34933034 and rs1378942, were recently identified as susceptibility factors for systemic sclerosis<sup>11</sup> and systemic lupus erythematosus (SLE),<sup>10</sup> respectively. A functional role for the *CSK* genetic variant rs34933034\*A in SLE patients has been proposed in a recent study.<sup>10</sup>

Based on this, we decided to assess the role of the disease-associated *PTPN22* and *CSK* polymorphisms in both predisposition to and the clinical phenotypes of GCA.

## METHODS

### Study population

A total of 911 GCA patients and 8136 unrelated healthy controls were included in this study. First, we analysed a discovery cohort of 623 GCA patients and 1729 healthy controls of Spanish Caucasian ancestry. Subsequently, three independent replication cohorts were analysed (72 GCA and 937 controls from Germany; 60 GCA and 271

**To cite:** Serrano A, Márquez A, Mackie SL, et al. *Ann Rheum Dis* Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/annrheumdis-2013-203641

## Basic and translational research

controls from Norway; 156 GCA and 5199 controls from the UK). Case and control sets were matched by geographical origin and ethnicity, but not by age, which may represent a limitation of the study. *PTPN22* rs2476601 genotype data from the control population of Germany were obtained from Hüffmeier *et al.*,<sup>14</sup> since this set matched geographically and ethnically our German GCA cohort. More detailed information about the UK controls can be obtained from Morgan *et al.*<sup>15</sup> Informed written consent from all participants and approval from the local ethical committees were obtained in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki. All patients had a positive temporal artery biopsy (disruption of the internal elastic laminae with infiltration of mononuclear cells into the arterial wall with or without multinucleated giant cells) and fulfilled the 1990 American College of Rheumatology classification criteria for GCA.<sup>16</sup> In the subphenotype analysis, the patients were stratified according to manifestations of polymyalgia rheumatica (PMR) and the presence or absence of visual ischaemic manifestations (VIM; if they experienced transient visual loss including amaurosis fugax, permanent visual loss or diplopia) and irreversible occlusive disease (IOD; if they had at least one of the following features: permanent visual loss, stroke or occlusive disease in the upper extremities or lower extremities).

## Genotyping methods

Genomic DNA was extracted from peripheral white blood cells using standard procedures. Two SNPs located within *PTPN22*, rs2476601/R620W and rs33996649/R263Q, and two SNPs located within *CSK*, rs1378942 and rs34933034, were genotyped using the TaqMan allelic discrimination assay technology

on a 7900HT Fast Real-Time PCR System, both from Applied Biosystems (Foster City, California, USA). For the UK samples, rs2476601/R620W was genotyped by direct sequencing.

## Statistical analysis

The overall statistical power of the analysis, according to Power Calculator for Genetic Studies 2006 software (<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/CaTS/>), is shown in online supplementary table S1. Plink (v1.07) (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) and StatsDirect V.2.6.6 (StatsDirect Ltd, Cheshire, UK) were used to perform 2×2 contingency tables and  $\chi^2$  test and/or Fisher's exact test. ORs and 95% CIs were obtained according to Woolf's method. The Benjamini and Hochberg (1995) step-up false discovery rate (FDR) control correction for multiple testing<sup>17</sup> was applied to the p values of the discovery cohort. After correction, p values lower than 0.05 were considered statistically significant. The allelic combinations were tested using Plink and Haploview (V.4.2). The analysis of the combined data from all populations was performed using Plink and StatsDirect. Breslow–Day (BD) test method was used to estimate the homogeneity among populations. Pooled analyses were performed by Mantel–Haenszel test under fixed effects.

## RESULTS

After genotyping, no divergence from Hardy–Weinberg equilibrium was observed either in controls or cases ( $p > 0.01$ ), and control allelic frequencies were similar to those previously reported in equivalent European Caucasian populations.<sup>8 10 11</sup>

First, we conducted an association study in a case–control set of Spanish Caucasian origin. As shown in table 1, when allelic frequencies were compared between cases and controls, a clear

**Table 1** Genotype and allele distribution of *PTPN22* rs2476601, rs33996649 and *CSK* rs1378942, rs34933034 in Spanish biopsy-proven GCA patients and healthy controls

SNP	Locus	1/2	Subgroup (N)	Genotype, N (%)			MAF (%)	Allele test		
				1/1	1/2	2/2		p Value*	$P_{FDR}^\dagger$	OR (CI 95%)‡
rs2476601	<i>PTPN22</i>	A/G	Controls (n=1729)	13 (0.75)	200 (11.57)	1516 (87.68)	6.54			
			GCA (n=623)	4 (0.64)	119 (19.10)	500 (80.26)	10.19	2.66E-05	1.06E-04	1.62 (1.29 to 2.04)
			PMR+ (n=259)	2 (0.77)	53 (20.46)	204 (78.76)	11.00	2.26E-04	9.02E-04	1.77 (1.30 to 2.40)
			VIM+ (n=168)	1 (0.60)	36 (21.43)	131 (77.98)	11.31	1.03E-03	4.10E-03	1.82 (1.27 to 2.62)
			IOD+ (n=96)	2 (2.08)	21 (21.88)	73 (76.04)	13.02	5.47E-04	2.19E-03	2.14 (1.38 to 3.33)
rs33996649	<i>PTPN22</i>	T/C	Controls (n=1729)	4 (0.23)	110 (6.36)	1615 (93.41)	3.41			
			GCA (n=623)	1 (0.16)	39 (6.26)	583 (93.58)	3.29	0.838	0.919	0.96 (0.67 to 1.38)
			PMR+ (n=259)	0 (0.00)	12 (4.63)	247 (95.37)	2.32	0.191	0.382	0.67 (0.37 to 1.23)
			VIM+ (n=168)	0 (0.00)	12 (7.14)	156 (92.86)	3.57	0.878	0.878	1.05 (0.57 to 1.92)
			IOD+ (n=96)	0 (0.00)	6 (6.25)	90 (93.75)	3.13	0.831	0.831	0.91 (0.40 to 2.10)
rs1378942	<i>CSK</i>	C/A	Controls (n=1729)	281 (16.25)	798 (46.15)	650 (37.59)	39.33			
			GCA (n=623)	129 (20.71)	230 (36.92)	264 (42.38)	39.17	0.919	0.919	0.99 (0.87 to 1.13)
			PMR+ (n=259)	55 (21.24)	99 (38.22)	105 (40.54)	40.35	0.658	0.756	1.04 (0.86 to 1.26)
			VIM+ (n=168)	34 (20.24)	69 (41.07)	65 (38.69)	40.77	0.605	0.807	1.06 (0.85 to 1.33)
			IOD+ (n=96)	20 (20.83)	39 (40.63)	37 (38.54)	41.15	0.616	0.822	1.08 (0.80 to 1.45)
rs34933034	<i>CSK</i>	A/G	Controls (n=1729)	72 (4.16)	537 (31.06)	1120 (64.78)	19.69			
			GCA (n=623)	21 (3.37)	176 (28.25)	426 (68.38)	17.50	0.091	0.182	0.86 (0.73 to 1.02)
			PMR+ (n=259)	10 (3.86)	79 (30.50)	170 (65.64)	19.11	0.756	0.756	0.96 (0.76 to 1.22)
			VIM+ (n=168)	7 (4.17)	47 (27.98)	114 (67.86)	18.15	0.497	0.807	0.90 (0.68 to 1.21)
			IOD+ (n=96)	5 (5.21)	24 (25.00)	67 (69.79)	17.71	0.500	0.822	0.88 (0.60 to 1.28)

\*All p values have been calculated for the allelic model.

†Benjamini and Hochberg step-up FDR control.

‡OR for the minor allele.

FDR, false discovery rate; GCA, giant cell arteritis; IOD, irreversible occlusive disease; MAF, minor allele frequency; PMR, polymyalgia rheumatica; SNP, single-nucleotide polymorphism; VIM, visual ischaemic manifestations.

**Table 2** Replication and pooled analysis of the *PTPN22* rs2476601 variant in Caucasian biopsy-proven GCA patients and controls

Population	Subgroup (N)	Genotype, N (%)			MAF (%)	Allele test	
		1/1	1/2	2/2		p Value*	OR (CI 95%)†
Germany	Controls (n=937)	9 (0.98)	164 (17.94)	741 (81.07)	9.96	0.9280	0.97 (0.54 to 1.73)
	GCA (n=72)	0 (0.00)	14 (19.44)	58 (80.56)	9.72		
Norway	Controls (n=271)	1 (0.37)	56 (20.66)	214 (78.97)	10.70	0.0376	1.77 (1.03 to 3.05)
	GCA (n=60)	1 (1.67)	19 (31.67)	40 (66.67)	17.50		
UK	Controls (n=5199)	42 (0.80)	933 (17.95)	4224 (81.25)	9.78	0.0319	1.44 (1.03 to 2.00)
	GCA (n=156)	3 (1.92)	36 (23.08)	117 (75.00)	13.46		
Replication meta-analysis‡	Controls (n=6384)	52 (0.81)	1153 (18.06)	5179 (81.12)	9.84	0.0154	1.38 (1.07 to 1.77)
	GCA (n=288)	4 (1.39)	69 (23.96)	215 (74.65)	13.37		
Overall meta-analysis§	Controls (n=8113)	65 (0.80)	1353 (16.68)	6695 (82.52)	9.14	2.00E-06	1.51 (1.28 to 1.79)
	GCA (n=911)	8 (0.88)	188 (20.64)	715 (78.49)	11.20		

\*All p values have been calculated for the allelic model.

†OR for the minor allele.

‡Including independent cohorts from Germany, Norway and UK.

§Including independent cohorts from Spain, Germany, Norway and UK.

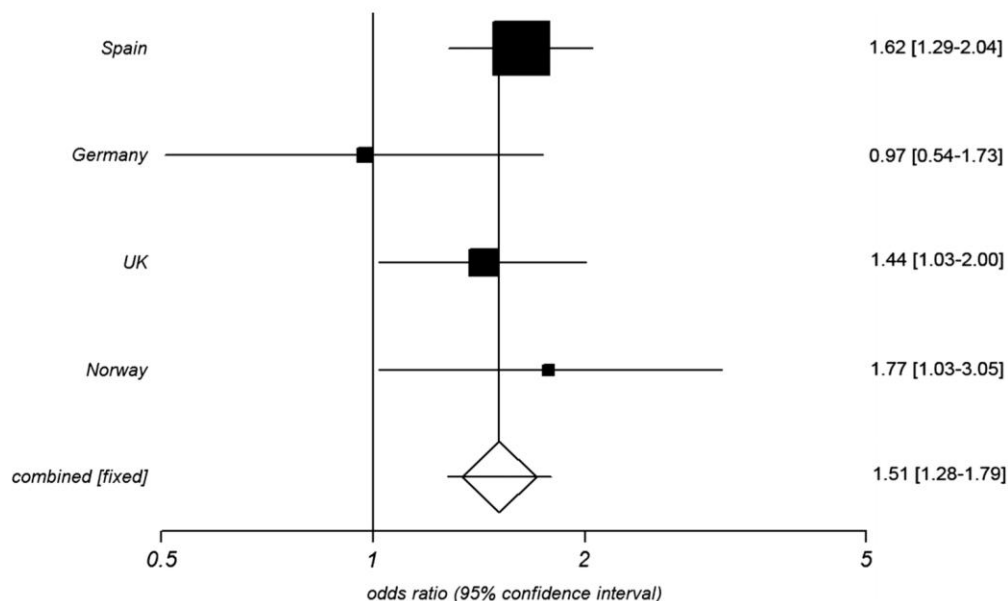
GCA, giant cell arteritis.

association of the *PTPN22* rs2476601/R620W\*A allele with GCA was observed ( $P_{FDR}=1.06E-04$ , OR=1.62, CI 95% 1.29 to 2.04). Subsequently, to examine whether *PTPN22* and *CSK* polymorphisms might influence the clinical manifestations of the disease, GCA patients were stratified according to the presence of PMR, VIM and IOD (table 1). Consistently, the subphenotype analysis also reached statistical significance for the rs2476601 polymorphism (PMR+ vs controls:  $P_{FDR}=9.02E-04$ , OR=1.77, CI 95% 1.30 to 2.40; VIM+ vs controls:  $P_{FDR}=4.10E-03$ , OR=1.82, CI 95% 1.27 to 2.62; IOD+ vs controls:  $P_{FDR}=2.19E-03$ , OR=2.14, CI 95% 1.38 to 3.33). However, no statistically significant differences between GCA patients with and without these clinical characteristics were observed (data not shown). No association with any other *PTPN22* and *CSK* genetic variants was evident either in the case/control or subphenotype analysis (table 1).

To follow-up the positive finding of an association between *PTPN22* rs2476601/R620W and GCA in the Spanish

population, we attempted to confirm the detected association in a replication set of three independent cohorts of Caucasian ancestry. No heterogeneity between the ORs from the three replication cohorts was evident by BD test ( $p=0.05$ ), and therefore a combined meta-analysis was performed (table 2 and online supplementary table S2). Statistically significant differences were observed for the *PTPN22* rs2476601\*A allele in the pooled analysis ( $P_{MH}=0.0154$ , OR=1.38, CI 95% 1.07 to 1.77) (table 2). Subsequently, the overall meta-analysis including both the discovery and the three replication cohorts showed a consistent association between the *PTPN22* rs2476601\*A variant and GCA ( $P_{MH}=2.00E-06$ , OR=1.51, CI 95% 1.28 to 1.79; figure 1). Again, no significant differences were found when GCA patients with and without specific clinical features were compared (data not shown).

The comparisons of the different detected allelic combinations between cases and controls did not yield additional information (data not shown).

**Figure 1** Forest plot showing the ORs and CIs of the *PTPN22* rs2476601 association in the discovery and replication cohorts. OR and CI were calculated under the fixed effect model.

## DISCUSSION

Our data indicate, for the first time, an important role for *PTPN22* in the genetic susceptibility of GCA. The combined analysis of the four independent cohorts showed a strong association between the *PTPN22* rs2476601/R620W variant and this disease. The effect size detected in our study (OR=1.51) is similar to that described for other autoimmune conditions, such as rheumatoid arthritis (OR=1.45), SLE (OR=1.45) or type 1 diabetes mellitus (OR>1.80)<sup>6 7</sup> and, interestingly, for other vasculitides, such as Behçet's disease (OR>2.0) or antineutrophil cytoplasmic antibodies-associated vasculitis (OR>1.90).<sup>18 19</sup> Despite this, a previous study failed to show association between *PTPN22* rs2476601 and GCA<sup>20</sup>; however, it should be noted that the statistical power of this study was compromised because of the small sample size included in this report (96 GCA cases and 229 controls). In the subphenotype analysis, no specific association with any analysed clinical feature was observed, indicating that this variant may represent a risk factor for the global disease. Nevertheless, this should be taken with caution because of the low statistical power, which was a limitation of this stratified analysis.

Regarding *CSK*, our analysis had enough statistical power to detect a possible weak signal (power > 80% to detect an OR>1.25 in the discovery cohort); therefore, it is unlikely that *CSK* may play an important role in GCA susceptibility. Since an association between *PTPN22* and GCA was observed, it makes sense that its interacting partner, *CSK*, may also play a role in this pathology, but in most of the diseases in which an involvement of *PTPN22* has been described, an association with *CSK* has not been reported. Nevertheless, an effect of other *CSK* polymorphisms, showing low linkage disequilibrium with those analysed in our study, in GCA susceptibility cannot be discarded.

Initially, the *PTPN22* allele rs2476601\*A, located within a protein-protein interaction domain, was reported as a gain-of-function allele that causes a decrease in TCR signalling.<sup>12</sup> However, a recent study has reported that this variant is a loss-of-function allele, leading to an accelerated degradation of *lyp* that results in enhanced signalling in several immune cell types.<sup>13</sup> Although the mechanisms underlying the role of the *PTPN22* rs2476601 genetic variant in autoimmunity remain unclear, the association of this SNP with GCA suggests that a deregulation of TCR signalling is involved in the pathophysiological mechanisms of this vasculitis.

## Author affiliations

- <sup>1</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada, Spain
- <sup>2</sup>NIHR-Leeds Musculoskeletal Biomedical Research Unit, Leeds Institute of Rheumatic and Musculoskeletal Medicine, University of Leeds, Leeds, West Yorkshire, UK
- <sup>3</sup>Department of Internal Medicine, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain
- <sup>4</sup>Department of Rheumatology, Hospital Xeral-Calde, Lugo, Spain
- <sup>5</sup>Department of Autoimmune and Systemic Diseases, Vasculitis Research Unit, Hospital Clinic, University of Barcelona, Centre de Recerca Biomèdica Cellex (IDIBAPS), Barcelona, Spain
- <sup>6</sup>Department of Rheumatology, Hospital de la Princesa, IIS-Princesa, Madrid, Spain
- <sup>7</sup>Department of Rheumatology, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain
- <sup>8</sup>Department of Rheumatology, Hospital Universitario de Bellvitge-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain
- <sup>9</sup>Department of Rheumatology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, IFIMAV, Santander, Spain
- <sup>10</sup>Department of Internal Medicine, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Spain
- <sup>11</sup>Department of Rheumatology, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain
- <sup>12</sup>Department of Rheumatology, Grup de recerca cel·lular en inflamació i cartílag. IMIM (Institut de Recerca Hospital del Mar), Barcelona, Spain
- <sup>13</sup>Department of Internal Medicine, Hospital Clínico San Cecilio, Granada, Spain
- <sup>14</sup>Department of Internal Medicine, Hospital de Galdakano, Vizcaya, Spain
- <sup>15</sup>Department of Internal Medicine, Corporació Sanitària Parc Taulí, Institut Universitari Parc Taulí, UAB, Sabadell, Barcelona, Spain
- <sup>16</sup>Department of Rheumatology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain
- <sup>17</sup>Department of Rheumatology, Hospital Universitario de La Paz, Madrid, Spain

<sup>18</sup>Department of Rheumatology, Hospital Clínico Universitario San Cecilio, Granada, Spain

<sup>19</sup>Department of Internal Medicine, Division of Nephrology, Robert-Bosch-Hospital, Stuttgart, Germany

<sup>20</sup>Department of Rheumatology, Oslo University Hospital, Oslo, Norway and Institute of Clinical Medicine, University of Oslo, Oslo, Norway

<sup>21</sup>Department of Medical Genetics, University of Oslo and Oslo University Hospital, Oslo, Norway

<sup>22</sup>Department of Immunology, Oslo University Hospital and University of Oslo, Oslo, Norway

<sup>23</sup>Department of Clinical Immunology and Rheumatology, University of Luebeck, Bad Bramstedt, Germany

<sup>24</sup>Hannover Medical School, Hannover, Germany

**Acknowledgements** The authors thank Sofia Vargas, Sonia García and Gema Robledo for their excellent technical assistance, and all the patients and healthy controls for kindly accepting their essential collaboration. Banco Nacional de ADN (University of Salamanca, Spain) is thanked for supplying part of the control material. The Norwegian Systemic Vasculitis and Connective Tissue Disease Registry (NOSVAR) at Oslo University Hospital is acknowledged for providing data on the Norwegian patients and the Norwegian Bone Marrow Donor Registry is acknowledged for providing the Norwegian controls.

**Contributors** FDC, AWM, MAG-G and JM were involved in the conception and design of the study. AS, AM, SLM and FDC contributed in the analysis and interpretation of data. AM and AS drafted the manuscript. RS, JAM-F, JH-R, MCC, SC, ICM, JN, RB, BS, MJG-V, JM, NO-C, AU, BM-A, JSM, EdM, CM, ER, NB, JL, OM, BAL, FM, TW, AWM and MAG-G collected samples and participated in analysis and interpretation of data. FDC, SLM, JM, MAG-G, RS, JAM-F, JH-R, MCC, SC, ICM, JN, RB, BS, MJG-V, JM, NO-C, AU, BM-A, JSM, EDM, CM, ER, NB, JL, OM, BAL, FM, TW and AWM revised critically the manuscript draft. All authors approved the final version of the manuscript.

**Funding** This study was supported by 'Fondo de Investigaciones Sanitarias' through grants PI06-0024 and PS09/00748 (Spain), and partially supported by RETICS Program RD08/0075 (RIER) from 'Instituto de Salud Carlos III' (ISCIII). FDC was supported by Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) through the program JAE-DOC. MCC and JH-R were granted by SAF 11/30073. TW was granted by DFG WI 1031/6.1. SLM was supported by a Clinical Lectureship from the National Institute for Health Research, UK, and by a grant from the Wellcome Trust/ Academy of Medical Sciences.

**Competing interests** None.

**Patient consent** Obtained.

**Ethics approval** The Ethical Board of each participating centre.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

## REFERENCES

- 1 Gonzalez-Gay MA, Vazquez-Rodríguez TR, Lopez-Diaz MJ, *et al*. Epidemiology of giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Arthritis Rheum* 2009;61:1454–61.
- 2 Ly KH, Regent A, Tamby MC, *et al*. Pathogenesis of giant cell arteritis: More than just an inflammatory condition? *Autoimmun Rev* 2010;9:635–45.
- 3 Deng J, Younge BR, Olshen RA, *et al*. Th17 and Th1 T-cell responses in giant cell arteritis. *Circulation* 2010;121:906–15.
- 4 Espigol-Frigolè G, Corbera-Bellalta M, Planas-Rigol E, *et al*. Increased IL-17A expression in temporal artery lesions is a predictor of sustained response to glucocorticoid treatment in patients with giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1481–7.
- 5 Levinson NM, Seeliger MA, Cole PA, *et al*. Structural basis for the recognition of c-Src by its inactivator Csk. *Cell* 2008;134:124–34.
- 6 Bottini N, Musumeci L, Alonso A, *et al*. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 2004;36:337–8.
- 7 Orozco G, Sanchez E, Gonzalez-Gay MA, *et al*. Association of a functional single-nucleotide polymorphism of *PTPN22*, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005;52:219–24.
- 8 Diaz-Gallo LM, Gourh P, Broen J, *et al*. Analysis of the influence of *PTPN22* gene polymorphisms in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2011;70:454–62.
- 9 Rodriguez-Rodriguez L, Taib WR, Topless R, *et al*. The *PTPN22* R263Q polymorphism is a risk factor for rheumatoid arthritis in Caucasian case-control samples. *Arthritis Rheum* 2011;63:365–72.
- 10 Manjarrez-Orduno N, Marasco E, Chung SA, *et al*. *CSK* regulatory polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus and influences B-cell signaling and activation. *Nat Genet* 2012;44:1227–30.
- 11 Martin JE, Broen JC, Carmona FD, *et al*. Identification of *CSK* as a systemic sclerosis genetic risk factor through Genome Wide Association Study follow-up. *Hum Mol Genet* 2012;21:2825–35.

- 12 Vang T, Congia M, Macis MD, *et al.* Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet* 2005;37:1317–19.
- 13 Zhang J, Zahir N, Jiang Q, *et al.* The autoimmune disease-associated PTPN22 variant promotes calpain-mediated Lyp/Pep degradation associated with lymphocyte and dendritic cell hyperresponsiveness. *Nat Genet* 2011;43:902–7.
- 14 Huffmeier U, Steffens M, Burkhardt H, *et al.* Evidence for susceptibility determinant(s) to psoriasis vulgaris in or near PTPN22 in German patients. *J Med Genet* 2006;43: 517–22.
- 15 Morgan AW, Thomson W, Martin SG, *et al.* Reevaluation of the interaction between HLA-DRB1 shared epitope alleles, PTPN22, and smoking in determining susceptibility to autoantibody-positive and autoantibody-negative rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population. *Arthritis Rheum* 2009;60:2565–76.
- 16 Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, *et al.* The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1122–8.
- 17 Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 1995;57:289–300.
- 18 Baranathan V, Stanford MR, Vaughan RW, *et al.* The association of the PTPN22 620W polymorphism with Behcet's disease. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1531–3.
- 19 Martorana D, Maritati F, Malerba G, *et al.* PTPN22 R620W polymorphism in the ANCA-associated vasculitides. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51:805–12.
- 20 Gonzalez-Gay MA, Oliver J, Orozco G, *et al.* Lack of association of a functional single nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with susceptibility to biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2005;32:1510–12.

## 5. DISCUSIÓN

Los estudios de asociación caso-control que estudian polimorfismos en genes candidatos, constituyen una de las principales herramientas en la identificación de variantes genéticas potencialmente implicadas tanto en la susceptibilidad como en las características clínicas de las enfermedades autoinmunes [180-183].

Los estudios de asociación pretenden detectar la asociación entre un gen candidato y una patología mediante la detección de diferencias significativas en las frecuencias genotípicas y/o alélicas entre casos y controles [229], para ello, se identifica un set de casos diagnosticados según unos criterios y una muestra independiente de individuos no afectados de la misma población. En este tipo de estudios el efecto se mide mediante la “odds ratio” (OR) que es la razón de dos cocientes: el número de pacientes portadores del alelo de riesgo entre el número de pacientes no portadores y el número de controles portadores del alelo de riesgo entre el número de controles no portadores.

En los estudios de asociación poblacionales el tipo de polimorfismo genético habitualmente analizado son los llamados SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), que son variantes de un solo nucleótido que están presentes en al menos un 1% de la población. Los principales SNPs usados en nuestros estudios son aquellos localizados en zonas potencialmente funcionales del gen, zonas promotoras o codificantes.

Para la selección de SNPs se emplea el concepto de desequilibrio de ligamiento (LD, Linkage disequilibrium), que se define como la asociación que no ocurre al azar entre dos alelos que se encuentran en diferentes posiciones en una población. Esto ocurre porque los dos alelos se heredan juntos más frecuentemente que lo que cabría esperar basándose en la frecuencia alélica de la población. Los patrones de LD que observamos en diferentes poblaciones son el resultado de recombinación, mutación, migración, deriva aleatoria, selección, apareamiento no al azar y tamaño poblacional [230]. Así que, el desequilibrio de ligamiento varía de unas poblaciones a otras y por ello, en este tipo de estudios, es importante que los resultados sean replicados en distintas poblaciones así como analizar más de un marcador, puesto que un resultado positivo podría deberse al particular LD que hubiera en una población concreta. Normalmente el LD en los estudios genéticos, es medido mediante la  $D'$  unidireccional y la  $r^2$  bidireccional. Cuando el LD es

completo  $D'=1$  y  $r^2=1$  [231]. Al realizar un tagging se selecciona solo un SNP entre todos aquellos que presentan elevado  $r^2$  entre ellos.

Aunque los estudios de asociación de genes candidato, tienen varias limitaciones, gracias a ellos se han podido identificar las asociaciones con la ACG más fuertes aparte de los genes *HLA* hasta la fecha como es el caso del gen *NLRP1* y *PTPN22* que se describen a continuación.

## 5.1. Genes estudiados asociados con ACG

### 5.1.1. *NLRP1*

Estudios recientes han determinado que *NLRP1* sea considerado como un factor de riesgo común en la autoinmunidad [232-234]. Así que, con la finalidad de confirmar la posible asociación genética de *NLRP1* con la ACG se genotipó el polimorfismo rs8182352 de dicho gen, obteniendo como resultado una clara asociación por primera vez de este gen con la ACG tanto en la población española como en la población italiana, dicho polimorfismo había sido reportado como un gen de riesgo en el desarrollo de los procesos autoinmunes en estudios anteriores.

Un total de 3.583 personas, con procedencia española (574 pacientes de ACG con diagnóstico confirmado por biopsia y 2.366 controles sanos) y un conjunto de replicación de sujetos procedentes de Italia (111 pacientes y 532 controles), todos ellos de origen caucásico fueron analizados. Los pacientes fueron estratificados de acuerdo a la presencia o ausencia de PMR, manifestaciones visuales isquémicas (VIM) y enfermedad oclusiva irreversible (IOD). La variante genética analizada, rs8182352, mostró diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con ACG y controles no afectados tanto en la cohorte española ( $P = 0,012$ ,  $OR = 1,18$ ,  $IC\ 95\ \% = 1,04$  a  $1,34$ ) como en el meta- análisis combinado ( $P = 2.62 \times 10^{-3}$ ,  $OR = 1,20$ ,  $IC\ 95\ \% = 1,06$ - $1,35$ ), incluyendo la cohorte italiana. A pesar de su origen geográfico diferente, según el test de Breslow- Day no se mostró heterogeneidad significativa en las cohortes. Cuando los datos fueron meta-analizados de acuerdo a las características clínicas específicas de la ACG, sólo se observó una asociación significativa con VIM ( $P = 0,014$ ,  $OR = 1,29$ ,  $IC\ 95\ \% = 1,05$ - $1,58$ ). Este estudio es de gran relevancia para la fisiopatología de la ACG, ya que, por primera vez se ha examinado el gen *NLRP1* en una amplia cohorte española y posteriormente se replicó en otra población italiana.

NLRP1 es una proteína citoplasmática que estimula la inmunidad innata mediante la detección de productos microbianos endógenos y estrés metabólico y participa en el ensamblaje del inflamasoma que activa las caspasas 1 y 5, y es requerida para el procesamiento y la activación de citoquinas proinflamatorias como la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-18 e IL-33 y promover la inflamación [235, 236]. Parece ser que la sobreexpresión de este gen induce a la apoptosis en las células. En este sentido, se ha propuesto al gen *NLRP1* como un importante regulador de diferentes procesos inflamatorios y de autoinmunidad, principalmente debido al papel que desempeña en la formación del inflamasoma, fundamental que en la activación de IL - 18 e IL - 33 [235, 236]. Estudios previos demuestran que la IL -18, que se expresa mediante una amplia gama de células inmunes y produce tanto Th1 y Th2 median respuestas inmunológicas impulsadas, contribuye a la patogénesis de ACG [237]. Por otra parte, esta vasculitis se asocia con mayor respuesta inflamatoria [238], y la IL-33 ha sido caracterizada como un componente crítico de la enfermedad inflamatoria, con activación de células inmunes [236].

En conclusión, gracias a este estudio caso-control de una cohorte española y una replicación, se identificó por primera vez al polimorfismo rs8182352 en el gen *NLRP1* como un nuevo factor de riesgo genético para la ACG, indicando que el inflamasoma puede ser relevante en la fisiopatología de esta enfermedad [235] y añadiendo otra pieza del rompecabezas genético subyacente a la patogénesis de esta compleja enfermedad. Así mismo, nuestros datos también sugieren que el inflamasoma puede representar un objetivo potencial para la futura intervención terapéutica.



### 5.1.2. PTPN22

Las proteín tirosín fosfatasas (PTPs) son reguladores de la transducción de señales en las células T, que junto con las proteín tirosín quinasa (PTKs), regulan la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, de manera reversible, siendo este un mecanismo fundamental en la regulación y transducción de señales de muchos procesos fisiológicos, entre los que se encuentra la regulación de la respuesta inmune [239]. Diversos estudios han puesto de manifiesto que incluso el hecho de pequeñas modificaciones en las PTPs pueden inducir una disfunción inmunológica y por lo tanto provocar enfermedades autoinmunes [239]. En este sentido, se conoce que *PTPN22*, que codifica para la fosfatasa específica de linfocitos, LYP, que junto con la quinasa intracelular CSK, inhibe la señalización del TCR como se muestra en la siguiente figura.

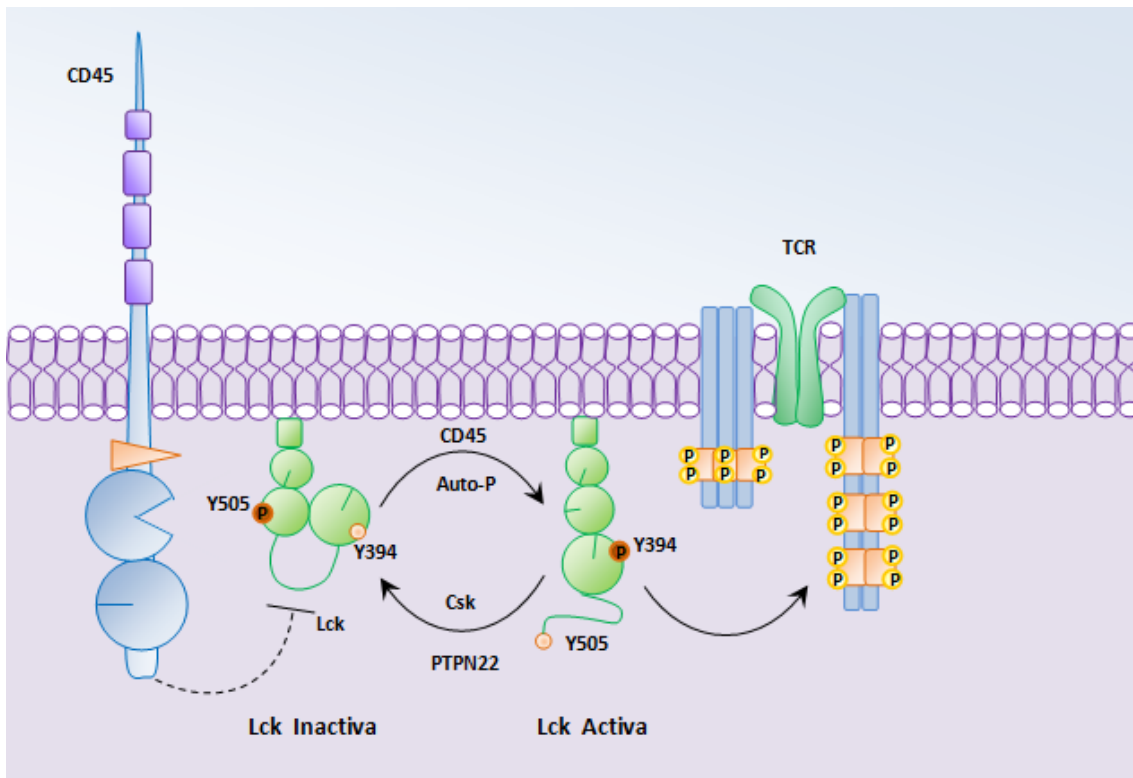


Figura 9. Proteín tirosina fosfatasa en linfocitos y autoinmunidad. En las células T, CD45 inicia la activación de Lck por la desfosforilación de su residuo de tirosina C-terminal de inhibidor (Tyr505). La activación completa de Lck requiere la autofosforilación en otra tirosina (Tyr394) situada en el dominio de la quinasa. Cuando esté completamente activado, Lck media la fosforilación de la tirosina de las subunidades de señalización del TCR, un evento que se necesita para la activación de las células.

Figura adaptada de Nature Immunology, 2012, 13: 439–447

Cuando el TCR reconoce al antígeno y se activa, CD45 desfosforila la tirosina Y 505 de LCK y esta se autofosforila en la posición Y394, activándose así la cascada de transducción de señales que desencadenará la activación de la célula T. No obstante, PTPN22 es capaz de regular negativamente a LCK, eliminando el fosfato activador en la posición Y394 junto a CSK que vuelve a fosforilar a LCK en Y505. De esta forma, LYP inhibe la activación de la célula T [240].

Como hemos comentado con anterioridad, la regulación de la respuesta T es fundamental en la patogénesis de la ACG, la diferenciación y desarrollo de las células T así como sus funciones, están controlados por la activación de rutas de señalización intracelular, de modo que anormalidades en estas rutas de señalización del TCR pueden resultar en enfermedades autoinmunes, a causa de los efectos en la proliferación de las células T, apoptosis, cambio en el citoesqueleto, producción de citoquinas entre otros de los procesos regulados por el TCR en células T. En este sentido, la señalización mediante TCR ha sido objetivo de estudio en la ACG y en muchas otras enfermedades autoinmunes. Por lo tanto, genes relacionados con la activación y la diferenciación de las células T son buenos candidatos para la búsqueda de marcadores de susceptibilidad a la ACG. Teniendo esto en consideración, pensamos que los polimorfismos rs2476601/R620W y rs33996649/R263Q de *PTPN22* podrían estar implicados en la susceptibilidad de la ACG al igual que han sido asociados con otras enfermedades autoinmunes.

Como ha sido reportado, el alelo rs2476601\* A, localizado en un dominio de interacción proteína-proteína, causa una disminución en la señalización de TCR [241]. Y en un estudio posterior, se ha informado de que esta variante es un alelo de pérdida de función, que conduce a una degradación acelerada de los Lyp que resulta en la señalización en varias células inmunes [216]. Nuestros datos del análisis combinado de cuatro cohortes independientes analizadas, mostraron una fuerte asociación entre la variante rs2476601/R620W de *PTPN22* y esta enfermedad. Estos datos indican, por primera vez, un papel importante para *PTPN22* en la susceptibilidad genética de la ACG. El efecto detectado en nuestro estudio mostrando una (OR = 1,51 ), similar al que ha sido descrito para otras enfermedades autoinmunes , como la artritis reumatoide (OR = 1,45), LES (OR = 1,45) o la diabetes mellitus tipo 1 (O > 1,80) [211] e, interesantemente también se ha asociado a otras vasculitis , tales como la enfermedad de Behçet ( OR> 2,0) o la vasculitis anticito plasma de neutrófilos asociada a anticuerpos (OR> 1,90) [242, 243]. A pesar de ello, en un estudio anteriormente realizado no se presentó asociación entre *PTPN22* y ACG [244], sin embargo, debe tenerse en cuenta que el poder estadístico de este estudio se vio comprometido debido al pequeño tamaño de la muestra incluida en dicho informe (96 casos de ACG y 229 controles).

En nuestro estudio, en primer lugar, se analizó la asociación en una serie de casos y controles de origen caucásico español y cuando se compararon las frecuencias alélicas entre los casos y controles, se observó una clara asociación. Posteriormente, para examinar si polimorfismos de *PTPN22* podrían influir en las manifestaciones clínicas de la enfermedad, los pacientes con ACG fueron estratificados de acuerdo a la presencia de PMR, VIM y IOD. En consonancia, el análisis de subfenotipos también alcanzó significación estadística para el polimorfismo rs2476601.

Para el seguimiento del resultado positivo de una asociación entre la variante rs2476601/R620W de *PTPN22* y ACG en la población española, se intentó confirmar la asociación detectada en una réplica de tres cohortes independientes de ascendencia caucásica. No hubo heterogeneidad entre las cohortes y por lo tanto, se realizó un meta-análisis. Así que, las diferencias estadísticamente significativas se observaron para el polimorfismo rs2476601/R620W de *PTPN22*. Posteriormente, el meta-análisis global que incluye tanto la cohorte de descubrimiento como las tres cohortes de replicación mostraron una consistente asociación entre dicho polimorfismo y la ACG [26].

Aunque los mecanismos que subyacen a la función de la variante genética rs2476601/R620W de *PTPN22* en la autoinmunidad permanecen sin aclarar, la asociación de este SNP con la ACG sugiere que una desregulación de la señalización de TCR participa en los mecanismos de fisiopatológico de esta vasculitis.

En todos los estudios realizados la dirección de la asociación fue la misma, pudiéndose observar un aumento en la frecuencia del alelo de riesgo en pacientes de ACG en comparación con la población control. Así que, nuestros datos corroboran esta asociación del polimorfismo rs2476601/R620W del gen *PTPN22* con la ACG como la asociación más robusta y reproducible fuera de la región HLA hasta la fecha.

Como ya hemos mencionado, además del importante papel que el polimorfismo de *PTPN22* tiene en la susceptibilidad a la ACG, este SNP se ha visto asociado a muchas otras enfermedades autoinmunes, lo que ha hecho que sea propuesto como marcador general para muchas enfermedades autoinmunes donde existe un fuerte componente de la respuesta humoral, como es el caso de AR entre otras, llegándose a suponer que este polimorfismo predispone a enfermedades autoinmunes donde los anticuerpos juegan un papel fundamental en la patogénesis.

El alelo de riesgo de *PTPN22* da lugar a una sustitución de un triptófano por una arginina en el aminoácido 620 (R620W) en el dominio de unión rico en prolinas SH3 de CSK. Este polimorfismo

tiene dos consecuencias funcionales: la unión entre PTPN22 y CSK se interrumpe [211, 212] y la actividad enzimática de PTPN22 aumenta [241, 245]. Estos cambios bioquímicos parece ser que producen un aumento en el umbral de estimulación que se requiere para la señalización del TCR (Figura 9). En el timo, esto podría provocar la selección positiva de timocitos que en situaciones normales serían eliminados, dando lugar a un aumento de células T maduras en la periferia potencialmente autoreactivas [246]. Un segundo mecanismo podría suponer una menor activación de las células T reguladoras, lo que provocaría una deficiente regulación de células T autorreactivas. Estos mecanismos podrían conducir a la autoinmunidad [247] como se representa en la figura 10.

En un estudio llevado a cabo con linfocitos de pacientes, se demostró que el alelo 620W de este SNP genera un aumento de células T de memoria CD4+ junto con una mayor producción de ciertas citoquinas [245] lo que puede ser un mecanismo patogénico por el cual este alelo contribuye al desarrollo de la autoinmunidad. En este sentido, también se han observado que no sólo las células T se encuentran alteradas por la presencia de la mutación, sino que las células B también responden menos a la estimulación a través de su receptor de membrana (BCR) así como una menor producción de células B memoria [245]. No obstante, se necesitan más estudios funcionales para poder llegar a comprender el complejo efecto que esta variante genética puede producir en el sistema inmune.

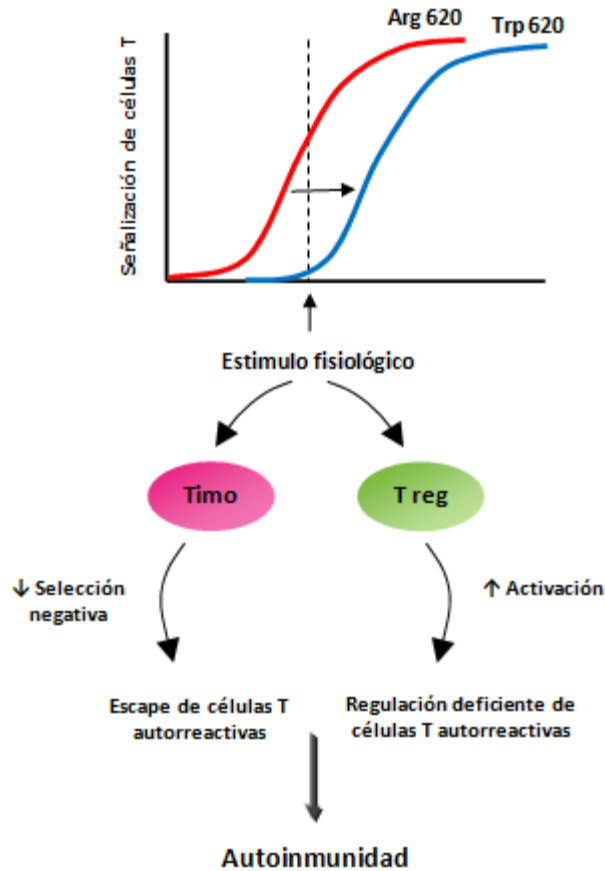


Figura 10. Esquema de la ganancia de función enzimática del polimorfismo R620W del gen PTPN22 que se prevé que aumenta el umbral para la señalización de TCR. En el timo, el cambio de señalización podría dar lugar a la selección positiva de timocitos que de otro modo se eliminan, lo que resulta en la aparición de células T potencialmente autorreactivos en la periferia. Un segundo mecanismo podría implicar la señalización reducida en las células Treg, con una deficiencia que resulta en la regulación de las células T autorreactivas. Cualquiera de estos mecanismos o ambos, podrían conducir a un estado de susceptibilidad para trastornos autoinmunes. Figura adaptada de Peter K Gregersen et al. *Nature Genetics*, 2005, 37: 1300 - 1302

Otra importante característica de este polimorfismo es la heterogeneidad en su distribución entre las distintas poblaciones, encontrándose dicho alelo, en una frecuencia muy baja, casi nula, en poblaciones asiáticas y africana [248], mientras que en poblaciones europeas puede observarse un gradiente norte-sur en el aumento de su frecuencia [218] siendo las frecuencias más bajas en el sur de Europa y las más altas en los países escandinavos [249] como puede observarse en la figura 11.

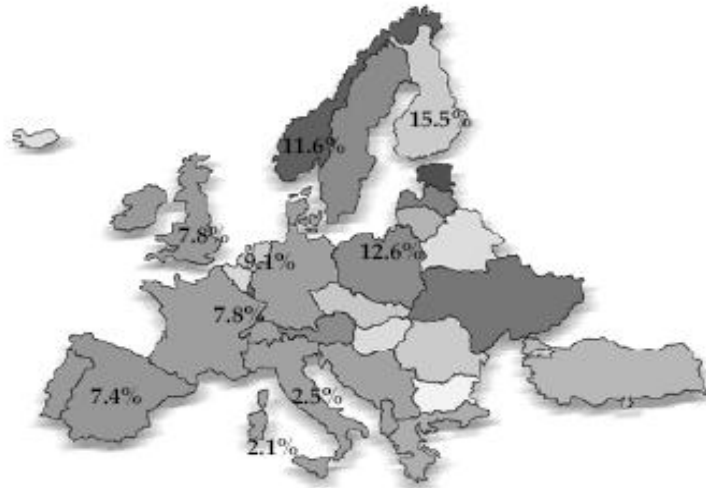


Figura 11. Mapa europeo que resume la diferente distribución del alelo R620W de PTPN22.

Diversos estudios proponen a los inhibidores de PTPs como tratamiento de autoinmunidad, así que *PTPN22* es una posible diana terapéutica [250], de manera que pequeñas moléculas inhibitoras podrían reducir la actividad catalítica del alelo R620W, provocando una señalización normal del TCR y neutralizando así el proceso autoinmune.

La fuerte evidencia de que este polimorfismo juega un papel fundamental en poblaciones caucásicas y la ausencia del mismo en otras poblaciones suscita la posibilidad de que existan otros alelos de riesgo adicionales. Así que en resumen podemos decir que la combinación del polimorfismo R620W de *PTPN22* junto con la presencia de otros factores, está fuertemente asociado con la susceptibilidad a ACG y ha sido propuesto como marcador común de predisposición a diversas enfermedades autoinmunes en poblaciones caucásica.

## 5.2. Genes estudiados no asociados con ACG

Otros genes que hemos estudiado usando el método de estudios de asociación en genes candidato y que sin embargo no han mostrado una asociación significativa con la enfermedad van a ser descritos a continuación y al final de este apartado se realizará una discusión común a este apartado de resultados de no asociación.

### 5.2.1. ITGAM

Este gen codifica la integrina alfa M, las integrinas son proteínas integrales de membrana heterodiméricas compuestas de una cadena alfa y una cadena beta. El dominio I que contiene la integrina alfa combina con la beta 2 de la cadena (ITGB2) para formar una integrina específica de leucocitos que se conoce como receptor de macrófagos 1 (Mac-1), o receptor C3b inactivado (iC3b) (CR3).  $\alpha$  M  $\beta$  2 se expresa en la superficie de muchos leucocitos implicados en el sistema inmune innato, incluyendo monocitos, granulocitos, macrófagos, y células NK. Es mediador de la inflamación mediante la regulación de la adhesión y migración de leucocitos y ha sido implicado en varios procesos inmunes tales como la fagocitosis, citotoxicidad, la quimiotaxis y la activación celular. ITGAM está implicado en el sistema del complemento, debido a su capacidad para unirse al componente del complemento inactivado 3b (iC3b). El ITGAM (alfa) de la subunidad de integrina  $\alpha$  M  $\beta$  2 está implicado directamente en la causa de la adhesión y propagación de las células, pero no puede mediar en la migración celular sin la presencia de la subunidad  $\beta$ 2 (CD18).

Un SNP en el exón 3 del gen *ITGAM*, rs1143679, produce una modificación funcional en la proteína, cambiando el residuo 77<sup>a</sup> de una arginina a histidina (R77H). Se ha observado que esta variante genética es una de las señales más altas asociadas con lupus eritematoso sistémico (LES) y puede ser el polimorfismo causal más probable dentro de la región ITGAM en varias poblaciones de diferente origen étnico [251, 252]. Además, existen evidencias que sugieren que el rs1143679 en *ITGAM* también está involucrado en la patogénesis de la esclerosis sistémica [253].

Por otra parte, estudios anteriores realizados en LES han predicho que la sustitución causada en el R77H altera la estructura y función de esta integrina, y puede contribuir a la lesión endotelial y alteración de complejos inmunológicos en pacientes con LES [251, 254, 255].

### 5.2.2. CD226

Este gen, conocido también como DNAX accesorio molécula 1 (DNAM - 1), PTA1, y TLIISA1, codifica una glicoproteína expresada en la superficie de las células NK, las plaquetas, los monocitos y un subconjunto de células T. Es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF) que contiene 2 dominios similares a la región V de las Ig.

CD226 desempeña un papel importante en la activación de células T, la diferenciación, la citotoxicidad y está involucrada en la adhesión de las plaquetas y las células megacariocítica del endotelio vascular. Curiosamente, la actividad inflamatoria de las lesiones vasculares en el ACG está mediada por la respuesta inmune adaptativa, con células T CD4 +. CD226 está implicado en la activación de células T vírgenes la diferenciación y la proliferación [256, 257]. Además, es una molécula de transducción de señales que participa en la adhesión primaria durante la citotoxicidad mediada por linfocitos T citotóxicos [258]. El gen CD226 se ha asociado con múltiples enfermedades autoinmunes [259]. Una variante no sinónimo de CD226 en el exón 7, rs763361, predispone a la diabetes de tipo 1 [200], a la enfermedad celíaca (CD), la esclerosis múltiple (EM), la enfermedad autoinmune del tiroides, la artritis reumatoide (RA) [259], la granulomatosis de Wegener (GW) [260] y más recientemente ha sido asociada también con la esclerosis sistémica (SSc) [261].

Por otra parte, un haplotipo de tres variante de CD226 que incluyen a los SNPs: rs763361, rs34794968, y rs727088 (ATC), en el último exón de este gen, se han visto asociados con el lupus eritematoso sistémico (LES) [262].

### 5.2.3. TRAF6

TRAF6 es un receptor de TNF asociado al factor 6, que tiene un papel importante en varias vías de señalización importantes para la inmunidad, y es un componente clave en la activación de células B. Las proteínas TRAF son adaptadores de moléculas citoplasmáticas con un papel fundamental en la respuesta inmune. Esta proteína media la señalización de los miembros de la superfamilia de receptores de TNF, así como la familia Toll/IL-1. Las señales procedentes de los receptores, tales como CD40, TNFSF11/RANCE e IL - 1 se ha demostrado que están mediadas por esta proteína. Esta proteína también interactúa con varias proteínas quinasas, incluyendo IRAK1/IRAK, SRC y PKCzeta, que proporciona un enlace entre distintas vías de señalización. Esta proteína funciona como un



transductor de señales en la ruta de NF - kappaB que activa IkappaB quinasa (IKK) en respuesta a citoquinas proinflamatorias. La interacción de esta proteína con UBE2N/UBC13, y UBE2V1/UEV1A, que son enzimas de conjugación de ubiquitina que catalizan la formación de cadenas de poliubiquitina, y que se ha visto que son requeridas para la activación de IKK por esta proteína. Esta proteína también interactúa con el factor de crecimiento transformante (TGF) y es necesario para la activación de Smad independiente de las JNK y p38 quinasas. Y tiene un dominio de tipo RING amino terminal seguido por cuatro motivos de dedos de zinc, una región central de la bobina en espiral y un dominio carboxilo terminal altamente conservado, conocido como el dominio TRAF-C. *TRAF6* también está implicado en la regulación de otros receptores, incluyendo interleucina 1R, interleucina 18R, y los receptores de tipo Toll (TLR).

Así que, esta proteína es un regulador importante de procesos fisiológicos incluyendo inmunidad innata y adaptativa, siendo un componente clave en la activación de las células B y el desarrollo de las células T reguladoras (Treg), que son cruciales en el mantenimiento de la tolerancia inmune ya que se requiere la expresión de *TRAF6* en los timocitos [263, 264].

*TRAF6* ha sido asociada con LES y AR; y miembros de la vía de señalización de TLR aguas arriba y aguas abajo de *TRAF6*, tales como *TNFAIP3*, *IRF5*, *IRF7*, y *IRAK1*, se sabe que son factores de riesgo para la esclerodermia y otras enfermedades autoinmunes [180, 265-267]. Además, otros estudios han reportado una asociación entre este gen en el locus 11p12 y la AR y LES [265, 266].

#### 5.2.4. CCR6

Este gen codifica un miembro de la familia de receptores de quimioquinas beta, que es una proteína transmembrana similar a los receptores acoplados a la proteína G. El gen se expresa preferentemente por las células dendríticas inmaduras y células T de memoria. El ligando de este receptor es la proteína inflamatoria de macrófagos 3 alfa (MIP-3 alfa) [237].

Se ha demostrado que este receptor es importante para la maduración de los linfocitos B y puede regular la migración y el reclutamiento de células dendríticas y células T durante las respuestas inflamatoria e inmunológica. *CCR6* codifica un miembro de la familia de receptores de quimioquinas, un receptor importante implicado en la regulación de varios aspectos de la inmunidad, incluyendo la capacidad de mediar el reclutamiento de células dendríticas tanto

inmaduras como maduras y células presentadoras de antígeno (APC) a los sitios de inflamación epitelial. Hay estudios que se han centrado en la participación de CCR6 en la patogénesis de varias enfermedades autoinmunes tales como la enfermedad de Crohn [268], la enfermedad de Graves, la psoriasis [269], y la reumatoide artritis (RA) [196]. También se cree que *CCR6* puede estar involucrado en el reclutamiento de leucocitos y la respuesta inflamatoria [270].

También, hay datos que sugieren que la activación inapropiada, la maduración y la retención de células dendríticas en la adventicia constituye uno de los primeros pasos en la patogenia de la ACG y que los hechos posteriores dependen de la activación de las células T [59, 271].

### 5.2.5. CSK

CSK es una quinasa intracelular que regula negativamente la activación de las células a través de la fosforilación de la tirosina quinasa de la familia SRC. Se sabe que interactúa directamente con la fosfatasa intracelular LYP y que afecta a la señalización mediada por receptores de células B (BCR) y T (TCR, receptor de células T). Los experimentos de transfección en células T murinas apoyan la hipótesis de que Lyp y Csk actúan en conjunto para inhibir la activación mediada por TCR [272]. A su vez, LYP está codificada por el gen *PTPN22*, que se ha asociado con varias enfermedades autoinmunes [216, 241] entre ellas la ACG [26]. El alelo de riesgo del SNP rs2476601, responsable del cambio en un aminoácido (R620W) previene la unión de CSK y LYP y, por tanto, presenta una mayor actividad LYP convirtiéndose en un inhibidor de la activación de las células T [211]. En otro estudio a partir de los datos de GWAS se identificó a *CSK* como un nuevo factor de riesgo en la SSc [273]. A su vez, en estudios de GWAS en LES se ha sugerido la asociación de una región de este gen con otras enfermedades autoinmunes. Además, hay datos que muestran que el SNP rs34933034 está asociado con una posible implicación funcional en lupus, [274] ya que los alelos de riesgo para este SNP muestran un aumento de la expresión de *CSK* en las células B vírgenes, así como el aumento de LYP inhibidora de las tirosina Y508 fosforilada. Este estudio sugiere que el alelo de riesgo, mediante el aumento de la expresión de *CSK*, provoca la alteración de la señal de BCR, causando cambios en la activación y maduración de las células B.

En base a todo lo anterior y teniendo en cuenta que los polimorfismos de *ITGAM* (rs1143679),

CD226 (rs727088, rs34794968 y rs763361), TRAF6 (rs540386), CCR6 (rs3093024) y CSK (rs1378942 y rs34933034) anteriormente descritos, habían sido asociados con otras enfermedades autoinmunes con las que la ACG guarda ciertas similitudes genéticas, parecían ser buenos candidatos para mostrar una asociación positiva en esta vasculitis y se decidió evaluar su papel en la fisiopatología de la ACG. Sin embargo, en los estudios llevados a cabo, no se ha podido confirmar su implicación en la susceptibilidad a esta vasculitis sistémica ni tampoco con sus diferentes manifestaciones clínicas.

Aunque las razones de esta discrepancia en términos de asociación genética entre los resultados de otras enfermedades autoinmunes y la ACG son desconocidos. Estos resultados negativos están en consonancia con estudios anteriores de nuestro grupo que no dieron a conocer la asociación entre otros polimorfismos en genes de la vía inflamatoria y la ACG [96, 275, 276]. Y gracias a estos estudios podemos concluir que los polimorfismos analizados no juegan un papel relevante en la ACG, puesto que es poco probable que la falta de asociación observada se deba a un error de tipo II, como consecuencia de un bajo poder estadístico, ya que, nuestro análisis estadístico tenía el poder suficiente para detectar una posible señal modesta en la predisposición a la ACG puesto que contamos con la mayor serie de pacientes con ACG con biopsia probada, incluidos en el estudio genético de esta enfermedad hasta el momento.

No obstante, no podemos descartar que otras variantes genéticas que muestren un bajo desequilibrio de ligamiento con los polimorfismos analizados, puedan desempeñar un papel en la susceptibilidad a la ACG.

Otra posibilidad para explicar la no asociación de nuestros resultados podría ser que estos polimorfismos estén involucrados sólo débilmente en la predisposición a la ACG y sea necesario un poder estadístico superior al de nuestro estudio.

En conclusión, aunque se recomienda la realización de más estudios en otras poblaciones con diferentes antecedentes genéticos para excluir totalmente la influencia de estos polimorfismos en la patogenia de la ACG, nuestros resultados sugieren que no hay evidencia de una contribución de estas variantes en la predisposición genética de esta vasculitis.

Y a pesar de que los datos obtenidos para el análisis de esos polimorfismos sean negativos, poseen un alto valor divulgativo, puesto que ayudan a descartar posibles genes que por unas razones u otras, parecían desempeñar un papel importante en la enfermedad. Del mismo modo, en algunos casos permiten demostrar discrepancias entre estudios, que sirven para profundizar en el tema y

mejorar el entendimiento de genes ya estudiados. Por otro lado, los resultados de no asociación, sirven para reenfocar las directrices en los estudios genéticos de la enfermedad.

La ACG también tiene grandes similitudes con otras vasculitis que apoyan nuestra hipótesis de que hay una genética común compartida en la autoinmunidad y que gracias a nuestros datos podemos confirmar que algunos de los genes analizados en este trabajo están asociados tanto a otras enfermedades autoinmunes como a la ACG, como nosotros esperábamos. Sin embargo, otros de los genes analizados no muestran asociación con la ACG a pesar de asociarse con otras patologías relacionadas con la autoinmunidad y la inflamación.

Por otro lado, hay otros genes que están asociados a ACG y que también se han visto asociados a otras vasculitis con las que la ACG también comparte una base genética común, como son el caso de la Arteritis de Takayasu, Enfermedad de Kawasaki, Anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos asociados a vasculitis (ANCA), Enfermedad de Behçet, e IgA Vasculitis (Henoch-Schönlein) de las que hablaremos a continuación.

Las vasculitis engloban un conjunto de enfermedades cuyo nexo en común es el sustrato patológico, es decir, la inflamación de los vasos sanguíneos y como consecuencia de dicha inflamación se produce una disminución del flujo vascular o incluso una interrupción completa del mismo. Las vasculitis se clasifican en función de la localización de los vasos afectados, sus diferentes tamaños y los distintos hallazgos histológicos objetivados en la biopsia (en la que predominará la lesión necrosante o la granulomatosa), como se puede observar en la siguiente tabla.

**Tabla 8: nombres adoptados por las vasculitis en “chapel hill consensus conference on the nomenclature systemic vasculitis” en 1994.**

1. Vasculitis de grandes vasos
  - Arteritis (temporal) de células gigantes
  - Enfermedad de Takayasu
2. Vasculitis de vasos medianos

- Poliarteritis nodosa clásica
- Enfermedad de Kawasaki

### 3. Vasculitis de pequeños vasos

- PAN microscópica (o poliangeítis)\*
- Granulomatosis de Wegener\*
- Enfermedad de Schurg-Strauss\*
- Púrpura de Schönlein-Henoch
- Púrpura crioglobulinémica
- Vasculitis cutánea leucocitoclástica

\* Vasculitis ANCA+

A pesar de los recientes avances en la identificación de los factores de riesgo subyacentes a la predisposición de las vasculitis, el componente genético de estas enfermedades sigue siendo poco conocido. En la mayoría de los estudios, el poder estadístico limitado y la falta de replicación en cohortes independientes han hecho difícil la identificación de señales de asociación genética consistentes. Sin embargo, un gran número de los loci de susceptibilidad conocidos son compartidos entre diferentes vasculitis como se representa en la figura 12, lo que sugiere claramente que se trata de señales de verdadera asociación. Por otra parte, esto también apoya la hipótesis de vías moleculares comunes que influyen en el desarrollo de enfermedades autoinmunes en general y, en particular, las vasculitis.

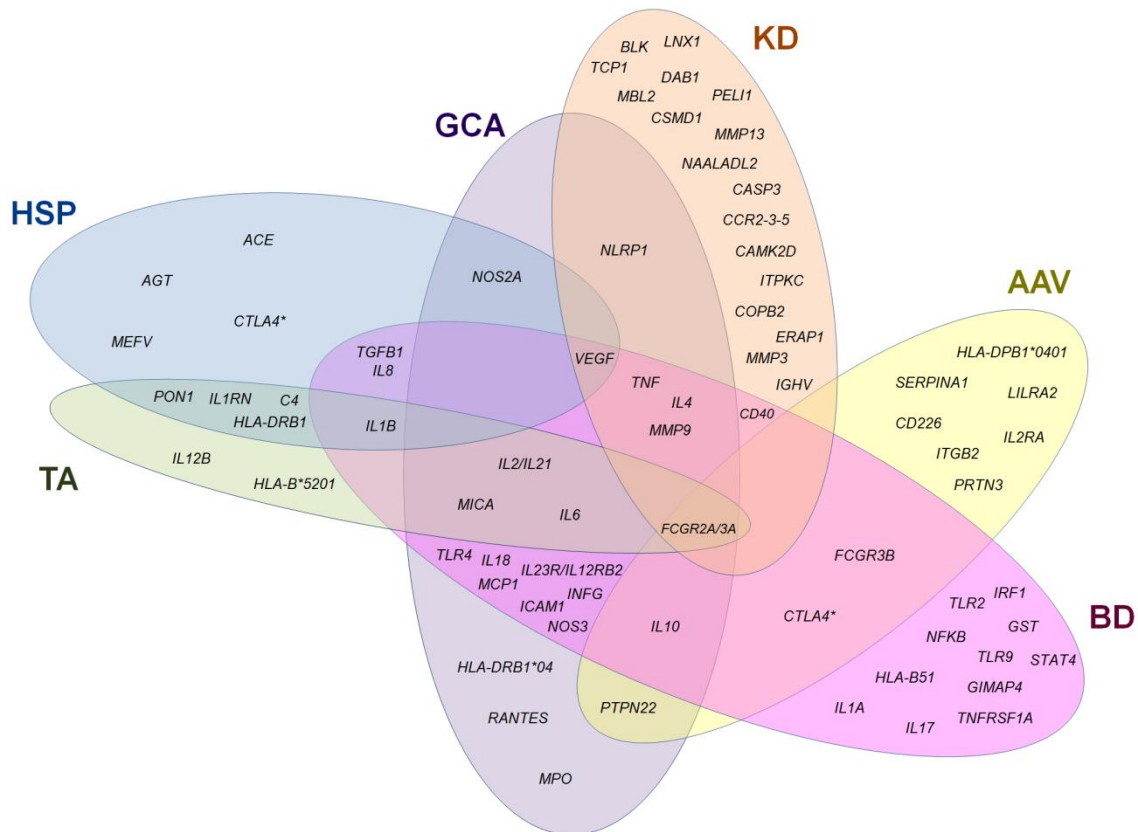


Figura 12: Representación esquemática de los loci de susceptibilidad conocidos que son compartidos entre las diferentes vasculitis. Figura tomada de Carmona FD, Márquez A, Martín J, González-Gay MA. Genetic Aspects of Vasculitis. Vasculitis: Symptoms, Diagnosis, Treatment, pp In press. Ed. Nova Science Publishers, inc (New York, USA).

### Arteritis de Takayasu

La arteritis de Takayasu (TA) es una vasculitis crónica inflamatoria idiopática que afecta principalmente a medianos y grandes vasos, fundamentalmente a la aorta y a los troncos supraaórticos, provocando estenosis y aneurismas de los vasos sanguíneos.

Sólo se realizaron unos pocos estudios de genes candidatos que exploran el posible papel de los polimorfismos genéticos en la TA antes de la publicación de un GWAS en japonés [277] y un immunochip (que es una plataforma de genotipado de alta densidad diseñado a medida para el mapeo fino de genes relacionadas con la inmunidad) realizado en norteamericanos y turcos [278].

Por otra parte, al igual que ocurre en la ACG, se encontró una asociación entre el alelo MICA y TA, incluso en ausencia de HLA-B\*52 [279] y recientemente, MICA y la región HLA-DQB1/HLA-DRB1 también fueron descritos como factores de riesgo de AT en el immunochip de turcos y estadounidenses [278].

Una de las asociaciones más consistentes con TA fuera de la región HLA que también se ha visto asociada a la ACG es el locus FCGR2A/FCGR3A que fue identificado como una región de susceptibilidad para la TA en el immunochip [278].

Además otra de las similitudes con la ACG es que en pacientes TA se han detectado una producción alterada de varias citocinas, incluyendo IL-6, IL-2 e IL-12 y se ha descrito un aumento de los niveles de IL-6 e IL-12 y un menor número de células T CD3+ productoras de IL-2 en la fase activa de la enfermedad [280-282].

Mientras que los polimorfismos de los genes que codifican estas citoquinas se han correlacionado con los niveles de proteína alterada [283-289].

### **Enfermedad de Kawasaki**

La enfermedad de Kawasaki (KD) es un síndrome de vasculitis aguda que afecta principalmente a las arterias pequeñas y medianas de los bebés y los niños. Los datos epidemiológicos sugieren que, al igual que ocurre con otras enfermedades autoinmunes, hay una influencia genética para la patogénesis de la enfermedad. En esta vasculitis también se han realizado un gran número de estudios con el fin de desentrañar dicho componente genético de KD, centrándose principalmente en genes candidatos implicados en la respuesta inmune.

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos llevados a cabo hay controversias acerca de la participación de la región HLA en esta enfermedad. Y aunque se han evidenciado asociaciones entre KD y HLA de clase I [290, 291], los resultados fueron inconsistentes. Por lo tanto, un alelo o haplotipo HLA que confiera susceptibilidad a KD no ha sido identificado todavía.

En cuanto a las asociaciones no HLA que la KD comparte con la ACG, se han descrito varios genes para desempeñar un papel en la susceptibilidad KD que incluyen citocinas y sus receptores, tales

como IL-4, TNF, también se ha visto asociaciones en genes que codifican moléculas relacionadas con enfermedades cardiovasculares, incluyendo VEGF y MMP9 y genes que participan en la inmunidad innata como el caso de NLRP1 que participan en el montaje inflammasoma y que ha sido descrito en la susceptibilidad a la ACG recientemente [292-296].

En 2011, los datos de un GWAS [297] en pacientes con KD de diferentes poblaciones de ascendencia europea (Alemania, Australia, Reino Unido, Países Bajos y Estados Unidos) confirmaron que un polimorfismo funcional de FCGR2A (H131R, rs1801274) también es un factor de riesgo para KD al igual que se había demostrado en el caso de la ACG.

### **Anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos asociados a vasculitis, ANCA (AAV)**

Estas enfermedades se conocen colectivamente como vasculitis asociada a ANCA (AAV) y en ellas se incluyen a tres de las vasculitis de pequeños vasos; la granulomatosis de Wegener (GW), poliangeítis microscópica (PAM) y el síndrome de Churg- Strauss (SCS). Están caracterizadas por lesiones con pocos o ningún depósito de complejos inmunes y anticuerpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA). Muchas de las características clínicas son comunes a todos los tipos de AAV, incluyendo síntomas inflamatorios inespecíficos como malestar general, fiebre, anemia y pérdida de peso, aunque también hay diferencias fenotípicas entre los tipos de AAV.

Estudios llevados a cabo en esta ponen de manifiesto que estas vasculitis también comparten con la ACG algunas variantes que confieren riesgo tanto a AAV como a la ACG. Este es el caso de la variante funcional del gen *PTPN22* (R620W) [298, 299] que en el caso de la ACG ha sido la asociación más robusta y reproducible fuera de la región HLA hasta la fecha y que también se ha visto específicamente implicado primero en la susceptibilidad para desarrollar WG [299], confirmandose esta asociación adicionalmente en una cohorte más amplia en la que se incluyeron pacientes tanto GW como PAM [298]. Sin embargo, en otro estudio publicado [243] no se encontró evidencias de la asociación entre este SNP y SCS.



Hay otros genes del sistema inmune que han mostrado evidencias de asociación menos consistentes con AAV pero que también confirman la similitud de AAV con ACG. Estos incluyen , IL10 y FCGR2A [300].

### **Enfermedad de Behçet**

La enfermedad o síndrome de Behçet (EB), aunque en muchas ocasiones se manifiesta como una vasculitis, es considerada por muchos autores como una enfermedad inflamatoria sistémica, en este caso sería la única capaz de afectar a vasos de todos los tamaños (pequeños, medianos y grandes), tanto arteriales como venosos. Su origen es desconocido y, como en otras enfermedades autoinmunes o inflamatorias, se recurre a la explicación de la actividad inmune aberrante desencadenada por la exposición a un agente externo, quizás infeccioso, en personas con una predisposición genética poligénica. La EB se caracteriza por episodios recurrentes de aftas orales, genitales y lesiones cutáneas y oculares específicas. Además puede afectar a otros sistemas como el vascular, el tracto gastrointestinal o el sistema nervioso [301].

La predisposición genética a la EB se considera poligénica y se ha asociado fundamentalmente con genes relacionados con el complejo HLA, pero que cada vez hay más evidencia de la participación de otros genes. En la EB se ha descrito una triple repetición del polimorfismo del microsatélite (GTC)<sub>n</sub> dentro del gen *MICA* [302].

Como enfermedad compleja que es, los polimorfismos genéticos no-HLA pueden también contribuir a la susceptibilidad en la EB. Una de las asociaciones más importantes con BD descritos hasta la fecha es *IL10* que primero se sugirió como un factor genético para BD en estudios de genes candidatos [303, 304], y posteriormente fue confirmado por datos de GWAS en poblaciones de turcos y japoneses [305, 306], mientras que en coreanos no ha podido ser confirmado dicho hallazgo [307].

Esta asociación genética no sólo es compartida con ACG y AAV, sino también con otras enfermedades autoinmunes, como la colitis ulcerosa, la diabetes tipo 1 o LES [308]. Otra región genómica asociada con BD a nivel GWAS es IL23R/IL12RB2 [76, 306, 309]

A través de estudios de genes candidatos se han identificado un gran número de asociaciones genéticas adicionales con BD, y que también se asocian con ACG como por ejemplo; TNF, IFNG, IL2, IL4, IL6, IL18, y MCP1 entre otras [133, 304, 310-316]. También se han detectado asociaciones con genes implicados en la función endotelial, incluyendo VEGF, ICAM1, MMP9, NOS3 [317-321] y genes que codifican receptores de la inmunidad innata como TLR4, FCGR2A y FCGR3A [322, 323].

Todos estos ejemplos confirman las similitudes existentes entre esta vasculitis y la ACG.

### **Henoch –Schönlein**

El Síndrome de Schönlein-Henoch o púrpura (HSP) corresponde al grupo de las vasculitis leucocitoclásticas, y se caracteriza por la inflamación de vasos de pequeño calibre y presenta frecuentes manifestaciones cutáneas. Similar a las otras vasculitis, la comprensión de la base genética de HSP sigue siendo difícil de alcanzar, y nuevas investigaciones siguen siendo necesarias para desentrañar la base genética y los mecanismos patogénicos que conducen a esta vasculitis. El conocimiento actual del componente genético de HSP se basa exclusivamente en los estudios de genes candidatos (incluidos los genes que participan principalmente en las respuestas inmune e inflamatoria, la función endotelial, el sistema del complemento, la coagulación, el sistema fibrinolítico y el sistema antioxidante), y al igual que ocurre con la ACG no hay datos de GWAS publicados hasta la fecha [324].

Por otro lado, un polimorfismo de repetición CCTTT dentro NOS2A, implicada en el metabolismo del óxido nítrico, se asoció con la predisposición a HSP y la presencia de nefritis en una cohorte del noroeste de España [325]. De manera similar, polimorfismos genéticos del gen VEGF también han sido identificados en el desarrollo de la nefritis en pacientes con HSP [326, 327].

Siendo otros claros ejemplos de genes que han sido asociados tanto en ACG como en otras vasculitis, que como hemos puesto de manifiesto en este apartado guardan grandes similitudes corroborando la teoría de un componente genético compartido.

### 5.3. Perspectivas

Estudios como el presente, encaminados a obtener un mejor conocimiento de las bases moleculares que subyacen en la susceptibilidad de la arteritis de células gigantes, y de las enfermedades autoinmunes en general, son de gran relevancia, puesto que ayudan a esclarecer la base genética de esta patología con la identificación de loci específicos y de nuevas variantes de susceptibilidad compartidas con otras enfermedades autoinmunes. Gracias a estos estudios, en los últimos años se han hecho avances importantes en la patogenia de la ACG, no obstante, aún queda mucho camino por recorrer en este tema, puesto que buena parte de los genes que están implicados en el riesgo ó protección a la enfermedad, están por descubrir.

La elucidación de los factores genéticos de riesgo de la ACG, hasta el momento, se ha basado en estudios de asociación de genes candidatos. Esto, conlleva algunos inconvenientes como son: la falta de poder estadístico, la falta de replicación de resultados, la dificultad para encontrar variantes raras, la presencia de falsos positivos y la heterogeneidad genética y clínica. Para asegurar la fidelidad y contundencia de los conocimientos alcanzados, es necesario salvar estos problemas y para ello hay que seleccionar un tamaño muestral adecuado de tal manera que se garantice el suficiente poder estadístico para detectar asociaciones de riesgo modesto, así como garantizar la homogeneidad de la población, para lo cual, es imprescindible que el grupo de controles sea lo más parecido posible al de pacientes en edad, sexo y origen étnico [328].

En este sentido, también es necesaria la colaboración entre diversos grupos de investigación tanto básica como clínica a nivel nacional e internacional, para de esta forma, tener acceso a poblaciones de distinto fondo genético que permitan replicar y poder confirmar los resultados en otras poblaciones. Así pues, la replicación de asociaciones que han sido descritas con anterioridad, son de gran interés, ya que, la validación de estos resultados en poblaciones independientes es el primer paso para demostrar que se trata de una verdadera asociación. Por otro lado, como ya se ha mencionado, el desequilibrio de ligamiento puede variar entre diferentes poblaciones, de manera que la replicación de una asociación previa puede indicar que se trata del SNP causal.

Gracias a los avances tecnológicos que permiten analizar de forma rápida y efectiva miles de SNPs y a los avances informáticos que han permitido el análisis del gran volumen de datos generado en estudios de GWAS está siendo posible la identificación de la influencia genética de muchas enfermedades genéticamente complejas, como es el caso de la ACG. Estos estudios se basan en la detección y análisis de marcadores genéticos relacionados con la enfermedad a lo largo de todo el genoma en poblaciones independientes con número muy amplio de participantes. Aunque se han realizado GWASs en diversas enfermedades autoinmunes, actualmente no existen estudios similares en ACG, así que el uso de la plataforma de genotipado de alto rendimiento en esta vasculitis creemos que también proporcionaría una oportunidad para para identificar más marcadores genéticos implicados en su susceptibilidad y/o fenotipo, desentrañando así su componente genético. No obstante, el inconveniente de estos estudios, es la aparición de resultados falsos positivos (error de tipo I), que hacen necesaria la replicación en estudios independientes. Así mismo, otra deficiencia en este tipo de estudios, es la falta de detección de variantes raras.

El siguiente paso serán estudios de interacción génica y de funcionalidad que permitirán entender mejor el riesgo genético de esta vasculitis. Con el conjunto de datos obtenidos a partir de todas estas aproximaciones se espera que en un futuro próximo se pueda mejorar el entendimiento de las rutas de señalización y metabólicas, lo cual sería de gran ayuda para el conocimiento de las bases moleculares que subyacen a la enfermedad y por tanto, el establecimiento de nuevas estrategias de diagnóstico así como la identificación de dianas terapéuticas, favoreciendo así el desarrollo de la investigación traslacional y persiguiendo el avance en la calidad de vida de los ciudadanos.

## 6. CONCLUSIONES

Los avances llevados a cabo mediante la realización del presente trabajo permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. El gen *ITGAM*, asociado previamente a diversas enfermedades autoinmunes, no parece influir en la susceptibilidad a padecer ACG.
2. Polimorfismos localizados en el gen *CD226* no parecen influir en la susceptibilidad a padecer EM en general, ni en ninguno de los aspectos analizados de esta enfermedad.
3. No detectamos asociación de la variante genética analizada donde se localiza el gen *TRAF6*, con la susceptibilidad a padecer ACG ni con ninguno de los aspectos analizados de la enfermedad en la población española.
4. No observamos asociación del polimorfismo analizado en el gen *CCR6* con ACG, ni influencia del mismo en ningún aspecto de la enfermedad.
5. La variante localizada en el gen *NLRP1* aumenta la susceptibilidad a padecer ACG tanto en la población española como en el meta-análisis combinado incluyendo la cohorte italiana, mostrando el mismo efecto al descrito en otras enfermedades de carácter autoinmune. El efecto observado de dicha variante genética con la enfermedad global también se observó en el caso de los pacientes que presentan manifestaciones visuales isquémicas, cuando los casos fueron meta-analizados frente a los controles de acuerdo a las características clínicas específicas de la ACG. Sin embargo, no se observó asociación con las otras características clínicas.

6. El trabajo representa el primer estudio del gen *CSK* en la ACG y, a pesar de haberse considerado como un marcador común de autoinmunidad, nuestros resultados no reflejaron gran relevancia en la genética de la vasculitis de células gigantes.

7. Detectamos en la población española por primera vez la influencia en la predisposición genética a padecer ACG del gen *PTPN22* que parece ser un marcador común en la autoinmunidad y posteriormente ésta asociación fue confirmada con una réplica de tres cohortes independientes de ascendencia caucásica, mostrando una consistente asociación entre dicho polimorfismo y la ACG. Tomando esto en consideración, nuestros resultados apoyan la teoría de un fondo genético compartido entre las diferentes enfermedades autoinmunes.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Salvarani C, Cantini F, Boiardi L, Hunder GG. Polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis. *N Engl J Med*. 2002; 347:261-271.
2. Gonzalez-Gay MA, Vazquez-Rodriguez TR, Lopez-Diaz MJ, Miranda-Fillooy JA, Gonzalez-Juanatey C, Martin J, et al. Epidemiology of giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Arthritis Rheum*. 2009; 61:1454-1461.
3. Chatelain D, Duhaut P, Schmidt J, Loire R, Bosshard S, Guernou M, et al. Pathological features of temporal arteries in patients with giant cell arteritis presenting with permanent visual loss. *Ann Rheum Dis*. 2009; 68:84-88.
4. Lie JT. Illustrated histopathologic classification criteria for selected vasculitis syndromes. American College of Rheumatology Subcommittee on Classification of Vasculitis. *Arthritis Rheum*. 1990; 33:1074-1087.
5. Capobianco DJ, Swanson JW. Neurologic contributions of Bayard T. Horton. *Mayo Clin Proc*. 1998; 73:912-915.
6. Henriot JP, Marin J, Gosselin J, Hamel-Desnos C, Ducrocq M, Brard G, et al. The history of Horton's disease or ... 10 centuries of a fascinating adventure. *J Mal Vasc*. 1989; 14 Suppl C:93-97.
7. Cid MC, Font C, Coll-Vinent B, Grau JM. Large vessel vasculitides. *Curr Opin Rheumatol*. 1998; 10:18-28.
8. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Miranda-Fillooy JA, Martin J. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: pathophysiology and management. *Drugs Aging*. 2006; 23:627-649.
9. Hunder GG. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Med Clin North Am*. 1997; 81:195-219.
10. Gonzalez-Gay MA. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: two different but often overlapping conditions. *Semin Arthritis Rheum*. 2004; 33:289-293.
11. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C. Epidemiology of the vasculitides. *Rheum Dis Clin North Am*. 2001; 27:729-749.
12. Gonzalez-Gay MA, Miranda-Fillooy JA, Lopez-Diaz MJ, Perez-Alvarez R, Gonzalez-Juanatey C, Sanchez-Andrade A, et al. Giant cell arteritis in northwestern Spain: a 25-year epidemiologic study. *Medicine (Baltimore)*. 2007; 86:61-68.
13. Liang GC, Simkin PA, Hunder GG, Wilske KR, Healey LA. Familial aggregation of polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*. 1974; 17:19-24.
14. Gonzalez-Gay MA. Genetic epidemiology. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Arthritis Res*. 2001; 3:154-157.
15. Weyand CM, Hicok KC, Hunder GG, Goronzy JJ. The HLA-DRB1 locus as a genetic component in giant cell arteritis. Mapping of a disease-linked sequence motif to the antigen binding site of the HLA-DR molecule. *J Clin Invest*. 1992; 90:2355-2361.
16. Lowenstein MB, Bridgeford PH, Vasey FB, Germain BF, Espinoza LR. Increased frequency of HLA-DR3 and DR4 in polymyalgia rheumatica-giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*. 1983; 26:925-927.
17. Armstrong RD, Behn A, Myles A, Panayi GS, Welsh KI. Histocompatibility antigens in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *J Rheumatol*. 1983; 10:659-661.
18. Andersson R, Jonsson R, Tarkowski A, Bengtsson BA, Malmvall BE. T cell subsets and expression of immunological activation markers in the arterial walls of patients with giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis*. 1987; 46:915-923.

19. Jacobsen S, Baslund B, Madsen HO, Tvede N, Svejgaard A, Garred P. Mannose-binding lectin variant alleles and HLA-DR4 alleles are associated with giant cell arteritis. *J Rheumatol.* 2002; 29:2148-2153.
20. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Ollier WE. Polymyalgia rheumatica and biopsy-proven giant cell arteritis exhibit different HLA-DRB1\* associations. *J Rheumatol.* 2003; 30:2729.
21. Gonzalez-Gay MA, Rueda B, Vilchez JR, Lopez-Nevot MA, Robledo G, Ruiz MP, et al. Contribution of MHC class I region to genetic susceptibility for giant cell arteritis. *Rheumatology (Oxford).* 2007; 46:431-434.
22. Weyand CM, Hicok KC, Hunder GG, Goronzy JJ. Tissue cytokine patterns in patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann Intern Med.* 1994; 121:484-491.
23. Wagner AD, Bjornsson J, Bartley GB, Goronzy JJ, Weyand CM. Interferon-gamma-producing T cells in giant cell vasculitis represent a minority of tissue-infiltrating cells and are located distant from the site of pathology. *Am J Pathol.* 1996; 148:1925-1933.
24. Wagner AD, Goronzy JJ, Weyand CM. Functional profile of tissue-infiltrating and circulating CD68+ cells in giant cell arteritis. Evidence for two components of the disease. *J Clin Invest.* 1994; 94:1134-1140.
25. Serrano A, Carmona FD, Castaneda S, Solans R, Hernandez-Rodriguez J, Cid MC, et al. Evidence of association of the NLRP1 gene with giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis.* 2013; 72:628-630.
26. Serrano A, Marquez A, Mackie SL, Carmona FD, Solans R, Miranda-Fillooy JA, et al. Identification of the PTPN22 functional variant R620W as susceptibility genetic factor for giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis.* 2013; 72:1882-1886.
27. Salvarani C, Gabriel SE, O'Fallon WM, Hunder GG. The incidence of giant cell arteritis in Olmsted County, Minnesota: apparent fluctuations in a cyclic pattern. *Ann Intern Med.* 1995; 123:192-194.
28. Nordborg E, Nordborg C. Giant cell arteritis: epidemiological clues to its pathogenesis and an update on its treatment. *Rheumatology (Oxford).* 2003; 42:413-421.
29. Elling P, Olsson AT, Elling H. Synchronous variations of the incidence of temporal arteritis and polymyalgia rheumatica in different regions of Denmark; association with epidemics of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J Rheumatol.* 1996; 23:112-119.
30. Choe YH, Han BK, Koh EM, Kim DK, Do YS, Lee WR. Takayasu's arteritis: assessment of disease activity with contrast-enhanced MR imaging. *AJR Am J Roentgenol.* 2000; 175:505-511.
31. Duhaut P, Bosshard S, Dumontet C. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: role of viral infections. *Clin Exp Rheumatol.* 2000; 18:S22-23.
32. Wagner AD, Gerard HC, Fresemann T, Schmidt WA, Gromnica-Ihle E, Hudson AP, et al. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in giant cell vasculitis and correlation with the topographic arrangement of tissue-infiltrating dendritic cells. *Arthritis Rheum.* 2000; 43:1543-1551.
33. Rimenti G, Blasi F, Cosentini R, Moling O, Pristera R, Tarsia P, et al. Temporal arteritis associated with *Chlamydia pneumoniae* DNA detected in an artery specimen. *J Rheumatol.* 2000; 27:2718-2720.
34. Bhatt AS, Manzo VE, Pedamallu CS, Duke F, Cai D, Bienfang DC, et al. In search of a candidate pathogen for giant cell arteritis: Sequencing based characterization of the giant cell arteritis microbiome. *Arthritis Rheumatol.* 2014.
35. Fessel WJ. Polymyalgia rheumatica, temporal arteritis, and contact with birds. *Lancet.* 1969; 2:1249-1250.
36. Petursdottir V, Nordborg E, Moraghebi N, Persson M, Nordborg C. Estrogen receptors in giant cell arteritis. An immunocytochemical, western blot and RT-PCR study. *Clin Exp Rheumatol.* 1999; 17:671-677.



37. Weyand CM, Goronzy JJ. Giant-cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Ann Intern Med.* 2003; 139:505-515.
38. Gonzalez-Gay MA, Barros S, Lopez-Diaz MJ, Garcia-Porrua C, Sanchez-Andrade A, Llorca J. Giant cell arteritis: disease patterns of clinical presentation in a series of 240 patients. *Medicine (Baltimore).* 2005; 84:269-276.
39. Hellmann DB. Temporal arteritis: a cough, toothache, and tongue infarction. *JAMA.* 2002; 287:2996-3000.
40. Gordon LK, Levin LA. Visual loss in giant cell arteritis. *JAMA.* 1998; 280:385-386.
41. Gonzalez-Gay MA, Blanco R, Rodriguez-Valverde V, Martinez-Taboada VM, Delgado-Rodriguez M, Figueroa M, et al. Permanent visual loss and cerebrovascular accidents in giant cell arteritis: predictors and response to treatment. *Arthritis Rheum.* 1998; 41:1497-1504.
42. Liozon E, Herrmann F, Ly K, Robert PY, Loustaud V, Soria P, et al. Risk factors for visual loss in giant cell (temporal) arteritis: a prospective study of 174 patients. *Am J Med.* 2001; 111:211-217.
43. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrua C, Rodriguez-Ledo P, Llorca J. Trends in the inflammatory response in biopsy-proven giant cell arteritis: comment on the article by Cid et al, and the letters by Neshet and Sonnenblick and Liozon et al. *Arthritis Rheum.* 2000; 43:1427-1428.
44. Casson RJ, Fleming FK, Shaikh A, James B. Bilateral ocular ischemic syndrome secondary to giant cell arteritis. *Arch Ophthalmol.* 2001; 119:306-307.
45. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrua C, Llorca J, Hajeer AH, Branas F, Dababneh A, et al. Visual manifestations of giant cell arteritis. Trends and clinical spectrum in 161 patients. *Medicine (Baltimore).* 2000; 79:283-292.
46. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrua C, Pineiro A, Pego-Reigosa R, Llorca J, Hunder GG. Aortic aneurysm and dissection in patients with biopsy-proven giant cell arteritis from northwestern Spain: a population-based study. *Medicine (Baltimore).* 2004; 83:335-341.
47. Schmidt WA, Gromnica-Ihle E. What is the best approach to diagnosing large-vessel vasculitis? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2005; 19:223-242.
48. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrua C, Llorca J, Gonzalez-Louzao C, Rodriguez-Ledo P. Biopsy-negative giant cell arteritis: clinical spectrum and predictive factors for positive temporal artery biopsy. *Semin Arthritis Rheum.* 2001; 30:249-256.
49. Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, Stevens MB, Arend WP, Calabrese LH, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* 1990; 33:1122-1128.
50. Weyand CM, Younge BR, Goronzy JJ. IFN-gamma and IL-17: the two faces of T-cell pathology in giant cell arteritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2011; 23:43-49.
51. Cid MC, Campo E, Ercilla G, Palacin A, Vilaseca J, Villalta J, et al. Immunohistochemical analysis of lymphoid and macrophage cell subsets and their immunologic activation markers in temporal arteritis. Influence of corticosteroid treatment. *Arthritis Rheum.* 1989; 32:884-893.
52. Banks PM, Cohen MD, Ginsburg WW, Hunder GG. Immunohistologic and cytochemical studies of temporal arteritis. *Arthritis Rheum.* 1983; 26:1201-1207.
53. Weyand CM, Bartley GB. Giant cell arteritis: new concepts in pathogenesis and implications for management. *Am J Ophthalmol.* 1997; 123:392-395.
54. Lie JT. Histopathologic specificity of systemic vasculitis. *Rheum Dis Clin North Am.* 1995; 21:883-909.
55. Weyand CM, Ma-Krupa W, Goronzy JJ. Immunopathways in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Autoimmun Rev.* 2004; 3:46-53.
56. Poller DN, van Wyk Q, Jeffrey MJ. The importance of skip lesions in temporal arteritis. *J Clin Pathol.* 2000; 53:137-139.

57. Ma-Krupa W, Kwan M, Goronzy JJ, Weyand CM. Toll-like receptors in giant cell arteritis. *Clin Immunol*. 2005; 115:38-46.
58. Ly KH, Regent A, Tamby MC, Mouthon L. Pathogenesis of giant cell arteritis: More than just an inflammatory condition? *Autoimmun Rev*. 2010; 9:635-645.
59. Krupa WM, Dewan M, Jeon MS, Kurtin PJ, Younge BR, Goronzy JJ, et al. Trapping of misdirected dendritic cells in the granulomatous lesions of giant cell arteritis. *Am J Pathol*. 2002; 161:1815-1823.
60. Weyand CM, Ma-Krupa W, Pryshchep O, Groschel S, Bernardino R, Goronzy JJ. Vascular dendritic cells in giant cell arteritis. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1062:195-208.
61. Goronzy JJ, Weyand CM. Cytokines in giant-cell arteritis. *Cleve Clin J Med*. 2002; 69 Suppl 2:SII91-94.
62. Weyand CM, Wagner AD, Bjornsson J, Goronzy JJ. Correlation of the topographical arrangement and the functional pattern of tissue-infiltrating macrophages in giant cell arteritis. *J Clin Invest*. 1996; 98:1642-1649.
63. Roche NE, Fulbright JW, Wagner AD, Hunder GG, Goronzy JJ, Weyand CM. Correlation of interleukin-6 production and disease activity in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*. 1993; 36:1286-1294.
64. Cid MC, Cebrian M, Font C, Coll-Vinent B, Hernandez-Rodriguez J, Esparza J, et al. Cell adhesion molecules in the development of inflammatory infiltrates in giant cell arteritis: inflammation-induced angiogenesis as the preferential site of leukocyte-endothelial cell interactions. *Arthritis Rheum*. 2000; 43:184-194.
65. Blann AD, Scott DG. Activated, cytotoxic lymphocytes in systemic vasculitis. *Rheumatol Int*. 1991; 11:69-72.
66. Wawryk SO, Ayberk H, Boyd AW, Rode J. Analysis of adhesion molecules in the immunopathogenesis of giant cell arteritis. *J Clin Pathol*. 1991; 44:497-501.
67. Dasgupta B, Duke O, Timms AM, Pitzalis C, Panayi GS. Selective depletion and activation of CD8+ lymphocytes from peripheral blood of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis*. 1989; 48:307-311.
68. Carmona FD, Gonzalez-Gay MA, Martin J. Genetic component of giant cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2014; 53:6-18.
69. Weyand CM, Hunder NN, Hicok KC, Hunder GG, Goronzy JJ. HLA-DRB1 alleles in polymyalgia rheumatica, giant cell arteritis, and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1994; 37:514-520.
70. Rauzy O, Fort M, Nourhashemi F, Alric L, Juchet H, Ecoiffier M, et al. Relation between HLA DRB1 alleles and corticosteroid resistance in giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis*. 1998; 57:380-382.
71. Combe B, Sany J, Le Quellec A, Clot J, Eliaou JF. Distribution of HLA-DRB1 alleles of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis in a Mediterranean population. *J Rheumatol*. 1998; 25:94-98.
72. Dababneh A, Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Hajeer A, Thomson W, Ollier W. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica can be differentiated by distinct patterns of HLA class II association. *J Rheumatol*. 1998; 25:2140-2145.
73. Salvarani C, Boiardi L, Mantovani V, Ranzi A, Cantini F, Olivieri I, et al. HLA-DRB1, DQA1, and DQB1 alleles associated with giant cell arteritis in northern Italy. *J Rheumatol*. 1999; 26:2395-2399.
74. Martinez-Taboda VM, Bartolome MJ, Lopez-Hoyos M, Blanco R, Mata C, Calvo J, et al. HLA-DRB1 allele distribution in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis: influence on clinical subgroups and prognosis. *Semin Arthritis Rheum*. 2004; 34:454-464.

75. Mattey DL, Hajeer AH, Dababneh A, Thomson W, Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, et al. Association of giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica with different tumor necrosis factor microsatellite polymorphisms. *Arthritis Rheum.* 2000; 43:1749-1755.
76. Makki RF, al Sharif F, Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Ollier WE, Hajeer AH. RANTES gene polymorphism in polymyalgia rheumatica, giant cell arteritis and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2000; 18:391-393.
77. Salvarani C, Casali B, Boiardi L, Ranzi A, Macchioni P, Nicoli D, et al. Intercellular adhesion molecule 1 gene polymorphisms in polymyalgia rheumatica/giant cell arteritis: association with disease risk and severity. *J Rheumatol.* 2000; 27:1215-1221.
78. Gonzalez-Gay MA, Hajeer AH, Dababneh A, Garcia-Porrúa C, Mattey DL, Amoli MM, et al. IL-6 promoter polymorphism at position -174 modulates the phenotypic expression of polymyalgia rheumatica in biopsy-proven giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2002; 20:179-184.
79. Enjuanes A, Benavente Y, Hernandez-Rodriguez J, Queralt C, Yague J, Jares P, et al. Association of NOS2 and potential effect of VEGF, IL6, CCL2 and IL1RN polymorphisms and haplotypes on susceptibility to GCA--a simultaneous study of 130 potentially functional SNPs in 14 candidate genes. *Rheumatology (Oxford).* 2012; 51:841-851.
80. Salvarani C, Casali B, Nicoli D, Farnetti E, Macchioni P, Catanoso MG, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* 2003; 48:3219-3223.
81. Amoli MM, Garcia-Porrúa C, Llorca J, Ollier WE, Gonzalez-Gay MA. Endothelial nitric oxide synthase haplotype associations in biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol.* 2003; 30:2019-2022.
82. Boiardi L, Casali B, Nicoli D, Farnetti E, Chen Q, Macchioni P, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in giant cell arteritis. *J Rheumatol.* 2003; 30:2160-2164.
83. Rueda B, Lopez-Nevot MA, Lopez-Diaz MJ, Garcia-Porrúa C, Martin J, Gonzalez-Gay MA. A functional variant of vascular endothelial growth factor is associated with severe ischemic complications in giant cell arteritis. *J Rheumatol.* 2005; 32:1737-1741.
84. Gonzalez-Gay MA, Hajeer AH, Dababneh A, Garcia-Porrúa C, Amoli MM, Llorca J, et al. Interferon-gamma gene microsatellite polymorphisms in patients with biopsy-proven giant cell arteritis and isolated polymyalgia rheumatica. *Clin Exp Rheumatol.* 2004; 22:S18-20.
85. Amoli MM, Gonzalez-Gay MA, Zeggini E, Salway F, Garcia-Porrúa C, Ollier WE. Epistatic interactions between HLA-DRB1 and interleukin 4, but not interferon-gamma, increase susceptibility to giant cell arteritis. *J Rheumatol.* 2004; 31:2413-2417.
86. Gonzalez-Gay MA, Oliver J, Sanchez E, Garcia-Porrúa C, Paco L, Lopez-Nevot MA, et al. Association of a functional inducible nitric oxide synthase promoter variant with susceptibility to biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol.* 2005; 32:2178-2182.
87. Amoli MM, Salway F, Zeggini E, Ollier WE, Gonzalez-Gay MA. MCP-1 gene haplotype association in biopsy proven giant cell arteritis. *J Rheumatol.* 2005; 32:507-510.
88. Boiardi L, Casali B, Farnetti E, Pipitone N, Nicoli D, Macchioni P, et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:4011-4017.
89. Rueda B, Roibas B, Martin J, Gonzalez-Gay MA. Influence of interleukin 10 promoter polymorphisms in susceptibility to giant cell arteritis in Northwestern Spain. *J Rheumatol.* 2007; 34:1535-1539.
90. Morgan AW, Robinson JI, Barrett JH, Martin J, Walker A, Babbage SJ, et al. Association of FCGR2A and FCGR2A-FCGR3A haplotypes with susceptibility to giant cell arteritis. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8:R109.

91. Rodriguez-Pla A, Beaty TH, Savino PJ, Eagle RC, Jr., Seo P, Soloski MJ. Association of a nonsynonymous single-nucleotide polymorphism of matrix metalloproteinase 9 with giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58:1849-1853.
92. Salvarani C, Casali B, Farnetti E, Pipitone N, Nicoli D, Macchioni PL, et al. -463 G/A myeloperoxidase promoter polymorphism in giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67:485-488.
93. Palomino-Morales R, Torres O, Vazquez-Rodriguez TR, Morado IC, Castaneda S, Callejas-Rubio JL, et al. Association between toll-like receptor 4 gene polymorphism and biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol.* 2009; 36:1501-1506.
94. Palomino-Morales RJ, Vazquez-Rodriguez TR, Torres O, Morado IC, Castaneda S, Miranda-Filloy JA, et al. Association between IL-18 gene polymorphisms and biopsy-proven giant cell arteritis. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12:R51.
95. Rodriguez-Rodriguez L, Carmona FD, Castaneda S, Miranda-Filloy JA, Morado IC, Narvaez J, et al. Role of rs1343151 IL23R and rs3790567 IL12RB2 polymorphisms in biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol.* 2011; 38:889-892.
96. Rodriguez-Rodriguez L, Castaneda S, Vazquez-Rodriguez TR, Morado IC, Gomez-Vaquero C, Mari-Alfonso B, et al. Role of the rs6822844 gene polymorphism at the IL2-IL21 region in biopsy-proven giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2011; 29:S12-16.
97. Fernald GH, Yeh RF, Hauser SL, Oksenberg JR, Baranzini SE. Mapping gene activity in complex disorders: Integration of expression and genomic scans for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2005; 167:157-169.
98. Haines JL, Terwedow HA, Burgess K, Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Martin ER, et al. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum Mol Genet.* 1998; 7:1229-1234.
99. Bignon JD, Ferec C, Barrier J, Pennec Y, Verlingue C, Cheneau ML, et al. HLA class II genes polymorphism in DR4 giant cell arteritis patients. *Tissue Antigens.* 1988; 32:254-258.
100. Richardson JE, Gladman DD, Fam A, Keystone EC. HLA-DR4 in giant cell arteritis: association with polymyalgia rheumatica syndrome. *Arthritis Rheum.* 1987; 30:1293-1297.
101. Bignon JD, Barrier J, Soulillou JP, Martin P, Grolleau JY. HLA DR4 and giant cell arteritis. *Tissue Antigens.* 1984; 24:60-62.
102. Barrier J, Bignon JD, Soulillou JP, Grolleau J. Increased prevalence of HLA-DR4 in giant-cell arteritis. *N Engl J Med.* 1981; 305:104-105.
103. Weyand CM, Schonberger J, Oppitz U, Hunder NN, Hicok KC, Goronzy JJ. Distinct vascular lesions in giant cell arteritis share identical T cell clonotypes. *J Exp Med.* 1994; 179:951-960.
104. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Hajeer AH, Dababneh A, Ollier WE. HLA-DRB1\*04 may be a marker of severity in giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis.* 2000; 59:574-575.
105. Labbe P, Flipo RM, Fajardy I, Hachulla E, Houvenagel E, Hatron PY, et al. [HLA DRB1 polymorphism in rhizomelic pseudo-polyarthritides and Horton disease]. *Rev Med Interne.* 1995; 16:778-781.
106. Kemp A, Marner K, Nissen SH, Heyn J, Kissmeyer-Nielsen F. HLA antigens in cases of giant cell arteritis. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1980; 58:1000-1004.
107. Hansen JA, Healey LA, Wilske KR. Association between giant cell (temporal) arteritis and HLA-Cw3. *Hum Immunol.* 1985; 13:193-198.
108. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91:6259-6263.
109. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 1999; 285:727-729.
110. Bahram S, Mizuki N, Inoko H, Spies T. Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics.* 1996; 44:80-81.

111. Ota M, Katsuyama Y, Mizuki N, Ando H, Furihata K, Ono S, et al. Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. *Tissue Antigens*. 1997; 49:448-454.
112. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001; 104:487-501.
113. Hernandez-Rodriguez J, Segarra M, Vilardell C, Sanchez M, Garcia-Martinez A, Esteban MJ, et al. Tissue production of pro-inflammatory cytokines (IL-1beta, TNFalpha and IL-6) correlates with the intensity of the systemic inflammatory response and with corticosteroid requirements in giant-cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2004; 43:294-301.
114. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*. 2007; 96:41-101.
115. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19:683-765.
116. Koch W, Kastrati A, Bottiger C, Mehilli J, von Beckerath N, Schomig A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2001; 159:137-144.
117. Hajeer AH, Lazarus M, Turner D, Mageed RA, Vencovsky J, Sinnott P, et al. IL-10 gene promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 1998; 27:142-145.
118. Rood MJ, Keijsers V, van der Linden MW, Tong TQ, Borggreve SE, Verweij CL, et al. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus is associated with imbalance in interleukin 10 promoter haplotypes. *Ann Rheum Dis*. 1999; 58:85-89.
119. Hulkkonen J, Pertovaara M, Anttonen J, Lahdenpohja N, Pasternack A, Hurme M. Genetic association between interleukin-10 promoter region polymorphisms and primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2001; 44:176-179.
120. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:933-944.
121. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23:1-21.
122. Cenit MC, Simeon CP, Vonk MC, Callejas-Rubio JL, Espinosa G, Carreira P, et al. Influence of the IL6 gene in susceptibility to systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2012; 39:2294-2302.
123. Schotte H, Schluter B, Rust S, Assmann G, Domschke W, Gaubitz M. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Caucasian German patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2001; 40:393-400.
124. Emonts M, Hazes MJ, Houwing-Duistermaat JJ, van der Gaast-de Jongh CE, de Vogel L, Han HK, et al. Polymorphisms in genes controlling inflammation and tissue repair in rheumatoid arthritis: a case control study. *BMC Med Genet*. 2011; 12:36.
125. Dasgupta B, Panayi GS. Interleukin-6 in serum of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Br J Rheumatol*. 1990; 29:456-458.
126. Salvarani C, Casali B, Farnetti E, Pipitone N, Nicoli D, Macchioni P, et al. Interleukin-6 promoter polymorphism at position -174 in giant cell arteritis. *J Rheumatol*. 2005; 32:2173-2177.
127. Thompson SR, Humphries SE. Interleukin-18 genetics and inflammatory disease susceptibility. *Genes Immun*. 2007; 8:91-99.
128. Sanchez E, Palomino-Morales RJ, Ortego-Centeno N, Jimenez-Alonso J, Gonzalez-Gay MA, Lopez-Nevot MA, et al. Identification of a new putative functional IL18 gene variant through an association study in systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet*. 2009; 18:3739-3748.
129. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91:3652-3656.

130. Ellingsen T, Elling P, Olson A, Elling H, Baandrup U, Matsushima K, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in temporal arteritis and polymyalgia rheumatica. *Ann Rheum Dis.* 2000; 59:775-780.
131. Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Johnson B, Evanoff HL, Haines GK, et al. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1992; 90:772-779.
132. Kim HL, Lee DS, Yang SH, Lim CS, Chung JH, Kim S, et al. The polymorphism of monocyte chemoattractant protein-1 is associated with the renal disease of SLE. *Am J Kidney Dis.* 2002; 40:1146-1152.
133. Kim SK, Jang WC, Ahn YC, Lee SH, Lee SS, Hur JW. Promoter -2518 single nucleotide polymorphism of monocyte chemoattractant protein-1 is associated with clinical severity in Behcet's disease. *Inflamm Res.* 2012; 61:541-545.
134. Aguilar F, Gonzalez-Escribano MF, Sanchez-Roman J, Nunez-Roldan A. MCP-1 promoter polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens.* 2001; 58:335-338.
135. Bacon KB, Premack BA, Gardner P, Schall TJ. Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science.* 1995; 269:1727-1730.
136. Pulsatelli L, Meliconi R, Boiardi L, Macchioni P, Salvarani C, Facchini A. Elevated serum concentrations of the chemokine RANTES in patients with polymyalgia rheumatica. *Clin Exp Rheumatol.* 1998; 16:263-268.
137. Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24:657-679.
138. Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5:688-698.
139. Diaz-Gallo LM, Simeon CP, Broen JC, Ortego-Centeno N, Beretta L, Vonk MC, et al. Implication of IL-2/IL-21 region in systemic sclerosis genetic susceptibility. *Ann Rheum Dis.* 2012; 72:1233-1238.
140. Zhernakova A, Alizadeh BZ, Bevova M, van Leeuwen MA, Coenen MJ, Franke B, et al. Novel association in chromosome 4q27 region with rheumatoid arthritis and confirmation of type 1 diabetes point to a general risk locus for autoimmune diseases. *Am J Hum Genet.* 2007; 81:1284-1288.
141. Maiti AK, Kim-Howard X, Viswanathan P, Guillen L, Rojas-Villarraga A, Deshmukh H, et al. Confirmation of an association between rs6822844 at the IL2-IL21 region and multiple autoimmune diseases: evidence of a general susceptibility locus. *Arthritis Rheum.* 2010; 62:323-329.
142. Hollis-Moffatt JE, Chen-Xu M, Topless R, Dalbeth N, Gow PJ, Harrison AA, et al. Only one independent genetic association with rheumatoid arthritis within the KIAA1109-TENR-IL2-IL21 locus in Caucasian sample sets: confirmation of association of rs6822844 with rheumatoid arthritis at a genome-wide level of significance. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12:R116.
143. Koch MA, Thomas KR, Perdue NR, Smigiel KS, Srivastava S, Campbell DJ. T-bet(+) Treg cells undergo abortive Th1 cell differentiation due to impaired expression of IL-12 receptor beta2. *Immunity.* 2012; 37:501-510.
144. Deng J, Younge BR, Olshen RA, Goronzy JJ, Weyand CM. Th17 and Th1 T-cell responses in giant cell arteritis. *Circulation.* 2010; 121:906-915.
145. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994; 76:301-314.
146. Amoli MM, Shelley E, Matthey DL, Garcia-Porrúa C, Thomson W, Hajeer AH, et al. Lack of association between intercellular adhesion molecule-1 gene polymorphisms and giant cell arteritis. *J Rheumatol.* 2001; 28:1600-1604.

147. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999; 13:9-22.
148. Cid MC, Hernandez-Rodriguez J, Esteban MJ, Cebrian M, Gho YS, Font C, et al. Tissue and serum angiogenic activity is associated with low prevalence of ischemic complications in patients with giant-cell arteritis. *Circulation.* 2002; 106:1664-1671.
149. Meliconi R, Pulsatelli L, Dolzani P, Boiardi L, Macchioni P, Salvarani C, et al. Vascular endothelial growth factor production in polymyalgia rheumatica. *Arthritis Rheum.* 2000; 43:2472-2480.
150. Baldini M, Maugeri N, Ramirez GA, Giacomassi C, Castiglioni A, Prieto-Gonzalez S, et al. Selective up-regulation of the soluble pattern-recognition receptor pentraxin 3 and of vascular endothelial growth factor in giant cell arteritis: relevance for recent optic nerve ischemia. *Arthritis Rheum.* 2012; 64:854-865.
151. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet.* 2003; 34:383-394.
152. Yki-Jarvinen H, Bergholm R, Leirisalo-Repo M. Increased inflammatory activity parallels increased basal nitric oxide production and blunted response to nitric oxide in vivo in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62:630-634.
153. Rittner HL, Kaiser M, Brack A, Szweda LI, Goronzy JJ, Weyand CM. Tissue-destructive macrophages in giant cell arteritis. *Circ Res.* 1999; 84:1050-1058.
154. Kobayashi Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J Leukoc Biol.* 2010; 88:1157-1162.
155. Moncada S. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci.* 1997; 811:60-67; discussion 67-69.
156. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88:4651-4655.
157. Galis ZS, Khatra JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 2002; 90:251-262.
158. de Nooijer R, Verkleij CJ, von der Thusen JH, Jukema JW, van der Wall EE, van Berkel TJ, et al. Lesional overexpression of matrix metalloproteinase-9 promotes intraplaque hemorrhage in advanced lesions but not at earlier stages of atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:340-346.
159. Segarra M, Garcia-Martinez A, Sanchez M, Hernandez-Rodriguez J, Lozano E, Grau JM, et al. Gelatinase expression and proteolytic activity in giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66:1429-1435.
160. Jones GT, Phillips VL, Harris EL, Rossaak JI, van Rij AM. Functional matrix metalloproteinase-9 polymorphism (C-1562T) associated with abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 2003; 38:1363-1367.
161. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997; 388:394-397.
162. Ferwerda B, McCall MB, Verheijen K, Kullberg BJ, van der Ven AJ, Van der Meer JW, et al. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms. *Mol Med.* 2008; 14:346-352.
163. Alvarez-Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Beares I, Munoz Cacho P, Mata C, Calvo-Alen J, et al. Lack of association between Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and giant cell arteritis. *Rheumatology (Oxford).* 2011; 50:1562-1568.
164. Boiardi L, Casali B, Farnetti E, Pipitone N, Nicoli D, Macchioni P, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) gene polymorphisms in giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2009; 27:S40-44.

165. Song GG, Choi SJ, Ji JD, Lee YH. Toll-like receptor polymorphisms and vasculitis susceptibility: meta-analysis and systematic review. *Mol Biol Rep.* 2013; 40:1315-1323.
166. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet.* 2000; 25:187-191.
167. Liu Y, Jones B, Aruffo A, Sullivan KM, Linsley PS, Janeway CA, Jr. Heat-stable antigen is a costimulatory molecule for CD4 T cell growth. *J Exp Med.* 1992; 175:437-445.
168. De Bruijn ML, Peterson PA, Jackson MR. Induction of heat-stable antigen expression by phagocytosis is involved in in vitro activation of unprimed CTL by macrophages. *J Immunol.* 1996; 156:2686-2692.
169. Taniuchi K, Nishimori I, Hollingsworth MA. Intracellular CD24 inhibits cell invasion by posttranscriptional regulation of BART through interaction with G3BP. *Cancer Res.* 2011; 71:895-905.
170. Deng J, Gao G, Wang L, Wang T, Yu J, Zhao Z. CD24 expression as a marker for predicting clinical outcome in human gliomas. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012:517172.
171. Huang LR, Hsu HC. Cloning and expression of CD24 gene in human hepatocellular carcinoma: a potential early tumor marker gene correlates with p53 mutation and tumor differentiation. *Cancer Res.* 1995; 55:4717-4721.
172. Kristiansen G, Sammar M, Altevogt P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol.* 2004; 35:255-262.
173. Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2:580-592.
174. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med.* 1980; 93:480-489.
175. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol.* 2005; 77:598-625.
176. Nambi V. The use of myeloperoxidase as a risk marker for atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2005; 7:127-131.
177. Choi HK, Liu S, Merkel PA, Colditz GA, Niles JL. Diagnostic performance of antineutrophil cytoplasmic antibody tests for idiopathic vasculitides: metaanalysis with a focus on antimyeloperoxidase antibodies. *J Rheumatol.* 2001; 28:1584-1590.
178. Asselbergs FW, Reynolds WF, Cohen-Tervaert JW, Jessurun GA, Tio RA. Myeloperoxidase polymorphism related to cardiovascular events in coronary artery disease. *Am J Med.* 2004; 116:429-430.
179. Piedrafita FJ, Molander RB, Vansant G, Orlova EA, Pfahl M, Reynolds WF. An Alu element in the myeloperoxidase promoter contains a composite SP1-thyroid hormone-retinoic acid response element. *J Biol Chem.* 1996; 271:14412-14420.
180. Cho JH, Gregersen PK. Genomics and the multifactorial nature of human autoimmune disease. *N Engl J Med.* 2011; 365(17):1612-1623.
181. Zhernakova A, van Diemen CC, Wijmenga C. Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. *Nat Rev Genet.* 2009; 10:43-55.
182. Zenewicz LA, Abraham C, Flavell RA, Cho JH. Unraveling the genetics of autoimmunity. *Cell.* 2010; 140:791-797.
183. Cotsapas C, Voight BF, Rossin E, Lage K, Neale BM, Wallace C, et al. Pervasive sharing of genetic effects in autoimmune disease. *PLoS Genet.* 2011; 7:e1002254.
184. Orozco G, Rueda B, Martin J. Genetic basis of rheumatoid arthritis. *Biomed Pharmacother.* 2006; 60:656-662.
185. Gonzalez-Gay MA, Amoli MM, Garcia-Porrúa C, Ollier WE. Genetic markers of disease susceptibility and severity in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Semin Arthritis Rheum.* 2003; 33:38-48.



186. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet.* 2008; 40:955-962.
187. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP, et al. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet.* 2007; 80:273-290.
188. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G, et al. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet.* 2008; 40:1319-1323.
189. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 2003; 421:744-748.
190. McGeachy MJ, Cua DJ. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity.* 2008; 28:445-453.
191. van Heel DA, Franke L, Hunt KA, Gwilliam R, Zhernakova A, Inouye M, et al. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet.* 2007; 39:827-829.
192. Festen EA, Goyette P, Scott R, Annese V, Zhernakova A, Lian J, et al. Genetic variants in the region harbouring IL2/IL21 associated with ulcerative colitis. *Gut.* 2009; 58:799-804.
193. Cooper JD, Smyth DJ, Smiles AM, Plagnol V, Walker NM, Allen JE, et al. Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nat Genet.* 2008; 40:1399-1401.
194. Lowe CE, Cooper JD, Brusko T, Walker NM, Smyth DJ, Bailey R, et al. Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet.* 2007; 39:1074-1082.
195. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007; 357:851-862.
196. Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet.* 2010; 42:508-514.
197. Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010; 42:1118-1125.
198. Consortium TWTCC. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007; 447:661-678.
199. Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, et al. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet.* 2007; 39:1329-1337.
200. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet.* 2007; 39:857-864.
201. Vella A, Cooper JD, Lowe CE, Walker N, Nutland S, Widmer B, et al. Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 2005; 76:773-779.
202. Fina D, Sarra M, Caruso R, Del Vecchio Blanco G, Pallone F, MacDonald TT, et al. Interleukin 21 contributes to the mucosal T helper cell type 1 response in coeliac disease. *Gut.* 2008; 57:887-892.

203. Fina D, Caruso R, Pallone F, Monteleone G. Interleukin-21 (IL-21) controls inflammatory pathways in the gut. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2007; 7:288-291.
204. Brusko TM, Putnam AL, Bluestone JA. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol Rev*. 2008; 223:371-390.
205. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008; 133:775-787.
206. Sadlack B, Lohler J, Schorle H, Klebb G, Haber H, Sickel E, et al. Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 1995; 25:3053-3059.
207. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*. 1993; 75:253-261.
208. Harley JB, Alarcon-Riquelme ME, Criswell LA, Jacob CO, Kimberly RP, Moser KL, et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet*. 2008; 40:204-210.
209. Hunt KA, Zhernakova A, Turner G, Heap GA, Franke L, Bruinenberg M, et al. Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat Genet*. 2008; 40:395-402.
210. Kavvoura FK, Akamizu T, Awata T, Ban Y, Chistiakov DA, Frydecka I, et al. Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 gene polymorphisms and autoimmune thyroid disease: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92:3162-3170.
211. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet*. 2004; 36:337-338.
212. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*. 2004; 75:330-337.
213. Diaz-Gallo LM, Espino-Paisan L, Franssen K, Gomez-Garcia M, van Sommeren S, Cardena C, et al. Differential association of two PTPN22 coding variants with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2011; 17:2287-2294.
214. Begovich AB, Caillier SJ, Alexander HC, Penko JM, Hauser SL, Barcellos LF, et al. The R620W polymorphism of the protein tyrosine phosphatase PTPN22 is not associated with multiple sclerosis. *Am J Hum Genet*. 2005; 76:184-187.
215. Hasegawa K, Martin F, Huang G, Tumas D, Diehl L, Chan AC. PEST domain-enriched tyrosine phosphatase (PEP) regulation of effector/memory T cells. *Science*. 2004; 303:685-689.
216. Zhang J, Zahir N, Jiang Q, Miliotis H, Heyraud S, Meng X, et al. The autoimmune disease-associated PTPN22 variant promotes calpain-mediated Lyp/Pep degradation associated with lymphocyte and dendritic cell hyperresponsiveness. *Nat Genet*. 2011; 43:902-907.
217. Zikherman J, Hermiston M, Steiner D, Hasegawa K, Chan A, Weiss A. PTPN22 deficiency cooperates with the CD45 E613R allele to break tolerance on a non-autoimmune background. *J Immunol*. 2009; 182:4093-4106.
218. Gregersen PK, Lee HS, Batliwalla F, Begovich AB. PTPN22: setting thresholds for autoimmunity. *Semin Immunol*. 2006; 18:214-223.
219. Graham RR, Kyogoku C, Sigurdsson S, Vlasova IA, Davies LR, Baechler EC, et al. Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:6758-6763.
220. Hirschfield GM, Liu X, Han Y, Gorlov IP, Lu Y, Xu C, et al. Variants at IRF5-TNPO3, 17q12-21 and MMEL1 are associated with primary biliary cirrhosis. *Nat Genet*. 2010; 42:655-657.

221. Liu X, Invernizzi P, Lu Y, Kosoy R, Bianchi I, Podda M, et al. Genome-wide meta-analyses identify three loci associated with primary biliary cirrhosis. *Nat Genet.* 2010; 42:658-660.
222. Sun SC. Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8:501-511.
223. Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, Tsui C, et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nat Immunol.* 2004; 5:1052-1060.
224. Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, et al. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science.* 2000; 289:2350-2354.
225. Turer EE, Tavares RM, Mortier E, Hitotsumatsu O, Advincula R, Lee B, et al. Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. *J Exp Med.* 2008; 205:451-464.
226. Wang S, Wen F, Wiley GB, Kinter MT, Gaffney PM. An enhancer element harboring variants associated with systemic lupus erythematosus engages the TNFAIP3 promoter to influence A20 expression. *PLoS Genet.* 2013; 9:e1003750.
227. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between TNFAIP3 gene polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Inflamm Res.* 2012; 61:635-641.
228. Coenen MJ, Trynka G, Heskamp S, Franke B, van Diemen CC, Smolonska J, et al. Common and different genetic background for rheumatoid arthritis and coeliac disease. *Hum Mol Genet.* 2009; 18:4195-4203.
229. Cordell HJ, Clayton DG. Genetic association studies. *Lancet.* 2005; 366:1121-1131.
230. Slatkin M. Linkage disequilibrium in growing and stable populations. *Genetics.* 1994; 137:331-336.
231. Devlin B, Risch N. A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics.* 1995; 29:311-322.
232. Pontillo A, Catamo E, Arosio B, Mari D, Crovella S. NALP1/NLRP1 Genetic Variants are Associated With Alzheimer Disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2011.
233. Dieude P, Guedj M, Wipff J, Ruiz B, Riemekasten G, Airo P, et al. NLRP1 influences the systemic sclerosis phenotype: a new clue for the contribution of innate immunity in systemic sclerosis-related fibrosing alveolitis pathogenesis. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70:668-674.
234. Magitta NF, Boe Wolff AS, Johansson S, Skinningsrud B, Lie BA, Myhr KM, et al. A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. *Genes Immun.* 2009; 10:120-124.
235. Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4:95-104.
236. Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:10913-10918.
237. Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14:409-426.
238. Gonzalez-Gay MA, Lopez-Diaz MJ, Barros S, Garcia-Porrúa C, Sanchez-Andrade A, Paz-Carreira J, et al. Giant cell arteritis: laboratory tests at the time of diagnosis in a series of 240 patients. *Medicine (Baltimore).* 2005; 84:277-290.
239. Mustelin T, Vang T, Bottini N. Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5:43-57.
240. Gregersen PK, Behrens TW. Genetics of autoimmune diseases--disorders of immune homeostasis. *Nat Rev Genet.* 2006; 7:917-928.

241. Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orru V, Zavattari P, et al. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet.* 2005; 37:1317-1319.
242. Baranathan V, Stanford MR, Vaughan RW, Kondeatis E, Graham E, Fortune F, et al. The association of the PTPN22 620W polymorphism with Behcet's disease. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66:1531-1533.
243. Martorana D, Maritati F, Malerba G, Bonatti F, Alberici F, Oliva E, et al. PTPN22 R620W polymorphism in the ANCA-associated vasculitides. *Rheumatology (Oxford).* 2012; 51:805-812.
244. Gonzalez-Gay MA, Oliver J, Orozco G, Garcia-Porrúa C, Lopez-Nevot MA, Martin J. Lack of association of a functional single nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with susceptibility to biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol.* 2005; 32:1510-1512.
245. Rieck M, Arechiga A, Onengut-Gumuscu S, Greenbaum C, Concannon P, Buckner JH. Genetic variation in PTPN22 corresponds to altered function of T and B lymphocytes. *J Immunol.* 2007; 179:4704-4710.
246. Liston A, Lesage S, Gray DH, Boyd RL, Goodnow CC. Genetic lesions in T-cell tolerance and thresholds for autoimmunity. *Immunol Rev.* 2005; 204:87-101.
247. Gregersen PK. Gaining insight into PTPN22 and autoimmunity. *Nat Genet.* 2005; 37:1300-1302.
248. Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R, Yamamoto K. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. *J Hum Genet.* 2005; 50:264-266.
249. Dieude P, Guedj M, Wipff J, Avouac J, Hachulla E, Diot E, et al. The PTPN22 620W allele confers susceptibility to systemic sclerosis: findings of a large case-control study of European Caucasians and a meta-analysis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58:2183-2188.
250. Mustelin T. Are other protein tyrosine phosphatases than PTPN22 associated with autoimmunity? *Semin Immunol.* 2006; 18:254-260.
251. Nath SK, Han S, Kim-Howard X, Kelly JA, Viswanathan P, Gilkeson GS, et al. A nonsynonymous functional variant in integrin-alpha(M) (encoded by ITGAM) is associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2008; 40:152-154.
252. Han S, Kim-Howard X, Deshmukh H, Kamatani Y, Viswanathan P, Guthridge JM, et al. Evaluation of imputation-based association in and around the integrin-alpha-M (ITGAM) gene and replication of robust association between a non-synonymous functional variant within ITGAM and systemic lupus erythematosus (SLE). *Hum Mol Genet.* 2009; 18:1171-1180.
253. Carmona FD, Simeon CP, Beretta L, Carreira P, Vonk MC, Rios-Fernandez R, et al. Association of a non-synonymous functional variant of the ITGAM gene with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70:2050-2052.
254. Buyon JP, Shadick N, Berkman R, Hopkins P, Dalton J, Weissmann G, et al. Surface expression of Gp 165/95, the complement receptor CR3, as a marker of disease activity in systemic Lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol.* 1988; 46:141-149.
255. Hepburn AL, Mason JC, Wang S, Shepherd CJ, Florey O, Haskard DO, et al. Both Fc gamma and complement receptors mediate transfer of immune complexes from erythrocytes to human macrophages under physiological flow conditions in vitro. *Clin Exp Immunol.* 2006; 146:133-145.
256. Xu Z, Jin B. A novel interface consisting of homologous immunoglobulin superfamily members with multiple functions. *Cell Mol Immunol.* 2010; 7:11-19.
257. Shibuya K, Shirakawa J, Kameyama T, Honda S, Tahara-Hanaoka S, Miyamoto A, et al. CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte function-associated antigen 1 costimulatory signal for naive T cell differentiation and proliferation. *J Exp Med.* 2003; 198:1829-1839.

258. Shibuya A, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, McClanahan T, et al. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity*. 1996; 4:573-581.
259. Hafler JP, Maier LM, Cooper JD, Plagnol V, Hinks A, Simmonds MJ, et al. CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases. *Genes Immun*. 2009; 10:5-10.
260. Wieczorek S, Hoffjan S, Chan A, Rey L, Harper L, Fricke H, et al. Novel association of the CD226 (DNAM-1) Gly307Ser polymorphism in Wegener's granulomatosis and confirmation for multiple sclerosis in German patients. *Genes Immun*. 2009; 10:591-595.
261. Dieude P, Guedj M, Truchetet ME, Wipff J, Revillod L, Riemekasten G, et al. Association of the CD226 Ser(307) variant with systemic sclerosis: evidence of a contribution of costimulation pathways in systemic sclerosis pathogenesis. *Arthritis Rheum*. 2011; 63:1097-1105.
262. Lofgren SE, Delgado-Vega AM, Gallant CJ, Sanchez E, Frostegard J, Truedsson L, et al. A 3'-untranslated region variant is associated with impaired expression of CD226 in T and natural killer T cells and is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2010; 62(11):3404-3414.
263. Shimo Y, Yanai H, Ohshima D, Qin J, Motegi H, Maruyama Y, et al. TRAF6 directs commitment to regulatory T cells in thymocytes. *Genes Cells*. 2011; 16:437-447.
264. Chung JY, Lu M, Yin Q, Lin SC, Wu H. Molecular basis for the unique specificity of TRAF6. *Adv Exp Med Biol*. 2007; 597:122-130.
265. Raychaudhuri S, Thomson BP, Remmers EF, Eyre S, Hinks A, Guiducci C, et al. Genetic variants at CD28, PRDM1 and CD2/CD58 are associated with rheumatoid arthritis risk. *Nat Genet*. 2009; 41:1313-1318.
266. Namjou B, Choi CB, Harley IT, Alarcon-Riquelme ME, Kelly JA, Glenn SB, et al. Evaluation of TRAF6 in a large multiethnic lupus cohort. *Arthritis Rheum*. 2012; 64:1960-1969.
267. Martin JE, Bossini-Castillo L, Martin J. Unraveling the genetic component of systemic sclerosis. *Hum Genet*. 2012; 131:1023-1037.
268. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet*. 2008 Aug; 40(8):955-962.
269. Mabuchi T, Chang TW, Quinter S, Hwang ST. Chemokine receptors in the pathogenesis and therapy of psoriasis. *J Dermatol Sci*. 2012; 65:4-11.
270. Perkins EA, Landis D, Causey Mph ZL, Edberg Y, Reynolds RJ, Hughes LB, et al. Association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in CCR6, TAGAP and TNFAIP3 with rheumatoid arthritis in African Americans. *Arthritis Rheum*. 2011.
271. Ma-Krupa W, Jeon MS, Spoerl S, Tedder TF, Goronzy JJ, Weyand CM. Activation of arterial wall dendritic cells and breakdown of self-tolerance in giant cell arteritis. *J Exp Med*. 2004; 199:173-183.
272. Levinson NM, Seeliger MA, Cole PA, Kuriyan J. Structural basis for the recognition of c-Src by its inactivator Csk. *Cell*. 2008; 134:124-134.
273. Martin JE, Broen JC, Carmona FD, Teruel M, Simeon CP, Vonk MC, et al. Identification of CSK as a systemic sclerosis genetic risk factor through Genome Wide Association Study follow-up. *Hum Mol Genet*. 2012; 21:2825-2835.
274. Manjarrez-Orduno N, Marasco E, Chung SA, Katz MS, Kiridly JF, Simpfendorfer KR, et al. CSK regulatory polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus and influences B-cell signaling and activation. *Nat Genet*. 2012; 44:1227-1230.
275. Torres O, Palomino-Morales R, Vazquez-Rodriguez T, Castaneda S, Morado IC, Miranda-Filloy JA, et al. Lack of association between IFNGR1 gene polymorphisms and biopsy-proven giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2010; 28:31-34.

276. Torres O, Palomino-Morales R, Vazquez-Rodriguez TR, Gamallo C, Morado IC, Miranda-Fillooy JA, et al. Lack of association between hypoxia inducible factor-1 alpha gene polymorphisms and biopsy-proven giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2010; 28:40-45.
277. Terao C, Yoshifuji H, Kimura A, Matsumura T, Ohmura K, Takahashi M, et al. Two susceptibility loci to Takayasu arteritis reveal a synergistic role of the IL12B and HLA-B regions in a Japanese population. *Am J Hum Genet*. 2013; 93:289-297.
278. Saruhan-Direskeneli G, Hughes T, Aksu K, Keser G, Coit P, Aydin SZ, et al. Identification of multiple genetic susceptibility loci in Takayasu arteritis. *Am J Hum Genet*. 2013; 93:298-305.
279. Kimura A, Kobayashi Y, Takahashi M, Ohbuchi N, Kitamura H, Nakamura T, et al. MICA gene polymorphism in Takayasu's arteritis and Buerger's disease. *Int J Cardiol*. 1998; 66 Suppl 1:S107-113; discussion S115.
280. Park MC, Lee SW, Park YB, Lee SK. Serum cytokine profiles and their correlations with disease activity in Takayasu's arteritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006; 45:545-548.
281. Verma DK, Tripathy NK, Verma NS, Tiwari S. Interleukin 12 in Takayasu's arteritis: plasma concentrations and relationship with disease activity. *J Rheumatol*. 2005; 32:2361-2363.
282. Tripathy NK, Gupta PC, Nityanand S. High TNF-alpha and low IL-2 producing T cells characterize active disease in Takayasu's arteritis. *Clin Immunol*. 2006; 118:154-158.
283. Seegers D, Zwiers A, Strober W, Pena AS, Bouma G. A TaqI polymorphism in the 3'UTR of the IL-12 p40 gene correlates with increased IL-12 secretion. *Genes Immun*. 2002; 3:419-423.
284. Yilmaz V, Yentur SP, Saruhan-Direskeneli G. IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. *Cytokine*. 2005; 30:188-194.
285. Morahan G, Huang D, Ymer SI, Cancilla MR, Stephen K, Dabadghao P, et al. Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele. *Nat Genet*. 2001; 27:218-221.
286. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*. 1998; 102:1369-1376.
287. Panoulas VF, Stavropoulos-Kalinoglou A, Metsios GS, Smith JP, Milionis HJ, Douglas KM, et al. Association of interleukin-6 (IL-6)-174G/C gene polymorphism with cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: the role of obesity and smoking. *Atherosclerosis*. 2009; 204:178-183.
288. Pascual M, Nieto A, Mataran L, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Martin J. IL-6 promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Genes Immun*. 2000; 1:338-340.
289. Saruhan-Direskeneli G, Bicakcigil M, Yilmaz V, Kamali S, Aksu K, Fresko I, et al. Interleukin (IL)-12, IL-2, and IL-6 gene polymorphisms in Takayasu's arteritis from Turkey. *Hum Immunol*. 2006; 67:735-740.
290. Matsuda I, Hattori S, Nagata N, Fruse A, Nambu H. HLA antigens in mucocutaneous lymph node syndrome. *Am J Dis Child*. 1977; 131:1417-1418.
291. Kaslow RA, Bailowitz A, Lin FY, Koslowe P, Simonis T, Israel E. Association of epidemic Kawasaki syndrome with the HLA-A2, B44, Cw5 antigen combination. *Arthritis Rheum*. 1985; 28:938-940.
292. Biezeveld MH, Kuipers IM, Geissler J, Lam J, Ottenkamp JJ, Hack CE, et al. Association of mannose-binding lectin genotype with cardiovascular abnormalities in Kawasaki disease. *Lancet*. 2003; 361:1268-1270.
293. Breunis WB, Biezeveld MH, Geissler J, Ottenkamp J, Kuipers IM, Lam J, et al. Vascular endothelial growth factor gene haplotypes in Kawasaki disease. *Arthritis Rheum*. 2006; 54:1588-1594.

294. Burns JC, Shimizu C, Shike H, Newburger JW, Sundel RP, Baker AL, et al. Family-based association analysis implicates IL-4 in susceptibility to Kawasaki disease. *Genes Immun.* 2005; 6:438-444.
295. Ikeda K, Ihara K, Yamaguchi K, Muneuchi J, Ohno T, Mizuno Y, et al. Genetic analysis of MMP gene polymorphisms in patients with Kawasaki disease. *Pediatr Res.* 2008; 63:182-185.
296. Kariyazono H, Ohno T, Khajooe V, Ihara K, Kusuvara K, Kinukawa N, et al. Association of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor gene polymorphisms with coronary artery lesions of Kawasaki disease. *Pediatr Res.* 2004; 56:953-959.
297. Khor CC, Davila S, Breunis WB, Lee YC, Shimizu C, Wright VJ, et al. Genome-wide association study identifies FCGR2A as a susceptibility locus for Kawasaki disease. *Nat Genet.* 2011; 43:1241-1246.
298. Carr EJ, Niederer HA, Williams J, Harper L, Watts RA, Lyons PA, et al. Confirmation of the genetic association of CTLA4 and PTPN22 with ANCA-associated vasculitis. *BMC Med Genet.* 2009; 10:121.
299. Jagiello P, Aries P, Arning L, Wagenleiter SE, Csernok E, Hellmich B, et al. The PTPN22 620W allele is a risk factor for Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* 2005; 52:4039-4043.
300. Willcocks LC, Lyons PA, Rees AJ, Smith KG. The contribution of genetic variation and infection to the pathogenesis of ANCA-associated systemic vasculitis. *Arthritis Res Ther.* 2010; 12:202.
301. Mendes D, Correia M, Barbedo M, Vaio T, Mota M, Goncalves O, et al. Behcet's disease--a contemporary review. *J Autoimmun.* 2009; 32:178-188.
302. Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, et al. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:1298-1303.
303. Wallace GR, Kondeatis E, Vaughan RW, Verity DH, Chen Y, Fortune F, et al. IL-10 genotype analysis in patients with Behcet's disease. *Hum Immunol.* 2007; 68:122-127.
304. Dilek K, Ozcimen AA, Saricaoglu H, Saba D, Yucel A, Yurtkuran M, et al. Cytokine gene polymorphisms in Behcet's disease and their association with clinical and laboratory findings. *Clin Exp Rheumatol.* 2009; 27:573-78.
305. Remmers EF, Cosan F, Kirino Y, Ombrello MJ, Abaci N, Satorius C, et al. Genome-wide association study identifies variants in the MHC class I, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions associated with Behcet's disease. *Nat Genet.* 2010; 42:698-702.
306. Mizuki N, Meguro A, Ota M, Ohno S, Shiota T, Kawagoe T, et al. Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behcet's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010; 42:703-706.
307. Lee YJ, Horie Y, Wallace GR, Choi YS, Park JA, Choi JY, et al. Genome-wide association study identifies GIMAP as a novel susceptibility locus for Behcet's disease. *Ann Rheum Dis.* 2013; 72:1510-1516.
308. Pineton de Chambrun M, Wechsler B, Geri G, Cacoub P, Saadoun D. New insights into the pathogenesis of Behcet's disease. *Autoimmun Rev.* 2012; 11:687-698.
309. Jiang Z, Yang P, Hou S, Du L, Xie L, Zhou H, et al. IL-23R gene confers susceptibility to Behcet's disease in a Chinese Han population. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69:1325-1328.
310. Akman A, Sallakci N, Coskun M, Bacanli A, Yavuzer U, Alpsoy E, et al. TNF-alpha gene 1031 T/C polymorphism in Turkish patients with Behcet's disease. *Br J Dermatol.* 2006; 155:350-356.
311. Bonyadi M, Jahanafrooz Z, Esmaeili M, Kolahi S, Khabazi A, Ebrahimi AA, et al. TNF-alpha gene polymorphisms in Iranian Azeri Turkish patients with Behcet's Disease. *Rheumatol Int.* 2009; 30:285-289.

312. Touma Z, Farra C, Hamdan A, Shamseddeen W, Uthman I, Hourani H, et al. TNF polymorphisms in patients with Behcet disease: a meta-analysis. *Arch Med Res.* 2010; 41:142-146.
313. Ates O, Dalyan L, Hatemi G, Hamuryudan V, Topal-Sarikaya A. Analyses of functional IL10 and TNF-alpha genotypes in Behcet's syndrome. *Mol Biol Rep.* 2010; 37:3637-3641.
314. Htoon J, Nadig A, Hughes T, Yavuz S, Direskeneli H, Saruhan-Direskeneli G, et al. IL18 polymorphism is associated with Behcet's disease but not lupus in patients from Turkey. *J Rheumatol.* 2011; 38:962-963.
315. Alayli G, Aydin F, Coban AY, Sullu Y, Canturk F, Bek Y, et al. T helper 1 type cytokines polymorphisms: association with susceptibility to Behcet's disease. *Clin Rheumatol.* 2007; 26:1299-1305.
316. Shahram F, Nikoopour E, Rezaei N, Saeedfar K, Ziaei N, Davatchi F, et al. Association of interleukin-2, interleukin-4 and transforming growth factor-beta gene polymorphisms with Behcet's disease. *Clin Exp Rheumatol.* 2011; 29:S28-31.
317. Saadat M. Association between K469E polymorphism of intracellular adhesion molecules-1 ICAM-1 and Behcet's disease. *Saudi Med J.* 2006; 27:1934.
318. Boiardi L, Salvarani C, Casali B, Olivieri I, Ciancio G, Cantini F, et al. Intercellular adhesion molecule-1 gene polymorphisms in Behcet's Disease. *J Rheumatol.* 2001; 28:1283-1287.
319. Lee YJ, Kang SW, Baek HJ, Choi HJ, Bae YD, Kang EH, et al. Association between matrix metalloproteinase 9 promoter polymorphisms and Behcet's disease. *Hum Immunol.* 2010; 71:717-722.
320. Kim JU, Chang HK, Lee SS, Kim JW, Kim KT, Lee SW, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Behcet's disease and rheumatic diseases with vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62:1083-1087.
321. Salvarani C, Boiardi L, Casali B, Olivieri I, Cantini F, Salvi F, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in Behcet's disease. *J Rheumatol.* 2004; 31:1785-1789.
322. Aksu K, Kitapcioglu G, Keser G, Berdeli A, Karabulut G, Kobak S, et al. FcgammaRIIIa, IIIa and IIIb gene polymorphisms in Behcet's disease: do they have any clinical implications? *Clin Exp Rheumatol.* 2008; 26:S77-83.
323. Horie Y, Meguro A, Ota M, Kitaichi N, Katsuyama Y, Takemoto Y, et al. Association of TLR4 polymorphisms with Behcet's disease in a Korean population. *Rheumatology (Oxford).* 2009; 48:638-642.
324. He X, Yu C, Zhao P, Ding Y, Liang X, Zhao Y, et al. The genetics of Henoch-Schonlein purpura: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatol Int.* 2013; 33:1387-1395.
325. Martin J, Paco L, Ruiz MP, Lopez-Nevot MA, Garcia-Porrúa C, Amoli MM, et al. Inducible nitric oxide synthase polymorphism is associated with susceptibility to Henoch-Schonlein purpura in northwestern Spain. *J Rheumatol.* 2005; 32:1081-1085.
326. Rueda B, Perez-Armengol C, Lopez-Lopez S, Garcia-Porrúa C, Martin J, Gonzalez-Gay MA. Association between functional haplotypes of vascular endothelial growth factor and renal complications in Henoch-Schonlein purpura. *J Rheumatol.* 2006; 33:69-73.
327. Zeng HS, Xiong XY, Chen YY, Luo XP. Gene polymorphism of vascular endothelial growth factor in children with Henoch-Schonlein purpura nephritis. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2009; 11:417-421.
328. Hattersley AT, McCarthy MI. What makes a good genetic association study? *Lancet.* 2005; 366:1315-1323.



