



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Frecuencia del polimorfismo de nucleótido
único 1858C>T del gen PTPN22 en niños con
trombocitopenia inmune primaria**

María Angélica Castillo Plata

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Bogotá. D.C.

2014

Frecuencia del polimorfismo de nucleótido único 1858C>T del gen PTPN22 en niños con trombocitopenia inmune primaria

María Angélica Castillo Plata

Código: 599520

Residente Oncohematología Pediátrica

Proyecto de investigación realizado como requisito para optar al título de Especialista en
Oncohematología Pediátrica

Tutores:

Eduardo Beltrán Dussán

Especialista En Oncohematología Pediátrica

Profesor asociado Facultad de Medicina, Departamento de Pediatría, División de
Oncohematología Pediátrica de la Universidad Nacional de Colombia

Jorge Eduardo Caminos Pinzón

MSc, PhD. Profesor Asociado, Coordinador División de Bioquímica. Facultad de Medicina
Universidad Nacional de Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Bogotá. D.C.

2014

Resumen

La trombocitopenia inmune primaria (PTI) es una enfermedad autoinmune, con múltiples mecanismos fisiopatológicos, curso clínico y respuesta al tratamiento variables. Desde 2004 se ha dado importancia al polimorfismo C1858T del gen PTPN22 como marcador de autoinmunidad. Existen hasta el momento 2 estudios que lo relacionan con PTI.

Materiales y Métodos: Se realizó un estudio de casos y controles en el que se evaluó la presencia del polimorfismo C1858T PTPN 22 en población pediátrica con PTI y se comparó con la prevalencia encontrada en un grupo control que incluía niños, adolescentes y adultos jóvenes sanos.

Resultados: Se incluyeron 21 pacientes con PTI entre los 2 y los 20 años y 118 controles sanos entre los 11 y los 24 años. La prevalencia del polimorfismo en los pacientes fue del 4.7% y en los controles fue del 4.24%, lo cual evidencia que no hay diferencias en las poblaciones estudiadas. Todos los polimorfismos encontrados fueron de expresión heterocigota. Adicionalmente en 2.5% de los controles se encontró un polimorfismo del mismo gen (C1858G), no descrito previamente en la literatura y con implicación clínica hasta el momento desconocida.

Conclusiones: Pese a que no se encontraron diferencias en la prevalencia del polimorfismo objeto de estudio en pacientes con PTI cuando se compararon con un grupo de sujetos sanos, es importante realizar nuevos trabajos similares que incluyan muestras de mayor tamaño con el fin de determinar si en realidad nuestra población no tiene una prevalencia importante de esta variante genética o si por el contrario la prevalencia es mayor pero el actual número de muestra no permitió encontrar diferencias significativas. En cuanto al polimorfismo C1858G encontrado en el grupo de sujetos sanos se realizará una nueva secuenciación confirmatoria y seguimiento longitudinal para evaluar el comportamiento clínico y asociación con algún tipo de patología.

Abstract

The primary immune thrombocytopenia (ITP) is an autoimmune disease with multiple pathophysiological mechanisms, clinical course and treatment response variables . Since 2004 it has given importance to the single nucleotide polymorphism C1858T of PTPN22 gene as a marker of autoimmunity. There are so far two studies that relate it to ITP.

Materials and Methods:It was performed a case-control study in which the presence of the C1858T polymorphism PTPN 22 in pediatric patients with ITP was evaluated and compared with the prevalence found in a control group that included children, adolescents and young healthy adults.

Results: 21 patients with ITP between 2 and 20 years old were included, and 118 healthy controls between 11 and 24 years old. The prevalence of the polymorphism in patients was 4.7 % and in the controls was 4.24 %, which shows that there are no differences in the populations studied . All polymorphisms found were in heterozygous expression. Additionally, in 2.5 % of controls was found a polymorphism of the same gene (C1858G), not previously described in the literature and with clinical implications hitherto unknown.

Conclusions: Although no differences were found in the prevalence of the polymorphism under study in ITP patients when compared with a group of healthy subjects, it is important to perform similar studies with larger samples in order to determine whether actually our population does not have a significant prevalence of this genetic variant or if instead the prevalence is higher but the current sample number not allowed to find significant differences. As for the C1858G polymorphism found in the group of healthy subjects and a new confirmatory sequencing and longitudinal follow-up will be performed to evaluate the clinical behavior and association with any medical condition.

Contenido

	Pág.
Contenido	
1. Introducción y Justificación	1
2. Objetivos	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. Marco teórico	5
4. Metodología	9
4.1 Diseño del estudio	9
4.2 Población	9
4.2.1 Población universo	9
4.2.2 Población objetivo	9
4.2.3 Control	10
4.3 Cálculo de la muestra	10
4.4 Criterios de inclusión	10
4.5 Criterios de exclusión	11
4.6 Descripción de las intervenciones	11
4.7 Procedimientos	12
4.8 Instrumento de recolección (Ver anexo 3):	13
4.9 Plan de análisis	14
4.9.1 Operacionalización de las variables	14
4.9.2 Mediciones descriptivas	20
5. Conducción del estudio	21
5.1 Sitios de investigación	21
5.2 Archivo de datos y sistematización	21
5.3 Manejo de sustancias o especímenes biológicos	21
5.4 Seguridad	22
5.5 Consideraciones éticas	22
Consentimiento informado	22
6. Cronograma general de actividades	24
7. Presupuesto	25
8. Resultados	26
8.1 Descripción de los pacientes	26
8.2 Descripción de los controles	28

9. Discusión de resultados.....	32
10. Conclusiones y recomendaciones	37
Anexos: A. Consentimiento informado	39
Anexo B:.....	45
Anexo C. Instrumento de recolección	47
Bibliografía	49

1.Introducción y Justificación

La trombocitopenia inmune primaria es una enfermedad de tipo autoinmune, con múltiples mecanismos fisiopatológicos que llevan a la producción de trombocitopenia, con un curso clínico y respuesta al tratamiento muy variables.

El conocimiento de la fisiopatogenia de la enfermedad ha llevado al diseño de estrategias terapéuticas diversas y específicas que aún no logran una resolución de las manifestaciones en todos los pacientes, llevando a que un porcentaje de estos llegue a la cronicidad.

Uno de los más recientes mecanismos involucrados es el polimorfismo de nucleótido único 1858C>T del gen PTPN 22, reconocido como un locus de autoinmunidad en otras múltiples entidades y que llevaría a una disregulación en la respuesta de los linfocitos T. Hasta este momento sólo se han publicado dos estudios que buscan la prevalencia de la mutación en PTI, encontrando datos estadísticamente significativos. En nuestro país no hay datos publicados al respecto en esta enfermedad, aunque hay dos estudios publicados en los que se encontró asociación con artritis reumatoidea, lupus eritematoso sistémico y diabetes mellitus tipo 1.

Este trabajo nos permitirá conocer estadísticas locales y en caso de encontrar asociación, aportar evidencia que permita utilizar este conocimiento para aplicarlo al diseño de nuevas estrategias de tratamiento para esta enfermedad.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar la frecuencia del polimorfismo de nucleótido único 1858C>T del gen PTPN22 en niños con trombocitopenia inmune primaria

2.2 Objetivos específicos

- Hacer una descripción de las características demográficas de la población en estudio
- Realizar determinación de la presencia de mutación 1858 C>T del gen PTPN22 mediante pruebas moleculares (PCR – RFLP) en niños con trombocitopenia inmune primaria y en un grupo control.
- Evaluar si existen diferencias significativas en la prevalencia de la mutación entre los pacientes con trombocitopenia inmune aguda, crónica y persistente y en el grupo control.

3.Marco teórico

La trombocitopenia inmune primaria o más ampliamente conocida como púrpura trombocitopénica inmune (PTI), está definida como un desorden inmunológico adquirido, caracterizado por trombocitopenia aislada (recuento de plaquetas en sangre periférica menor a $100 * 10^9/L$) y ausencia de un disparador evidente o causa subyacente que la explique.¹ Existen adicionalmente causas secundarias de trombocitopenia inmune, dentro de las más frecuentes encontramos enfermedades autoinmunes como el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos y lupus eritematoso sistémico, inmunodeficiencia variable común, infecciones (citomegalovirus, virus de la inmunodeficiencia humana y hepatitis C, entre otros), efecto adverso de medicamentos y vacunas, enfermedades linfoproliferativas y efecto secundario a trasplante de médula ósea.²

Fue descrita por primera vez en el año de 1735 por el médico alemán Paul Gottlieb Werlhof, en dos niñas que se presentaron con epistaxis y púrpura. La descripción de estos casos fue publicada en “Disquisitio medica et philologica de variolis et anthracibus”, recibiendo la denominación de “Morbushaemorrhagicus maculosus”.³ Fue hasta el año de 1883 en que se reportó por primera vez que este síndrome clínico estaba relacionado con trombocitopenia. Después de este hallazgo han surgido múltiples teorías que intentan explicar el evento fisiopatológico que lleva al descenso en el recuento plaquetario.

Los datos epidemiológicos de esta entidad han sido obtenidos principalmente de estudios realizados en Europa. La incidencia reportada es de 4.8 a 5.3 casos por cada 100000 niños menores de 15 años,⁴ con edad media de presentación de 5.7 años con desviación estándar de 4.1 años y una mayor frecuencia en el género masculino.⁴

A diferencia de los adultos en quienes la trombocitopenia inmune primaria tiene un curso insidioso con tendencia a la cronificación, el curso en niños tiende a ser más benigno con

altos porcentajes de recuperación espontánea. Según la duración de la trombocitopenia, la enfermedad ha sido dividida de forma arbitraria en: aguda (< 6 meses de duración) y crónica (> 6 meses de duración), sin embargo, uno de los últimos reportes del Intercontinental Cooperative ITP StudyGroup⁵ ha planteado que se debería considerar la cronicidad con un curso superior a 12 meses, debido a que se encontró que hasta un 25.7% de los niños que aun persistían con trombocitopenia al sexto mes, recuperaban entre los 6 y 12 meses. De esta manera el Consenso Internacional publicado en el año de 2010, teniendo en cuenta esta consideración, la clasifica en diagnóstico reciente (< 3 meses), persistente (3-12 meses) y crónica (> 12 meses).¹

Clásicamente se ha considerado que la trombocitopenia en esta entidad es secundaria a destrucción plaquetaria mediada por anticuerpos, sin embargo, la variabilidad en el curso clínico y en la respuesta al tratamiento sugieren que existen mecanismos fisiopatológicos adicionales.

En el año de 1950, dos residentes de hematología del Barnes Hospital en St. Louis, William J. Harrington y James W. Hollingsworth evidenciaron un neonato hijo de madre con púrpura trombocitopénica crónica, el cual desarrolló púrpura con resolución espontánea al cabo de tres semanas.⁶ Esto los llevó a plantear la existencia de un factor humoral antiplaquetario cuyo paso transplacentario habría generado la destrucción plaquetaria transitoria. Para probar esta hipótesis se realizó un experimento en el cual Harrington recibió 500 cc de sangre de un paciente con púrpura trombocitopénica. Al cabo de 3 horas presentó trombocitopenia severa y sangrados y adicionalmente fiebre, escalofríos, confusión y un episodio convulsivo. El conteo plaquetario retornó a valores normales al quinto día.^{6, 7, 8} El aspirado de médula ósea obtenido por punción esternal no mostró cambios visibles en los megacariocitos. Este experimento fue posteriormente reproducido con todos los miembros de la división de hematología del Barnes Hospital con resultados similares.⁸ Estos hallazgos llevaron a encontrar el componente inmunológico en una entidad que hasta ese momento era catalogada como idiopática.⁸ Estudios posteriores permitieron determinar que este factor antiplaquetario se trataba de inmunoglobulina G (IgG)^{9, 10} dirigida principalmente contra la glicoproteína IIB/IIIa^{11, 12} y Ib/IX^{13, 14} y en algunos casos contra múltiples antígenos plaquetarios. La región Fc de la IgG unida a las plaquetas es reconocida por los receptores Fcy de los macrófagos, permitiendo así la fagocitosis de plaquetas y acortamiento de su vida media

de 10 días a sólo pocas horas. Este proceso ocurre principalmente en el bazo y en el hígado. La trombocitopenia se produce de forma secundaria al sobrepasarse la capacidad regenerativa de la médula ósea,⁸ pero también se han descrito experimentos in vitro que muestran supresión directa de los megacariocitos por estos anticuerpos.^{15, 16} Cabe anotar que a pesar de la importancia de este mecanismo en la fisiopatología de la enfermedad, los anticuerpos antiplaquetarios se detectan el alrededor de 50% de los pacientes y puede ocurrir remisión de la enfermedad a pesar de que los títulos de anticuerpos estén aun presentes.⁶ Es así que se plantean otras posibilidades en la patogenia. Dentro de estas tenemos el papel de la trombopoyetina (TPO) y de los linfocitos T.

La TPO es el regulador primario de la producción plaquetaria normal. Cuando se une a sus receptores en megacariocitos y en precursores de megacariocitos se incrementa el crecimiento celular, la endomitosis y maduración así como también se disminuye la tasa de apoptosis. De esta manera se aumenta el número de megacariocitos y la producción plaquetaria.¹⁷ Fisiológicamente ocurre, que cuando el conteo plaquetario es bajo, los niveles de TPO se elevan con el fin de incrementar la producción.¹⁸ Es de esperarse entonces que en la trombocitopenia inmune primaria se encuentren niveles elevados de TPO, sin embargo, esto no ocurre así, hay estudios que han demostrado que los valores de esta proteína permanecen sin cambio, a diferencia, por ejemplo de la anemia aplásica en la que se ha documentado elevación hasta de 10 veces el valor normal.^{18,19,}²⁰ El encontrar niveles reducidos de TPO en presencia de conteos plaquetarios bajos sugiere falla en la trombopoyesis como un mecanismo adicional en la trombocitopenia inmune primaria.²⁰ Estudios de cinética plaquetaria apoyan esta hipótesis, mostrando que el recambio de plaquetas en la mayoría de pacientes con PTI se encuentra bajo o normal pero no aumentado.^{21, 24}

En cuanto a los linfocitos T, se han encontrado dos principales acciones en esta entidad, la primera es la actividad citotóxica directa contra las plaquetas y los megacariocitos²² y la segunda, la regulación de la producción de autoanticuerpos producidos por las células B²³.

Estudios recientes han demostrado que la tirosín fosfatasa linfoide (LYP), una enzima intracelular de 807 aminoácidos, codificada por el gen PTPN22 localizado en el

cromosoma 1p13.3–13.1y que pertenece a la familia de tirosín fosfatasas, tendría un papel importante en las enfermedades autoinmunes al estar involucrada en la supresión de la activación espontánea de las células T y en el mantenimiento del fenotipo de reposo de los linfocitos.²⁵

La activación de los linfocitos T requiere estimulación del complejo receptor de célula T (TCR/CD3) mediante presentación antigénica, en combinación con coestimulación de CD28 por ligandos que son también expresados en las células presentadoras de antígeno.²⁶ La regulación de este proceso de activación involucra una serie de interacciones entre tirosín kinasas y tirosín fosfatasas las cuales generan cascadas de señalización citoplasmática que permiten la modificación de diversas funciones celulares.²⁶ básicamente las tirosín kinasas se encargan de la amplificación de señales, mientras que las tirosín fosfatasas gobiernan el modo y tiempo de duración.²⁷ Estos procesos deben ser controlados de forma muy estrecha, principalmente en el contexto de la respuesta inmune, en el que las células son activadas bajo circunstancias apropiadas para contrarrestar el efecto de un proceso infeccioso o tumoral evitando respuestas autodirigidas que culminen en una enfermedad autoinmune.²⁸ De los 107 genes que codifican para tirosín fosfatasas los linfocitos T expresan al menos 45, algunas de las cuales producen efectos activadores y otras efectos inhibitorios. Dentro de este último grupo encontramos la LYP. Lo que se conoce acerca de esta última enzima es extrapolado de experimentos en ratones con su enzima homóloga PEP, la cual es una potente inhibidora de la señalización de los TCR y de la actividad de las tirosín kinasas LCK, FYN, ZAP70 y CSK.²⁸ El polimorfismo 1858 C>T en LYP, que modifica el sitio de unión a CSK, ha sido reportado como un locus de susceptibilidad que se asocia con múltiples enfermedades autoinmunes, como diabetes tipo 1,^{29, 30} artritis reumatoidea,^{31, 32,} lupus eritematoso sistémico³⁴ y enfermedad de Graves³⁵ entre otras.

Considerando a la trombocitopenia inmune primaria como una enfermedad de tipo autoinmune, se han publicado recientemente dos trabajos en los que se busca la frecuencia del polimorfismo mencionado en pacientes con esta enfermedad, comparándolos con grupos controles sin trombocitopenia, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.^{25, 36} Este hallazgo es de marcada importancia para el manejo de la PTI ya que encontrar otro de los mecanismos fisiopatológicos involucrados lleva a proponer nuevas terapéuticas para esta enfermedad.

4. Metodología

4.1 Diseño del estudio

Estudio de casos y controles, en el que se evaluó la frecuencia del polimorfismo de nucleótido único 1858C>T del gen PTPN22 en niños con trombocitopenia inmune primaria, tomando como base a los pacientes diagnosticados como PTI aguda, persistente y crónica en la Fundación Hospital de la Misericordia desde el año 2005 y que estén en seguimiento por la consulta externa de Oncohematología pediátrica o que asistan al servicio de urgencias de esta institución y se comparó con la frecuencia de dicha mutación en una población de sujetos sanos (niños, adolescentes y adultos jóvenes)

Se planteó una duración promedio de 8 meses desde la aprobación del estudio hasta el análisis de los resultados.

4.2 Población

4.2.1 Población universo

Menores de 18 años con diagnóstico de trombocitopenia inmune primaria aguda, persistente y crónica.

4.2.2 Población objetivo

Niños del universo, diagnosticados con trombocitopenia inmune primaria aguda en la Fundación Hospital de la Misericordia desde el 01/01/05 hasta el 30/11/2013 y aquellos con diagnóstico de PTI crónica que se encontraban en seguimiento por la consulta externa durante este mismo período de tiempo.

4.2.3 Control

Niños, adolescentes o adultos jóvenes sin antecedentes personales o familiares de enfermedades hematológicas y sin trombocitopenia documentada por hemograma. Se seleccionaron por conveniencia, los estudiantes de primer y segundo semestre de medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

4.3 Cálculo de la muestra

El cálculo de la muestra se realizó basado en estudio descriptivo realizado de forma exclusiva para pacientes de pediatría en el Cairo (The role of PTPN22 gene polymorphism in childhood immunethrombocytopenic purpura Shahira K. Anisa, Eman A. AbdelGhanyb, Naglaa O. Mostafac and Aliaa A. Alib). En el cual se encontró una prevalencia del 26% del polimorfismo 1858C>T para el gen PTPN 22 en los pacientes con PTI frente a una prevalencia del 6% para los pacientes sin PTI. Este Cálculo se realizó con una potencia estadística del 80% y un nivel de confianza del 95% para disminuir los errores tipo 1 y 2 y los resultados fueron:

- 52 Pacientes con PTI aguda
- 52 Pacientes con PTI crónica

Posterior a esto se aplicó la corrección de Yates debido a que se trata de una variable continua y el resultado fue:

- 62 Pacientes con PTI aguda
- 62 Pacientes con PTI crónica.

Por conveniencia se definió tomar igual número de controles sanos.

4.4 Criterios de inclusión

- Historia clínica y examen físico sugestivos de trombocitopenia inmune primaria según lo descrito en el Consenso Internacional¹, ya sea como antecedente o que cursen con la enfermedad en el momento de la toma de la muestra.
- No compromiso de otra línea celular

- Morfología de médula ósea compatible con el diagnóstico de trombocitopenia inmune primaria

4.5 Criterios de exclusión

- Uso de medicamentos relacionados con trombocitopenia y/o alteración de la función plaquetaria
- Infección concurrente
- Diagnóstico de otra enfermedad autoinmune
- Neoplasia concomitante

4.6 Descripción de las intervenciones

Se solicitó autorización a la gerencia científica de la Fundación Hospital de la Misericordia para acceder a la información de las historias clínicas de la institución. Se incluyeron pacientes con diagnóstico de PTI en los períodos planteados, que ingresaron a la institución por el servicio de urgencias o que estaban en seguimiento en la consulta externa y que cumplieron con los criterios de inclusión. Se solicitó el consentimiento informado (Ver anexo 1) a los padres o cuidadores y el asentimiento a los niños, según su capacidad de decisión, basado en la clasificación de Simpson.^{37, 38} (Ver anexo 2).

La muestra se tomó de la siguiente manera:

*Niños con PTI: se realizó toma de muestra, en tubo tapa lila con EDTA, de forma simultánea con la punción venosa para los exámenes de rutina solicitados en el servicio de urgencias o cuando asistieron a seguimiento en la consulta externa de Oncohematología pediátrica

*Sujetos sanos, grupo control: Se hizo una charla explicando los objetivos y metodología del estudio a los estudiantes de primer y segundo semestre de medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Aquellos que aceptaron participar, se citaron a diferentes jornadas de toma de muestras dentro de las instalaciones de la facultad de medicina de la universidad. A aquellos menores de edad se les solicitó consentimiento informado de sus padres o cuidadores.

Todas las muestras fueron recogidas inmediatamente y trasladadas hacia el laboratorio de biología molecular de la Universidad Nacional de Colombia. A los controles se les realizó adicionalmente un hemograma el cual fue procesado en el laboratorio Anamed, sede La Castellana ubicado en la Cra. 48 No. 95-67.

Se obtuvo el DNA genómico de la sangre anticoagulada mediante la técnica de salting-out estándar. Posteriormente se realizó la técnica de PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP). Las condiciones para la realización de la PCR incluyeron 50 ng de DNA genómico, 20 pmol/ml of cada primer y Taq PCR Master Mix (Fermentas Life Sciences, número de catálogo K0171; Glen Burnie, Maryland, USA), en un volumen total de 25µl. Las muestras fueron inicialmente desnaturalizadas a 94°C por 2 minutos, posteriormente sometidas a 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C, 30 segundos a 72°C y finalmente 2 minutos a 72°C. Los productos amplificados se digirieron usando RsaI (Fermentas Life Sciences, número de catálogo ER1121) por reacción, durante toda la noche a 37°C. Los fragmentos digeridos fueron separados en gel de agarosa al 2% y las bandas se visualizaron en tinción de bromuro de etidio bajo luz UV. Dichas muestras se enviaron vía correo a la ciudad de Seoul, Korea, en donde la compañía MacroGen realizó la secuenciación del fragmento de DNA en donde se encontraba el polimorfismo. Los resultados fueron recibidos a través de correo electrónico.

4.7 Procedimientos

El proyecto se desarrolló en las siguientes fases:

- Consentimiento: Se solicitó inicialmente a todas las instituciones el aval para la realización de la investigación, a través del apoyo y soporte del departamento de pediatría de la Universidad Nacional de Colombia.
- Solitud de Base de datos: Se solicitó el servicio de patología de la Fundación Hospital de la Misericordia la base de datos de los pacientes a quienes se les hubiera realizado biopsia de médula ósea por diagnóstico de PTI desde el año de 2005.
- Evaluación de las historias. Se realizó un estudio de los criterios de inclusión de cada uno de los pacientes a través de la revisión de los datos contenidos en las historias clínicas.

- Contacto: se contactaron de forma telefónica a los padres de los pacientes incluidos en la base de datos y que cumplían con los criterios de inclusión. A aquellos que aceptaron participar se les brindaron dos opciones para la toma de la muestra, asistir al servicio de consulta externa de Oncohematología pediátrica del Hospital de la Misericordia, en donde la jefe de enfermería de quimioterapia realizaba la venopunción o se concertó una fecha en la que acudió una auxiliar de enfermería hasta su hogar para tomar la muestra. Durante estos momentos se obtuvo el consentimiento informado y se diligenció el instrumento de recolección de datos.

También se incluyeron pacientes internados por este diagnóstico, previa explicación del estudio a sus padres o acudientes y firma del consentimiento informado. En estos casos la muestra se tomó junto con los hemogramas de rutina ordenados por el servicio tratante para evitar venopunciones adicionales.

- De forma simultánea se realizaron visitas a la Universidad Nacional para recolectar los controles. Se programaron jornadas de recolección para toma de muestras.
- Toma de muestras: Se tomaron mediante punción venosa y se trasladaron inmediatamente por servicio de mensajería especializada hacia el laboratorio de biología molecular de la Universidad Nacional de Colombia. Adicionalmente la muestra obtenida de los controles se envió al laboratorio Anamed para procesamiento de hemograma. Estas muestras fueron manejadas con todos los protocolos de bioseguridad correspondientes.
- Elaboración de base de datos
- Análisis y discusión de los resultados

4.8 Instrumento de recolección (Ver anexo 3):

Este instrumento contiene los siguientes aspectos:

1. Características Demográficas
2. Características Clínicas

4.9 Plan de análisis

4.9.1 Operacionalización de las variables

<i>N</i>	<i>Objetivo Específico</i>	<i>Nombre de la Variable</i>	<i>Descripción de la Variable</i>	<i>Nivel de Medición</i>
1	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Historia clínica	Número de identificación del paciente, asignado por la institución tratante	Cuantitativa discreta
2	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Fecha de nacimiento	Fecha en que nació el paciente (dd/mm/aaa), tomada del registro civil o de su documento de identidad	Cuantitativa
3	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Género	Genero fenotípico de nacimiento	Cualitativa, dicotómica, nominal
4	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Residencia	Municipio en donde vive el paciente	Cualitativa, nominal
5	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Procedencia	Municipio de remisión	Cualitativa, nominal

6	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Teléfono	Número de teléfono fijo o celular en donde ubique al paciente o sus acudientes	Cuantitativa, discreta
7	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Dirección	Dirección del sitio de resi-dencia	Cuantitativa, discreta
8	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Estrato socioeconómico	Clasificación de los inmuebles realizada por el DANE 0=Estrato 0 (Inferior), 1= Estrato 1 (Muy Bajo) 2=Estrato 2 (Bajo) 3=Estrato 3 (Medio-Bajo) 4=Estrato 4 (Medio) 5=Estrato 5 (Medio-alto) 6=Estrato 6 (Alto)	Cualitativa, ordinal
9	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Régimen seguridad social	Régimen de seguridad social al que pertenece el paciente 0= Contributivo 1= Subsidiado 2=Especial 3=Excepción 4=No afiliado	Cualitativa, nominal
10	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Nombre de la aseguradora	Nombre de la EPS-C, EPS-S, régimen especial o excepción al que pertenece.	Cualitativa, nominal

11	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Escolaridad	Nombre del último ciclo escolar aprobado 0= Ninguno 1= Primaria 2=Secundaria 3=Universitario	Cualitativa, ordinal
12	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Manifestaciones clínicas	Síntomas y signos que llevaron a consultar. Se evaluarán signos específicos de PTI y algunos que permitan descartar otras enfermedades. Petequias, equimosis, epistaxis, gingivorragia, sangrado SNC, Sangrado gastrointestinal, artritis/artralgias, fiebre, caída de cabello, úlceras orales, rash con exposición al sol, otros	Cualitativa, nominal
13	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Fecha de diagnóstico	Día en que se realizó el diagnóstico de trombocitopenia inmune primaria (dd/mm/aaaa)	Cuantitativa, discreta
14	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Clasificación PTI	Clasificación según la duración de la trombocitopenia en Diagnóstico reciente: menor de 3 meses Persistente: >3-<12 meses Crónica > 12 meses	Cualitativa, nominal

15	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Hemograma al diagnóstico	Resultado del primer cuadro hemático realizado al paciente en la Fundación Hospital de la Misericordia Se registrarán los valores de leucocitos, diferencial en porcentaje, Hb (g/dl), Hto (%) y recuento plaquetario	Cuantitativas (continuas y discretas)
16	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Mielograma	Lectura de mielograma realizada por laboratorio de hematología especial	Cualitativa, nominal
17	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Uso de medicamentos previos	Medicamentos utilizados en los 3 meses previos al diagnóstico, de forma permanente u ocasional	Cualitativa, nominal
18	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Antecedentes patológicos	Enfermedades de los pacientes que hayan requerido intervención o valoración médica	Cualitativa, nominal
19	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Antecedentes familiares de enfermedades hemorrágicas congénitas	Datos conocidos de enfermedades hemorrágicas, tanto de la hemostasia primaria o secundaria, congénitas, en familiares de primer y segundo grado	Cualitativa, nominal

20	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Hemoclasificación	Tipificación de grupo ABO y sistema Rh	Cualitativa, nominal
21	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Coombs directo	Resultado de la prueba de coombs directo	Cualitativa, dicotómica, nominal
22	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Necesidad de tratamiento farmacológico	Describir si el paciente requirió o no de alguna intervención farmacológica	Cualitativa, dicotómica, nominal
23	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Qué tipo de tratamiento farmacológico recibió	Medicamento recibido, dosis, frecuencia y duración	Cualitativa, nominal
24	Evaluar si existen diferencias significativas en la prevalencia de la mutación entre los pacientes con trombocitopenia inmune aguda y crónica	Presencia del Polimorfismo 1858C>T del gen PTPN22	Definir si el paciente presentó o no el polimorfismo 1858C>T en el estudio de Biología Molecular	Cualitativa, nominal

25	Evaluar si existen diferencias significativas en la prevalencia de la mutación entre los pacientes con trombocitopenia inmune aguda y crónica	Cigocidad	Determinar la cigocidad del alelo. Homocigoto o heterocigoto	Cualitativa, nominal
26	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Días de estancia hospitalaria	Total de días que duró la primera hospitalización del paciente, en la que se hizo el dx de PTI	Cuantitativa, discreta
27	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Total de hospitalizaciones por PTI	Total de ingresos hospitalarios por PTI	Cuantitativa, discreta
28	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Hemograma al egreso	Último hemograma realizado durante la primera hospitalización y con el que se consideró dar de alta al paciente. Se registrarán los valores de leucocitos, diferencial en porcentaje, Hb (g/dl), Hto (%) y recuento plaquetario	Cuantitativas (continuas y discretas)
29	Realizar una descripción de las características demográficas y clínicas de la población en estudio	Último hemograma realizado	Hemograma más reciente dentro del seguimiento del paciente. Se registrarán los valores de leucocitos, diferencial en porcentaje, Hb (g/dl), Hto (%) y recuento plaquetario	Cuantitativas (continuas y discretas)

4.9.2 Mediciones descriptivas

Se realizó un análisis descriptivo de los pacientes con PTI aguda, persistente y crónica y de los controles que fueron o no positivos para el polimorfismo. Para las variables cualitativas dicotómicas o politómicas, se prefirió la presentación de los datos en forma de tablas, en las que se especificó la frecuencia absoluta y relativa; con los datos considerados como más relevantes, se realizaron gráficas en barras para su mejor visualización.

Las variables cuantitativas, de razón e intervalo, se analizaron mediante la medición de la frecuencia absoluta, relativa y frecuencias acumuladas. Se calcularon las medidas de tendencia central y medidas de dispersión, y los valores respectivos de cada variable se expresaron mediante tablas.

5. Conducción del estudio

5.1 Sitios de investigación

- Fundación Hospital de la Misericordia, ubicada en la Avenida Caracas No 1 – 13 Bogotá D.C.
- Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, ubicado en Carrera 45 No 26 – 85, Facultad de Medicina, piso 3, Bogotá DC.
- Laboratorio Anamed, Sede La Castellana, ubicado en la Cra. 48 No. 95-67, Bogotá DC.
- Compañía MacroGenKorea, # 60-24, Gasan-dong Geumchen-gu, Seoul, Korea.

5.2 Archivo de datos y sistematización

Todos los datos fueron recolectados a través del instrumento diseñado para tal fin (Ver anexo 3), y fueron digitados por duplicado en el programa Excel 2007. Se codificaron todos los datos en la hoja maestra según lo establecido en la tabla de operacionalización de las variables, y se eliminaron los datos de nombre e identificación de los pacientes. Los datos fueron procesados mediante los programas estadísticos Epidat 4.0 y STATA 12.0

5.3 Manejo de sustancias o especímenes biológicos

Se siguió el protocolo de manejo de desperdicios y sustancias biológicas y no biológicas según el Programa de Gestión Integral de Residuos Sólidos (PGIRS) de cada institución.

5.4 Seguridad

Se garantizó, a través de la ejecución de los procedimientos por personal calificado y entrenado, contando con personal idóneo para la toma de las muestras y personal de laboratorio entrenado en el procesamiento de las mismas.

5.5 Consideraciones éticas

El presente estudio se basó en la recolección de muestras biológicas y la revisión de fuentes secundarias.

De acuerdo a la normatividad internacional, particularmente la declaración de Helsinki y a las pautas éticas para la investigación biomédica preparadas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas –CIOMS–, se estableció un riesgo mínimo y se declara que se realizó con adherencia a los tres principios éticos básicos: respeto por las personas, beneficencia y justicia.

El riesgo ético de esta propuesta de investigación según la resolución 8430 del 4 de Octubre de 1993 del Ministerio de Salud, artículo 11, literal A, se correspondió con una investigación con riesgo mínimo,

Se estableció también la seguridad que de que no se identificará al sujeto y que se mantuvo la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad según el artículo 15, literal H.

Esta propuesta de investigación fue evaluada, antes de su ejecución, por el comité de ética médica de la Fundación Hospital de la Misericordia.

Consentimiento informado (ver anexo 1)

Este documento fue elaborado por el investigador principal y revisado por el comité de ética en investigación de la Fundación Hospital de la Misericordia.

Debido que los pacientes tenían una clasificación de Simpson de “no comprensión del lenguaje y no capacidad de decisión”, se realizó una discusión amplia con los padres

para su autorización y estos tuvieron la autoridad en la decisión completa para el ejercicio basados en la razón riesgo beneficio, y adicionalmente tuvieron la potestad, junto con el equipo de investigación, de retirar al niño si esta razón es desfavorable.

El consentimiento informado fue firmado por los padres o representantes legales de los sujetos que aceptaron participar en el estudio, previa explicación detallada de todos los procedimientos a realizar.

6. Cronograma general de actividades

	OCT- NOV/1 2 *	MAY- OCT/13	JUN/13	AGO- OCT/13	OCT- NOV/1 3	DIC/13
Elaboración protocolo	*					
Evaluación protocolo por DIB y comité ética UNAL y Hx Misericordia		*				
Solicitud base de datos			*			
Visita Colegio y Facultad Medicina				*		
Recolección pacientes y muestras					*	
Análisis de datos						*
Entrega de resultados						*

7.Presupuesto

ITEM Personal	Unidad	VALOR Tiempo (meses)	Total (pesos)
Auxiliar enfermería toma de muestras	200000/mes	1	200000
Bacterióloga	2000000/mes	2	4000000
Asesor epidemiológico	1300000/mes	1	1300000
Hora: 100000			100000
Transporte muestras			100000
Subtotal 1			5600000

ITEM	Unidad	VALOR Tiempo (meses)	Total (pesos)
Materiales e insumos			
Papelería			400000
Primers			38000
Kit PCR – procesamiento muestras	4378000		4378000
Hemogramas	8000 c/u		1128000
Secuenciación Macrogen			1800000
Refrigerios controles			400000
Insumos toma muestras			300000
Subtotal 2			8444000

SUBTOTAL	VALOR (pesos)
Subtotal 1	5.600.000
Subtotal 2	8.444.000
TOTAL	14.044.000

8. Resultados

En total se incluyeron 21 pacientes con PTI y 118 controles sanos.

8.1 Descripción de los pacientes

El 57.14% de los pacientes reclutados fue de género masculino (Tabla 1). La media de edad fue de 9,8 años y la mediana de 8 años. Teniendo en cuenta el tamaño de muestra se observó un valor de varianza elevado, lo cual probablemente se explica porque el rango de edad, al momento de la toma de la muestra estuvo entre los 2 y los 20 años (Tabla 2).

Tabla 1: Distribución por géneros en los pacientes con PTI

Género	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
Masculino	12	57,14	57,14
Femenino	9	42,86	100,00
TOTAL	21	100,00	

Tabla 2: Descripción variable edad en pacientes con PTI

Descripción Variable Edad	
N	21
Media	9,81
Mediana	8
Desviación típica	5,887
Varianza	34,662
Mínimo	2
Máximo	20

La mayoría de mujeres estaba concentrada en el estrato 3 (58%), los hombres estaban distribuidos en su mayoría en estrato 2 (41%) y 3 (41%) (Figura 1). La mayor proporción de los casos evaluados procedían de Bogotá, sin embargo, como era esperable por tratarse de un centro de referencia, también se encontraron casos provenientes de otros municipios como Yopal, Espinal o Villavicencio (Tabla 3).

Figura 1: Estrato socioeconómico y género en pacientes con PTI

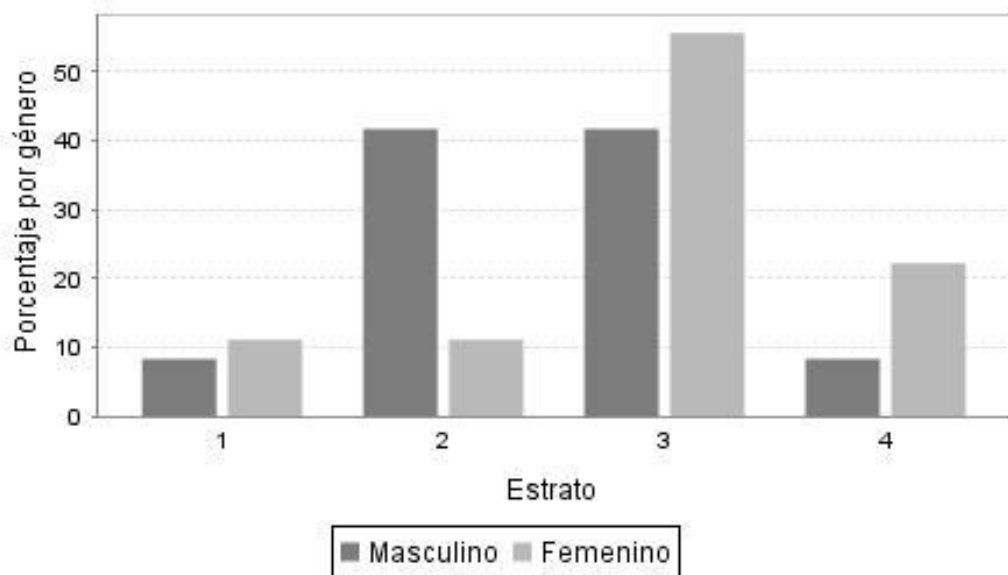


Tabla 3: Procedencia pacientes con PTI

Procedencia	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
Bogotá	16	76,19	76,19
Espinal, Tolima	1	4,76	80,95
Villavicencio, Meta	1	4,76	85,71
Purificación, Tolima	1	4,76	90,48
Soacha	1	4,76	95,24
Yopal, Casanare	1	4,76	100,00
Total	21	100,00	

El 38% de los pacientes tenía grado de escolaridad de jardín, de ahí en adelante, la distribución fue similar, con el 19.05% para pacientes que cursaban primaria, secundaria o estudio superiores (Tabla 4).

Según la clasificación actual de duración de la enfermedad, se encontró que 13 niños (62%) cursaron con PTI aguda, 4 niños (19%) con PTI persistente y 4 niños (19%) con PTI crónica. De los 4 pacientes identificados con PTI crónica, 3 (75%) eran de género masculino.

En cuanto a la presencia del polimorfismo C1858T en el gen PTPN22, ésta se encontró sólo en uno de los pacientes incluidos, el cual cursó con PTI aguda, ya resuelta al momento de la evaluación. Esto correspondió a una prevalencia del 7.69% en el grupo de PTI aguda y a 4.7% en el grupo de pacientes con PTI.

Dicho polimorfismo fue de expresión heterocigota (genotipo CCG/CCA).

Tabla 4: Escolaridad en pacientes con PTI

Género/ Escolaridad	Ningun a	Jardín	Primaria	Secundaria	Técnico o profesiona l	Total
Masculino	1	5	2	2	2	12
	8,33	41,67	16,67	16,67	16,67	100,00
Femenino	0	3	2	2	2	9
	0,00	33,33	22,22	22,22	22,22	100,00
Total	0,00	37,50	50,00	50,00	50,00	42,86
	1	8	4	4	4	21
	4,76	38,10	19,05	19,05	19,05	100,00
	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

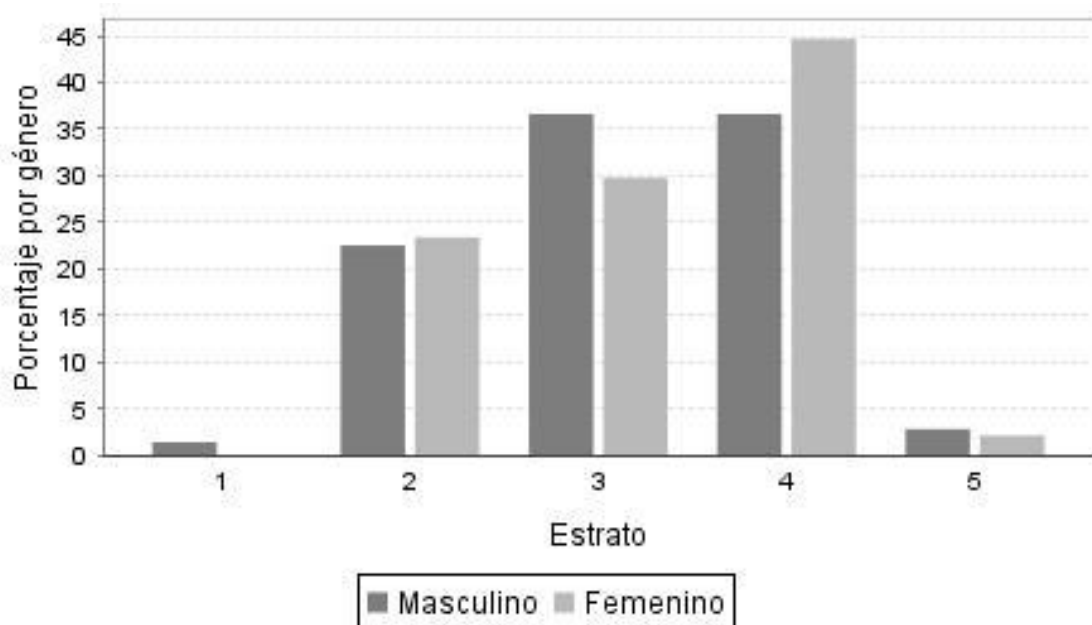
8.2 Descripción de los controles

La media de edad fue de 17 años, el 50% de los pacientes evaluados era menor de 17 años y el 50% restante era mayor de 17 años. Teniendo en cuenta que el tamaño de muestra fue superior al de los pacientes se observó un valor de varianza menor, con menor dispersión desde el punto de vista de la edad. Esta población seleccionada estaba concentrada en las edades de 11 a 24 años (Tabla 5).

Tabla 5: Distribución edad en grupo control

Descripción Población según Edad	
n	118
Media	17,203
Mediana	17
Desviación típica	1,771
Varianza	3,138
Mínimo	11
Máximo	24

El 60,17% de los sujetos sanos era de género masculino, concentrados en igualdad y mayoría en estratos 2 y 3, mientras que las mujeres (39.83%) se encontraron en mayor proporción en el estrato 4 (Figura 2).

Figura 2: Estrato socioeconómico y género en controles

En cuanto a la escolaridad, el 96.6% de los pacientes se encontraba matriculado en una carrera técnica o universitaria (Tabla 6)

Tabla 6: Escolaridad en el grupo control

Escolaridad	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
Jardín	1	0,85	0,85
Primaria	2	1,69	2,54
Secundaria	1	0,85	3,39
Técnico o Universitario	114	96,61	100,00
TOTAL	118	100,00	

Respecto al polimorfismo objeto del estudio, se encontró que 5 personas de esta población (4,24%) tenían positividad para la misma, todas con expresión heterocigota, con un genotipo CCG/CCA. Dentro de este subgrupo de pacientes, 4 (80%) eran de género masculino y 1 (20%) de género femenino (Tabla 7), todos tenían hemograma normal y todos tenían edad superior a 15 años.

Adicionalmente se encontró que 3 de los sujetos del grupo control tenían un polimorfismo de expresión también heterocigota, diferente al del estudio, el cual consistía en el reemplazo en uno de los alelos de una citocina por una guanina lo que generaba que en la secuencia de aminoácidos ocurriera cambio del aminoácido arginina por prolina. El 100% de los pacientes con este polimorfismo pertenecían al género femenino, sin hallazgos en su historia clínica de antecedentes patológicos ni familiares de importancia y con hemograma completamente normal.

Tabla 7: Polimorfismos en grupo control. CCG=secuencia normal, CCG/CCA=polimorfismo heterocigoto PTPN22 (cambio citocina por timina), CCG/CCC=polimorfismo heterocigoto PTPN22 (cambio citocina por guanina)

Género/Polimorfismo	CCG	CCG/CCA	CCG/CCC	Total
Masculino	67	4	0	71
	94,37	5,63	0,00	100,00
Femenino	43	1	3	47
	91,49	2,13	6,38	100,00
TOTAL	110	5	3	118
	93,22	4,24	2,54	100,00

Teniendo en cuenta lo que evidenciaron los grupos, se calculó el ODDS Ratio tomando como evento la PTI y como exposición de riesgo la presencia del polimorfismo objeto del estudio:

OR= 1.13

95% IC= 0.1253-10.1890

Z= 0.109

$p= 0,9133$

Esto significa que las personas que presentan la mutación tienen 1.13 más posibilidades de desarrollar PTI; sin embargo al observar el valor de p y el IC, estos indican que este resultado no es estadísticamente significativo.

9. Discusión de resultados

Debido a múltiples limitaciones en los aspectos logístico, económico y de tiempo, no fue posible recolectar el número de pacientes calculado inicialmente, razón por la cual se considera éste como un informe preliminar y se deberá continuar con el estudio para lograr dar respuesta a los objetivos planteados y obtener resultados con suficiente poder desde el punto de vista epidemiológico.

Con respecto a las características de la población estudiada, hay similitud con las reportadas en estudios poblacionales europeos⁴, con ligero predominio del género masculino y porcentaje de cronicidad del 20%. En cuanto a la edad de diagnóstico se encuentran diferencias ya que la media y mediana reportadas son superiores a las de la población europea. No hay datos epidemiológicos en población colombiana con los cuales se pueda realizar comparación.

Desde el año 2004 han venido en desarrollo múltiples estudios que han intentado demostrar asociación entre el polimorfismo C1858T del gen de la tirosín fosfatasa no-receptor tipo 22 (PTPN22). Existe evidencia fuerte a favor de su relación en enfermedades como artritis reumatoidea, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, vasculitis ANCA (+), artritis idiopática juvenil y miastenia gravis³⁹.

La creciente importancia de este polimorfismo se ha centrado en la posibilidad de convertirse en blanco terapéutico para el manejo de estas enfermedades⁴⁰.

En relación con trombocitopenia inmune primaria hasta el momento han sido publicados 3 estudios al respecto y sólo uno de ellos exclusivamente en población infantil.

El primero de estos, publicado en el año 2010, se desarrolló en Michigan e incluyó 45 pacientes adultos con PTI y como control histórico una población de 926 sujetos sanos de New York. Se encontró el polimorfismo en 12 de los 45 pacientes, 10 de ellos heterocigotos y 2 homocigotos para un porcentaje total de 27%, mientras que la positividad en población sana fue de 16.7% con $p=0.08$ ³⁶.

El segundo fue realizado exclusivamente en población pediátrica de El Cairo. Se compararon 24 pacientes con PTI aguda y 26 con PTI crónica con un grupo de 50 niños control, pareados por género y edad. Se encontró positividad en 26% de los pacientes y en 6% de los controles con una $p=0.006$. Adicionalmente describen que no se encontraron diferencias en la prevalencia del polimorfismo en PTI aguda y crónica ($p>0,05$)²⁵.

El tercer estudio fue desarrollado en población china y publicado en el año 2013. Incluyó 191 casos de PTI entre los 0,2 y 77.9 años y 216 controles sanos pareados por grupo étnico⁴¹. En este estudio pese a que se evaluó también un polimorfismo del PTPN22, no fue el C1858T, sino el G1123C que se había encontrado positivo en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y artritis reumatoidea. El motivo de esta selección es porque previamente se había demostrado que el alelo 1858T está virtualmente ausente en asiáticos y africanos⁴². Los resultados de este trabajo muestran una prevalencia del polimorfismo en 36.4% de los pacientes y en 29.4% de los controles con una $p=0.034$. Cuando se realiza el análisis estratificado por grupos étnicos se encuentra que en los adultos con PTI se mantienen estos hallazgos mientras que no es así en la población infantil estudiada.

Los resultados reportados en el presente estudio mostraron la presencia del polimorfismo C1858T del gen PTPN22 en sólo uno de los 21 pacientes lo que equivale a una prevalencia del 4.7% y que es inferior a lo que se ha reportado previamente en la literatura en los dos trabajos relacionados que han sido publicados.

En cuanto a los hallazgos en el grupo control, se encontró una prevalencia del 4.2%, similar a la que se informa en el estudio de Anisa SK²⁵, realizado exclusivamente en población pediátrica egipcia, pero inferior al que se reporta en el estudio estadounidense en el cual es del 16% y que se realizó solamente con adultos.

Los resultados de este estudio mostraron que no existe asociación entre la presencia del polimorfismo C1858T del gen PTPN22 con el desarrollo de trombocitopenia inmune primaria, ya que la proporción encontrada fue similar tanto en el grupo de pacientes como en el grupo control. Estos hallazgos llevan a reflexionar sobre dos aspectos importantes, el primero es considerar que la población estudiada tiene una prevalencia mayor de la mutación, similar a la reportada en otros estudios descritos, pero que el tamaño de muestra pequeño y con poco poder no permite encontrar estas diferencias sutiles.

El segundo es que, teniendo en cuenta que ya ha sido reportado que existen discrepancias y heterogeneidad en la expresión de algunos alelos relacionados con autoinmunidad en diferentes etnias, debido a la segregación y al gradiente geográfico⁴²,⁴³, se podría concluir que la población que se estudió podría tener también ausencia o muy baja prevalencia de algunos de estos alelos.

Debido a que esta proteína mutada se ha considerado como un posible blanco farmacológico, es muy importante determinar en realidad cual es el comportamiento del polimorfismo en estudio en cada etnia y/o población, ya que por las diferencias anteriormente mencionadas no se deberían extrapolar los resultados en estudios que se hayan realizado con etnias diferentes; para esto se deberá plantear la realización de otros trabajos del mismo diseño con muestras de mayor tamaño lo cual permitirá encontrar asociación entre estos cambios genéticos y la presencia de autoinmunidad, pero además se considera importante plantear a futuro el seguimiento longitudinal de los controles sanos con polimorfismos, para evaluar si desarrollan o no enfermedades autoinmunes y establecer de esta forma relación causal con evidencia de mayor peso epidemiológico.

Como hallazgo incidental se encontró también la presencia del polimorfismo C1858G del gen PTPN22 en tres de los 118 sujetos sanos incluidos. Se realizó una búsqueda en diferentes bases de datos para verificar la significancia clínica de este hallazgo sin que se encontrara literatura publicada al respecto. Teniendo en cuenta que el cambio que generaría este polimorfismo en la secuencia de aminoácidos es el de una arginina por una prolina, aminoácidos con características bioquímicas diferentes, se puede pensar que esta alteración derivaría probablemente en alteración en el marco de lectura que podría reflejarse en disminución o ausencia de la actividad enzimática. Es de resaltar que los

individuos en los que se encontró este polimorfismo son hasta el momento sanos, sin historia personal o familiar de importancia. Adicionalmente, la presencia de alteraciones genéticas no es suficiente en muchos casos para desarrollar enfermedad, ya que se requiere también de la interacción de un sinnúmero de factores dentro de los que destacan los ambientales y epigenéticos.

Se plantea realizar una segunda secuenciación del material genético de estos sujetos con el fin de verificar que se trate realmente de una variante y acto seguido hacer seguimiento clínico en el tiempo.

10. Conclusiones y recomendaciones

- Las características demográficas de los pacientes con PTI incluidos en este estudio son similares a las reportadas en estudios poblacionales europeos, excepto por la edad, la cual es ligeramente mayor respecto a la previamente reportada.
- No se encontró asociación entre la presencia del polimorfismo C1858T del gen PTPN22 y la trombocitopenia inmune primaria
- Existe la posibilidad que nuestra población, tenga ausencia o bajas prevalencias de algunos polimorfismos relacionado principalmente con heterogeneidad y segregación étnica.
- Es importante caracterizar los polimorfismos presentes en cada población con el fin de definir si existe o no susceptibilidad a recibir manejo farmacológico cuyo blanco son las enzimas o proteínas producto de estas variantes genéticas.
- Se debe completar lo planteado en la metodología para lograr responder a los objetivos propuestos.
- Se considera que se debería realizar seguimiento longitudinal a largo plazo de los controles en los que se encontró el polimorfismo de significado indeterminado.
- Se deben plantear nuevos estudios con número mayor de muestra con el fin de verificar si existe o no asociación entre el polimorfismo C1858T del gen PTPN22 y la trombocitopenia inmune primaria en población infantil colombiana.

Anexos: A. Consentimiento informado

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA
DIVISIÓN ONCOHEMATOLOGÍA PEDIÁTRICA**

Frecuencia del polimorfismo de nucleótido único 1858C>T del gen PTPN22 en niños con trombocitopenia inmune primaria

1. Introducción y propósito del estudio

La Universidad Nacional de Colombia, dentro del programa de Especialidad de Oncohematología Pediátrica, está haciendo un estudio en el que se busca la frecuencia del polimorfismo 1858C>T del gen PTPN22 en niños que tengan el diagnóstico de púrpura trombocitopénica inmunológica primaria (PTI).

Este hallazgo ha sido encontrado en algunos estudios realizados en otros países, pero hasta ahora no hay ningún estudio realizado en Colombia. Si se logra comprobar que esta mutación está involucrada en el desarrollo de la enfermedad, se podrán diseñar nuevos tratamientos que sean efectivos para el manejo de los pacientes afectados.

2. Porqué ha sido seleccionado

Existen dos razones para ingresar al estudio:

- Una de ellas es que a su hijo(a) se le realizó el diagnóstico de púrpura trombocitopénica inmunológica en la Fundación Hospital de la Misericordia.
- La otra razón es que su hijo(a) es un niño sano (sin PTI) y vamos a tomar una muestra para hacer comparación con los niños que tienen la enfermedad.

3. Procedimientos del estudio

Si decide participar debe hacer lo siguiente:

- Proporcionar información acerca de su dirección y teléfono, esto con el fin de contactarlos para el seguimiento
- Permitir la realización de una punción venosa. En esta muestra de sangre se realizará el análisis de la mutación previamente mencionada. En lo posible se tratará de que esta muestra se tome junto con los exámenes de rutina que se realizan a su hijo (a), con el fin de evitarle riesgos adicionales por el procedimiento.
- Asistir a todos los controles planteados y seguir tratamiento según lo indicado por su médico tratante.
- Informar acerca de sus inquietudes y en caso tal, expresar el deseo de abandonar el estudio

4. Confidencialidad

La información que suministre, incluyendo los datos sobre su localización y de su enfermedad es confidencial y solo será conocida por su médico tratante y los investigadores.

Los resultados del estudio se presentarán en forma general y en ningún caso ni usted ni su hijo(a) podrán ser identificados.

5. Riesgos y beneficios

Los riesgos derivados de su participación en este estudio son mínimos y están asociados a la punción venosa que se realizará para obtener la muestra. Estos son básicamente sangrado, dolor o infección local.

El realizar este estudio traerá beneficio a todos los pacientes que tengan diagnóstico de púrpura trombocitopénica inmune, ya que la información aportada podrá ser tomada como base para el diseño de nuevos tratamientos que puedan curar a estos pacientes.

Adicionalmente, desde su casa tiene acceso telefónico para consultas respecto a posibles complicaciones o inquietudes.

6. Costos y compensación

Usted no recibirá pago por su participación en el estudio, ni este tampoco implica costos adicionales para su atención médica.

7. Derecho a rehusar o abandonar el estudio

Usted debe estar saber que su participación en este estudio es completamente voluntaria. Aun después de dar su aceptación para participar, tendrá derecho a retirarse del estudio o a negarse a contestar alguna de las preguntas en el momento en que usted así lo desee. El hecho de retirarse no implicará cambios en la atención ni en el tratamiento recibidos.

8. Preguntas

Por favor siéntase en libertad de hacer cualquier pregunta si hay algo que no haya entendido. También si más adelante le surge alguna duda o inquietud, usted puede contactar a: Dra. María Angélica Castillo Plata en el Departamento de Pediatría de la Fundación Hospital de la Misericordia (4° piso) o en el teléfono 3005296852

9. Resultados:

Se aclara que al finalizar el estudio le haremos entrega y le explicaremos los resultados del análisis genético.

Con los resultados obtenidos de todos los niños que participen en este estudio se redactará un artículo el cual será publicado en una revista científica.

10. Declaración del participante

Nosotros le entregaremos una copia de este formulario. Al firmar esta forma usted está aceptando que entiende la información que se le ha dado, que está de acuerdo en participar como sujeto de investigación en este estudio, y que está de acuerdo en:

o Proporcionar su dirección y teléfono

o Permitir toma de muestra mediante punción venosa para verificar la presencia de la mutación en el gen PTPN22

o Asistir a las consultas de control y seguir el manejo propuesto por su médico tratante

¿Acepta participar en este estudio voluntariamente? Si_____ NO_____

Si usted ha aceptado participar por favor escriba su nombre completo y firme en el espacio correspondiente:

Nombre del participante _____

Firma del participante: _____ Fecha ____/____/____
Dd mm aa

Nombre del testigo 1 _____

Firma del testigo 1 _____ Fecha ____/____/____
dd mm aa

Nombre del testigo 2 _____

Firma del testigo 2 _____ Fecha ____/____/____
dd mm aa

11. Asentimiento del paciente (Diligenciar en los casos en que se requiera, según las reglas para la toma de decisiones con respecto a la participación de niños en la investigación)

Certifico que he sido informado/a acerca de los objetivos y procedimientos de esta investigación. Con mi firma, declaro que estoy de acuerdo en participar en el estudio para la mutación 1858C>T del gen PTPN22 en una muestra de sangre tomada de mis venas, aun cuando, en algunas ocasiones, la toma del examen no coincida con los otros exámenes que me realizarán en el tratamiento de la enfermedad y que para ello deba ser puncionado nuevamente.

Firma del paciente _____ Fecha ____/____/____
dd mm aa

12. Declaración del investigador

Certifico que yo o algún miembro de mi grupo de investigación le ha explicado a la persona cuyo nombre aparece registrado en este formulario, sobre esta investigación y que esta persona entiende la naturaleza y el propósito del estudio así como los posibles riesgos y beneficios asociados con la participación en el mismo. Todas las preguntas que esta persona ha hecho, han sido contestadas.

Nombre de quien diligencia el consentimiento (investigador/encuestador):

Firma: _____ Fecha ____/____/____
dd mm aa

Firma: _____ Fecha ____/____/____
dd mm aa

Anexo B:

Reglas para la toma de decisiones con respecto a la participación de niños en la investigación ^{37,38}

<i>Categoría del niño</i>	<i>Papel del comité de ética</i>	<i>Papel de los padres/cuidadores</i>	<i>Papel del investigador</i>	<i>Papel del niño</i>
*No comprensión del lenguaje *no capacidad de decisión	(1)Proteger intereses de los niños aprobando investigación que cumpla condiciones pre-especificadas (2)Información completa a los padres y su autorización	(1)Ejercen autoridad de decisión completa basándose en riesgo/beneficio (2)Estar presentes/disponibles durante la investigación (3)Retirar al niño del estudio si el riesgo supera al beneficio	(1)Asegurar información completa a los padres (2)Retirar al niño si el riesgo/beneficio no es favorable (3)Anular decisión de los padres (ej: retirar al niño del estudio cuando aumenten riesgos)	(1)No autoridad de decisión (2)Puede protestar pero esto no lo excluirá del estudio
*Alguna comprensión del lenguaje *Capacidad limitada para tomar decisiones	(1) y (2) (3)La información relevante se debe explicar al niño (4)Requiere discusión y autorización documentada de padres y niño	(1), (2) y (3) (4)Compartir información con el niño acerca de la participación y responder preguntas (5)Prestar atención a la protesta del niño	(1), (2) y (3) (4)Asegurar información relevante al niño acerca de su participación y resolver preguntas (5)Prestar atención a la protesta del niño	(1) y (2) (3)Papel limitado en la toma de decisión (4)Puede realizar preguntas
*Buena comprensión del lenguaje *Capacidad de decisión en desarrollo	(1), (2), (3) y (4) (5)Defender que la protesta del niño pueda ser autorizada en algunos	(2), (3) y (4) (6)Se requiere el acuerdo de los padres en todos los casos. En algunos casos la protesta del niño puede ser	(1), (2), (3) y (4) (6)Asegurar que el niño tenga la oportunidad de expresarse (7)Asegurar	(5)Tiene mayor papel en la toma de decisión (6)Se requiere el acuerdo para participar,

	casos	autorizada (7)Dar al niño la oportunidad de expresar sus deseos y tenerlos en cuenta en la evaluación del riesgo/beneficio (8)Autoridad limitada	que los padres tengan en cuenta los deseos del niño	pero no es suficiente (7)La protesta puede excluirlo del estudio, excepto cuando los padres consideren que los beneficios superan los riesgos
*Buena comprensión del lenguaje *Capacidad de decisión sustancial *Maduro pero no independiente	(6)Reconocer la capacidad del niño para la toma de decisiones (7)Aprobar investigaciones que cumplan condiciones pre-especificadas (8)Asegurar información completa al niño y cuando sea necesario, a sus padres (9)Documentar consentimiento del niño y cuando sea necesario, acuerdo de los padres	(8) (9)El acuerdo parental es necesario en algunas participaciones (requerimiento legal, participación que acarrea consecuencias a los padres, riesgo mayor al mínimo) pero no es suficiente	(8)Asegurar información completa al niño sobre su participación (9)Determinar si el consentimiento del niño es suficiente o si se requiere el acuerdo de los padres (10)Asegurar información relevante a los padres cuando estén involucrados legítimamente en la decisión (11)Discutir con el niños el retiro del estudio cuando los riesgos superen beneficios	(8)suficiente autoridad para decidir (9)Se requiere el consentimiento para participar y algunas veces es suficiente (el acuerdo de los padres se requerirá en algunos casos) (10)Se respetará su decisión de no participar
* Buena comprensión del lenguaje *Capacidad de decisión sustancial *Maduro e independiente	(10)Similar a investigaciones realizadas en adultos	(10)No autoridad para la toma de decisiones	(12)Aplicar obligaciones del investigador cuando involucra adultos competentes	(11)Capacidad de decisión completa (12)No está obligado a compartir información con sus padres

Anexo C. Instrumento de recolección

FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO ÚNICO 1858C>T DEL GEN PTPN22 EN NIÑOS CON TROMBOCITOPENIA INMUNE PRIMARIA

Instrumento de recolección de datos

DATOS DEMOGRÁFICOS

1 HISTORIA CLINICA _____

2 FECHA NACIMIENTO __/__/____ (dd/mm/aaaa)

3 GÉNERO: masculino () femenino ()

4 RESIDENCIA _____

5 PROCEDENCIA _____

6 TELEFONO _____

7 DIRECCION _____

8 ESTRATO SOCIOECONÓMICO: 0 ____ 1 ____ 2 ____ 3 ____ 4 ____ 5 ____ 6 ____

9 RÉGIMEN DE SEGURIDAD SOCIAL:

Contributivo ____ subsidiado ____ especial ____ excepción ____ no afiliado ____

10 NOMBRE DE LA ASEGURADORA: _____

11 ESCOLARIDAD: ninguno ____ preescolar ____ primaria ____ secundaria ____

DATOS CLÍNICOS**12 MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

Petequias___ equimosis___ epistaxis___ gingivorragia___ sangrado SNC___
Sangrado gastrointestinal ___ artritis/artralgias___ fiebre___ caída de cabello ___
úlceras orales ___ rash con exposición al sol ___ otros___
especifique_____

13 FECHA DIAGNÓSTICO __/__/____ (dd/mm/aaaa)

14 CLASIFICACIÓN PTI: Dx reciente ___ persistente ___ crónica ___ sano___

15 HEMOGRAMA DEL DX: LEU _____ S% ___ L%___ M%___

HB___ HTO%___ PLAQUETAS___

16 MIELOGRAMA _____

17 USO MEDICAMENTOS PREVIOS: Si ___ No___ cuáles?_____

18 ANTECEDENTES PATOLÓGICOS

19 ANTECEDENTES FAMILIARES DE ENFERMEDADES HEMORRÁGICAS? Si ___

No___ Cuáles?_____

20 HEMOCLASIFICACIÓN _____

21 COOMBS DIRECTO _____

22 REQUIRIÓ TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO? Si___ No___

23 SI REQUIRIÓ TRATAMIENTO ESPECIFIQUE CUAL

Esteroides ___ Dosis_____

IVIG _____ Dosis_____

Ig anti D ___ Dosis_____

Otros _____ Especifique nombre y dosis_____

24 PRESENCIA DEL SNP 1858 C>T DEL GEN PTPN 22? Si ___ No___

25 CIGOCIDAD: Homocigoto ___ heterocigoto ___

26 DÍAS ESTANCIA HOSPITALARIA _____

27 TOTAL HOSPITALIZACIONES POR PTI _____

28 HEMOGRAMA AL EGRESO: LEU _____ S% ___ L%___ M%___

HB___ HTO%___ PLAQUETAS___

29 ULTIMO HEMOGRAMA: LEU _____ S% ___ L%___ M%___

HB___ HTO%___ PLAQUETAS___

Bibliografía

1. Provan D, Stasi R, Newland AC, Blanchette VS, Bolton-Maggs P, Bussel JB, Chong BG, Cines DB, Gernsheimer TB, Godeau B, Grainger J, Greer I, Hunt BJ, Imbach PA, Lyons G, McMillan R, Rodeghiero F, Sanz MA, Tarantino M, Watson S, Young J and Kuter DJ. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood* 2010; 115: 168-186.
2. Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg L and Crowther MA. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood* 2011; 117: 4190-4207.
3. Liebman HA. Immune thrombocytopenia (ITP): an historical perspective. *Hematology/ The education program of The American Society of Hematology* 2008: 205.
4. Fogarty PF and Segal JB. The epidemiology of immune thrombocytopenic purpura. *Current Opinion in Hematology* 2007; 14:515–519.
5. Imbach P, Kühne T, Müller D, MD, Berchtold W, Zimmerman S, Elalfy M and Buchanan GR. Childhood ITP: 12 months follow-up data from the Prospective Registry I of the Intercontinental Childhood ITP Study Group (ICIS). *Pediatr Blood Cancer* 2006;46:351–356.
6. Stasi R. Pathophysiology and therapeutic options in primary immune thrombocytopenia. *BloodTransfus* 2011; 9: 262-273.

7. Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, Moore CV. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. J Lab Clin Med. 1951; 38: 1-10.
8. Schwartz RS. Immune thrombocytopenic purpura — from agony to agonist. N Engl J Med 2007. 357; 22: 2299-2301.
9. Karpatkin S and Siskind GW. In vitro detection of platelet antibody in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and systemic lupus erythematosus. Blood 1969; 33: 795-812.
10. Dixon R, Rosse W and Ebbert L. Quantitative determination of antibody in idiopathic thrombocytopenic purpura — Correlation of serum and platelet-bound antibody with clinical response. N Engl J Med 1975; 292: 230-236.
11. Devine DV and Rosse WF. Identification of platelet proteins that bind alloantibodies and autoantibodies. Blood 1984; 64: 1240-1245.
12. Ribera A, Martin-Vega C, Massuet L, Argelaqués E, Tornos C and Triginer J. Autoimmune thrombocytopenia: serological behavior of platelet antibodies. Vox Sang 1983; 45: 438-439.
13. Ruyi H, Reid DM, Jones CE, and Shulman RN. Spectrum of Ig classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 1994; 83: 1024-1032.
14. Kiefel V, Santoso S, Kaufmann E, Mueller-Eckhardt C. Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib/IX: a frequent finding in autoimmune thrombocytopenic purpura. Br J Haematol 1991; 79: 256-62.
15. Chang M, Nakagawa PA, Williams SA, Schwartz MR, Imfeld KL, Buzby JS and Nugent DJ. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocyte topoisomerase in vitro. Blood 2003; 102: 887-895.

16. McMillan R, Wang L, Tomer A, Nichol J and Pistillo J. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood* 2004; 103: 1364-1369.
17. Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med* 2006;354:2034-2045.
18. Kuter DJ, Phil D and Gernsheimer TB. Thrombopoietin and platelet production in chronic immune thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009; 23: 1193–1211.
19. Emmons RV, Reid DM, Cohen RL, Meng G, Young NS, Dunbar CE and Shulman NR. Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased destruction platelet. *Blood*. 1996; 87: 4068-4071.
20. Nichol JL. Endogenous TPO (eTPO) levels in health and disease: possible clues for therapeutic intervention. *Stem Cells* 1998;16(suppl2):165-175.
21. Nugent D, McMillan R, Nichol JL and Slichter SJ. Pathogenesis of chronic immune thrombocytopenia: increased platelet destruction and/or decreased platelet production. *Br J Haematol.* 2009;146:585-596.
22. Olsson B, Andersson P, Jernås M, Jacobsson S, Carlsson B, Carlsson L and Wadenvik H. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nature Medicine* 2003; 9: 1123-1124.
23. Semple JW and Provan D. The immunopathogenesis of immune thrombocytopenia: T cells still take center-stage. *Curr Opin Hematol* 2012, 19:357–362.
24. Gernsheimer TB. The pathophysiology of ITP revisited: ineffective thrombopoiesis and the emerging role of thrombopoietin receptor agonists in the management of

chronic immune thrombocytopenic purpura. *Hematology/ The education program of The American Society of Hematology* 2008: 219-226.

25. Anisa SK, Ghanyb EA, Mostafac NO and Alib AA. The role of PTPN22 gene polymorphism in childhood immune thrombocytopenic purpura. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2011; 22:521–525.
26. Hill RJ, Zozulya S, Lin Lu YL, Ward K, Gishizky M and Jallal B. The lymphoid protein tyrosine phosphatase Lyp interacts with the adaptor molecule Grb2 and functions as a negative regulator of T-cell activation. *Experimental Hematology* 2002: 237–244.
27. Burn GL, Svensson L, Sanchez-Blanco C, Saini M and Cope AP. Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? *FEBS Letters* 2011; 585:3689–3698.
28. Mustelin T, Vang T and Bottini N. Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nature reviews | immunology* 2005; 5: 43-57.
29. Onengut-Gumuscu S, Ewens KG, Spielman RS and Concannon P. A functional polymorphism (1858C/T) in the PTPN22 gene is linked and associated with type I diabetes in multiplex families. *Genes and Immunity* 2004; 5: 678–680.
30. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, MacMurray J, Meloni G, Lucarelli P, Pellecchia M, Eisenbarth GS, Comings D and Mustelin T. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nature Genetics* 2004; 36: 337-338.
31. Nong L, Ren K, Xu N and Zhou D. 1858 C/T Polymorphism of the protein tyrosine phosphatase nonreceptor 22 gene and rheumatoid arthritis risk in europeans: A meta-analysis. *Archives of Medical Research* 2011; 42: 698 – 702.
32. Begovich AB, Carlton VEH, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M,

- Chang SP, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee A, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ and Gregersen PK. 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.
33. Hinks A, Barton A, John S, Bruce I, Hawkins C, Griffiths CEM, Donn R, Thomson W, Silman A, and Worthington J. Association between the *PTPN22* gene and rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis in a UK population. *Arthritis & Rheumatism* 2005; 52: 1694–1699.
34. Ramirez M, Quintana G, Diaz-Gallo LM, Caminos J, Garces M, Cepeda L, Rondon F, Restrepo JF, Egea E, Garavito G, Robledo G, Martin J, Iglesias-Gamarra A. The *PTPN22* C1858T variant as a risk factor for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus but not for systemic sclerosis in the Colombian population. *Clin Exp Rheumatol* 2012; 30: 520-524.
35. Velaga MR, Wilson V, Jennings CE, Owens CJ, Herington S, Donaldson PT, Ball SG, James RA, Quinton R, Perros P, Pearce SHS. The codón 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (*LYP*) gene is a major determinant of Graves' disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89:5862–5865.
36. D' Silva KJ, Zamora MB, Gerlach J and Schwartz KA. Increased representation of the *PTPN22* mutation in patients with immune thrombocytopenia. *J ThrombHaemost* 2010; 8: 2076–8.
37. Simpson C. Children and research participation: who makes what decisions. *HealthLawRev* 2003; 11: 20-9.
38. Kelly B, MacKay-Lyons MJ. Ethics of involving children in health-related research: applying a decision-making framework to a clinical trial. *Physiother Can* 2010; 62: 338–346.

39. Zheng J, Ibrahim S, Petersen F, Yu X. Meta analysis reveals an association of PTPN22 C1858T with autoimmune disease, which depends on the localization of the affected tissue. *Genes and Immunity* 2012; 13: 641-652.
40. Du J, Quiao Y, Sun L, Wang X. Lymphoid-specific tyrosin phosphatase (LYP): A potential drug target for autoimmune disease. *Current Drug Targets* 2013 Nov 4 [Epub ahead of print].
41. Ge J, Li H, Gu D, Xue F, Sui T, Xu J, Yang R. PTPN22-1123G>C polymorphism is associated with susceptibility to primary immune thrombocytopenia in Chinese population. *Platelets* 2013; 24: 448-453.
42. Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R, Yamamoto K. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. *Journal of Human Genetics* 2005; 50: 264-266.
43. Lins T, Vieira R, Grattapaglia D, Pereira r. Allele and haplotype frequency distribution in PTPN22 gene across variable ethnic groups: Implications for genetics association studies for autoimmune diseases. *Autoimmunity* 2010; 43: 308-316.