

**ASOCIACIÓN HLA Y ARTRITIS REUMATOIDEA JUVENIL
En busca de las bases moleculares dependiente del
MHC"**

TESIS DOCTORAL

2003

AUTOR

GLORIA GARAVITO DE EGEA
Aspirante a optar él título:
Doctorado en inmunología
Escuela de Doctorado y de Formación
Continua
Universidad Autónoma de Barcelona

TUTOR

PAZ MARTINEZ PhD
Instituto de Biotecnología y
Biomedicina“Vicent Villar Palsi”
Universidad Autónoma de Barcelona
Barcelona, España

CO-DIRECTORES DE TESIS

DOLORES JARAQUEMADA PhD
Instituto de Biotecnología y
Biomedicina“Vicent Villar Palsi”
Universidad Autónoma de Barcelona
Barcelona, España

EDUARDO EGEA BERMEJO MD. MSc
Laboratorio de Inmunología y Biología
Molecular.
Universidad del Norte, Barranquilla,
Colombia

AGRADECIMIENTOS

A:

Mis hijos Eduardo Enrique, Gloria Eliana y Angeline por sus sacrificios al privarse de mi compañía como madre a lo largo de esta formación

Mi esposo Eduardo Alberto, gran pilar y Norte de mi vida

Mi madre Tulia, familiares y amigos por su apoyo durante mis largas ausencias

Sofia Moreno Compañera de trabajo

La Universidad del Norte por su confianza y apoyo

Mis colegas practicantes de la medicina clinica

Los pacientes y personas que participan en estos estudios.

Paz Martinez quien desde el inicio me dió todo el apoyo y las herramientas necesarias para llevar a cabo mi formación

Dolores Jaraquemada por sus orientaciones en el desarrollo de la tesis.

A todos les dedico esta presentación pues ellos han sido de gran apoyo para poder conseguir mis metas.

INDICE

INTRODUCCIÓN

1.	UNA APROXIMACIÓN AL SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL POLIMORFISMO DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD. EL MODELO DE LA ASOCIACIÓN HLA Y ARJ	1
1.1	Resumen	2
1.1.1	Objetivo	2
1.1.2	Fuente de Datos	2
1.1.3	Resultados	2
1.1.4	Conclusión	4
1.1.5	Palabras Claves	4
1.2	GENERALIDADES	4
1.3	CLASIFICACIÓN CLÍNICA	6
1.3.1	ARJ Oligoarticular	7
1.3.2	ARJ Poliarticular	7
1.3.3	ARJ Sistémica	8
1.4	EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (CHM)	8
1.4.1	Genes MHC Clase I Estructura y función	10
1.4.2	Genes MHC Clase II Estructura y función	12
1.4.3	El papel biológico de los antígenos HLA	16
1.5	ASOCIACION HLA Y ENFERMEDAD	19
1.5.1	El mimetismo molecular	24
1.5.2	Presentación de autoantígenos	24
1.5.3	La molécula HLA como receptor de virus	25
1.5.4	Probable papel del polimorfismo de los alelos HLA Clase II en Artritis Reumatoidea Juvenil	27
1.6	Un modelo molecular para el entendimiento de la susceptibilidad genética al desarrollo de ARJ	32
1.7	Referencias	40
2.	EL ESTUDIO DEL HLA Y SU APLICACIÓN EN GENÉTICA DE POBLACIONES	55
2.1	El descubrimiento y el poblamiento de América	55
2.2	La población Colombiana	56
2.3	Estudio del sistema HLA en las poblaciones amerindias	59

2.4	Evolución y aparición de nuevos alelos HLA en amerindios	59
2.5	HLA en Afroamericanos del Norte y sur América	61
2.6	Caracterización de genes MHC en grupos Afroamericanos	62
2.7	Referencias	65
3.	APLICACIONES DIAGNOSTICAS DEL MHC	70
3.1	Generalidades	70
3.2	Referencias	74
4.	OBJETIVOS	77
4.1	Objetivo general	77
4.2	Objetivos específicos	77
5.	MATERIALES Y METODOS	79
5.1	Diseño experimental	79
5.1.1	Tipo de estudio	79
5.1.2	Muestra poblacional	79
5.1.2.1	Selección de muestra	79
5.1.2.2	Fuente de Casos	80
5.1.3	Criterios de Inclusión	80
5.1.4	Criterios de Exclusión	81
5.1.5	Recolección de la información	81
5.2	Métodos	81
5.2.1	Extracción de DNA Metodología de Salting-Out	81
5.2.2	Tipaje molecular de alelos HLA Clase I y HLA Clase II (PCR-SSOP, INNOLIPA, PCR-SSP	83
5.2.3	Tipificación HLA CLASE I : PCR-SSOP (Sondas de Oligonucleótidos de Secuencia Específica)	84
5.2.4	Tipificación de los locis HLA clase II, exónes DRB1* y DQB1* a través de la amplificación con iniciadores de secuencia específica - PCR-SSP	87
5.3	Análisis estadístico	91
5.3.1	Frecuencias antigénicas y génicas	92
5.3.2	Riesgo relativo	94
5.3.3	Fracción etiológica	95
5.3.4	Fracción preventiva	95
5.4	Referencias	96
	RESULTADOS	
6.	ANTHROPOLOGY REPORT FOR REGION LATIN-AMERICA: AMERINDIAN AND ADMIXED POPULATIONS COLOMBIANOS	99

7.	A NEW HLA-CW (CW*0808) FOUND IN A COLOMBIAN MESTIZO INDIVIDUAL POSSIBLY GENERATED BY AN INTRALOCUS/INTRALOCI GENE CONVERSION	118
8.	REAL-TIME SEQUENCE-SPECIFIC PRIMER POLYMERASE CHAIN REACTION AMPLIFICATION OF HLA-CLASS II ALLELES: A NOVEL APPROACH TO ANALYZSE MICROCHIMERISM	134
9.	POLIMORFISMO DE LOS ALELOS HLA-DRB1 Y SU ASOCIACIÓN CON ARJ EN UNA MUESTRA DE NIÑOS MESTIZOS COLOMBIANOS	148
10.	ABSENCE OF EO-JRA IN A NORTH COLOMBIAN AFROCARIBBEAN SUBPOPULATION ASSOCIATED HLA-CLASS I DNA POLYMORPHISM	179
11.	HLA-DRB1 ALLELES AND HLA-DRB1 SHARED EPITOPES ARE MARKERS FOR JRA SUBGROUPS IN COLOMBIAN MESTIZOS	181
12.	CONCLUSIONES	204

INTRODUCCIÓN

**1. UNA APROXIMACIÓN AL SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL POLIMORFISMO
DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD. EL MODELO DE LA
ASOCIACIÓN HLA Y ARJ**

G Garavito^{1 3 4}, A Iglesias², E Egea^{1 4}, D Jaraquemada^{3 4}, P Martínez^{3 4}, E E
Egea^{1 4}

¹ Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular, Universidad del Norte,
Barranquilla, Colombia.

² Departamento de Reumatología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá,
Colombia.

³ Instituto de Biología Fundamental, Universidad Autónoma de Barcelona.
Barcelona, España.

⁴ Estos autores contribuyeron de igual forma en el desarrollo de este trabajo.

**Artículo de revisión publicado en la revista de salud Uninorte, órgano de
difusión de la División Ciencias de La salud de la Universidad del Norte,
Barranquilla, Colombia. volumen #14 –2003**

Versión modificada y ampliada para la presentación de esta tesis

1.1 RESUMEN

1.1.1 Objetivo Llevar a cabo una actualización del estado del arte acerca del significado biológico del polimorfismo del sistema genético Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH).

Revisar la literatura relacionada con la asociación de los antígenos de histocompatibilidad en el humano (HLA) y la susceptibilidad o resistencia al desarrollo de la Artritis Reumatoidea Juvenil (ARJ).

Presentar un modelo hipotético para la comprensión de la susceptibilidad genética a desarrollar ARJ.

1.1.2 Fuente de Datos Las referencias bibliográficas que soportan este artículo se obtuvieron a través de búsquedas en las siguientes Bases de Datos: Pubmed, Ovid, Ebsco. Inicialmente se encontraron 139 artículos, de los cuales se seleccionaron 83. Se incluyó también información del desarrollo de un proyecto de investigación de nuestro Grupo "Polimorfismo molecular de los antígenos HLA en ARJ" cod. Colciencias 1215-04-280-96.

1.1.3 Resultados Artritis Reumatoidea Juvenil (ARJ) es la enfermedad más común en la práctica reumatológica pediátrica y la menos estudiada inmunogenéticamente. A diferencia de la Artritis Reumatoide (AR) del adulto, la

ARJ tiene ciertas variantes clínicas, lo que la hace más interesante desde el punto de vista genético (fenotipos). En su etiopatogenia, se han identificado varios factores que en su conjunto explicarían el inicio y la perpetuación de la respuesta inflamatoria que afecta las articulaciones y tejidos vecinos, y que de no ser controlados llegan a destruirlos. Tal como sucede en otras enfermedades autoinmunes. La patogénesis de la enfermedad puede determinarse por alteraciones a nivel de complejo trimolecular, constituido por: un antígeno putativo, el receptor de linfocitos T y el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH).

Nuestro grupo durante los últimos 4 años ha estado estudiando la asociación entre ARJ y el polimorfismo de los alelos HLA DRB1* y DQB1* en niños mestizos de nuestro país. Los resultados son congruentes con otros hallazgos descritos en la literatura por diferentes grupos de investigadores. En la serie de pacientes estudiados por nosotros se encontró, que los alelos HLA DRB1* 1104, HLA*0701 y HLA*1602, están asociados a la susceptibilidad de desarrollar ARJ, además nuestros datos muestran que los alelos HLA DRB1* 1501 y HLA DQB1* 0602 están claramente asociados con protección.

Es importante resaltar que todos los alelos asociados a susceptibilidad comparten el amino ácido *Asp* en la posición 70 y aquellos que se muestran como marcadores de protección, contienen *Gln* en la misma posición.

1.1.4 Conclusión La información obtenida de la literatura y los hallazgos encontrados en nuestra serie de pacientes colombianos, son relevantes e importantes, dado que desde el punto de vista molecular, a nivel de la presentación antigénica, el aminoácido en la posición 70 en el motivo 67 a la 73, a nivel de la molécula HLA podría activar células TH1 o TH2, las cuales estarían comprometidas en el inmunopatología de esta entidad. Otros factores genéticos y/o ambientales en asocio con estas características moleculares, expresadas a nivel de la molécula HLA, comprometida en la presentación antigénica, podrían interactuar y su resultado estaría influenciando el desarrollo y la expresión de la ARJ.

1.1.5 Palabras claves Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), Artritis Reumatoide Juvenil, HLA y ARJ.

1.2 GENERALIDADES

La Inmunogenética utiliza herramientas de la Inmunología y de la Biología Molecular para definir a los genes de la respuesta inmune y a sus productos, los antígenos HLA. Los avances tecnológicos para la identificación del gran polimorfismo de los genes han permitido cada vez mas asociar sistemas genéticos y sus productos a la susceptibilidad y /o resistencia a enfermedades. De hecho, hace mas de 20 años se descubrió la asociación de los antígenos HLA con diferentes enfermedades. Hoy se han descubierto más de 60 entidades clínicas asociadas a HLA y en diferentes grupos étnicos (1-2).

Artritis Reumatoidea Juvenil (ARJ) es la enfermedad más común en la práctica reumatológica pediátrica y la menos estudiada inmunogenéticamente. A diferencia de la AR del adulto, la ARJ tiene ciertas variantes clínicas, lo que la hace más interesante desde el punto de vista genético (fenotipos) (3-5).

En Colombia, Sur América, son escasos, sino ausentes, los trabajos realizados en el análisis de esta entidad. Sólo existen dos resúmenes, uno presentado en un Congreso de la Sociedad Colombiana de Reumatología (6). El otro en 1999 en el Congreso de la American College of Rheumatology (7). La enfermedad de por sí, es poco conocida en el país. De ella no se conoce su prevalencia ni su frecuencia, como tampoco su morbilidad. Actualmente no existe un registro médico Nacional que articule y aúne los esfuerzos encaminados al mayor conocimiento del padecimiento.

En su etiopatogenia, se han identificado varios factores que en su conjunto explicarían el inicio y la perpetuación de la respuesta inflamatoria que afecta las articulaciones y tejidos vecinos, y que de no ser controlados llegan a destruirlos. Este proceso inflamatorio puede originar trastornos del crecimiento. Igualmente, esta inflamación crónica determina grados variables de retardo pondoestatural, retardo puberal, osteoporosis y anemia (8-9). Tal como sucede en otras enfermedades autoinmunes, la patogénesis de la enfermedad puede determinarse por alteraciones a nivel de complejo trimolecular, constituido por: un antígeno

putativo, el receptor de linfocitos T y el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) (10).

ARJ corresponde a un grupo heterogéneo de cuadros clínicos con manifestaciones crónicas que varían en morbilidad. Es una artropatía inflamatoria crónica que afecta diferentes articulaciones en número y lugar diferente. Puede producir manifestaciones extraarticulares, predominando éstas últimas en el cuadro clínico de ARJ sistémica. Esta última se caracteriza por fiebre prolongada, rash evanescente, serositis y visceromegalia. Es frecuente la afección del ojo. Este proceso inflamatorio intraocular es usualmente subclínico y puede determinar mas secuelas que la misma artritis, tal y como sucede en la forma temprana de ARJ oligoarticular y en la forma monoarticular .

1.3 CLASIFICACIÓN CLÍNICA

Por definición el inicio de la enfermedad ocurre antes de los 16 años de edad y está clasificada en tres grupos clínicos: ARJ oligoarticular, ARJ poliarticular y ARJ sistémica (11-14). El diagnóstico es básicamente clínico, no hay exámenes paraclínicos que permitan el diagnóstico definitivo de la misma. El Colegio Americano de Reumatología (14) estableció en 1977, los siguientes criterios diagnósticos:

- Artritis con una duración mayor de 6 semanas; derrame articular, signos indirectos de artritis tales como calor local, dolor a la palpación y movilización de la articulación, así como pérdida funcional de la misma.

- Según el modo de inicio debe clasificarse en: oligoarticular (menos de 5 articulaciones), poliarticular (mas de 5 articulaciones) y sistémica (en donde predominan las manifestaciones extraarticulares).
- Instalación del cuadro clínico antes de los 16 años.

A continuación y en breve se describen los subgrupos clínicos:

1.3.1 ARJ Oligoarticular Se define como ARJ oligoarticular al cuadro clínico de inicio temprano (antes de los 6 años). Usualmente se presenta en pacientes del sexo femenino con compromiso ocular (Iridociclitis). La forma benigna es mas frecuente que todos los otros subgrupos de artritis reumatoidea juvenil. La de inicio tardío puede presentar evidencia de compromiso axial y por esta razón, algunos autores consideran que corresponden más bien a la forma juvenil de espondiloartropatía.

1.3.2. ARJ Poliarticular Este subgrupo clínico se clasifica en seropositivo o seronegativo, dependiendo de la presencia o ausencia de factores reumatoideos. Las seropositivas tienden a desarrollar formas más persistentes de artritis, ser erosivas y presenta nódulos reumatoideos. En este subgrupo también se presentan otras complicaciones observadas en la artritis reumaotidea del adulto.

1.3.3. ARJ Sistémica Las manifestaciones extraarticulares predominan en este cuadro clínico, no siempre se presenta compromiso inflamatorio articular al inicio de la enfermedad. El diagnóstico diferencial puede ser muy difícil y debe ser exclusión en todo caso del síndrome febril prolongado. El compromiso articular

puede ser muy variable, sin embargo las formas persistentes de artritis tienden a ser muy destructivas y de tipo poliarticular.

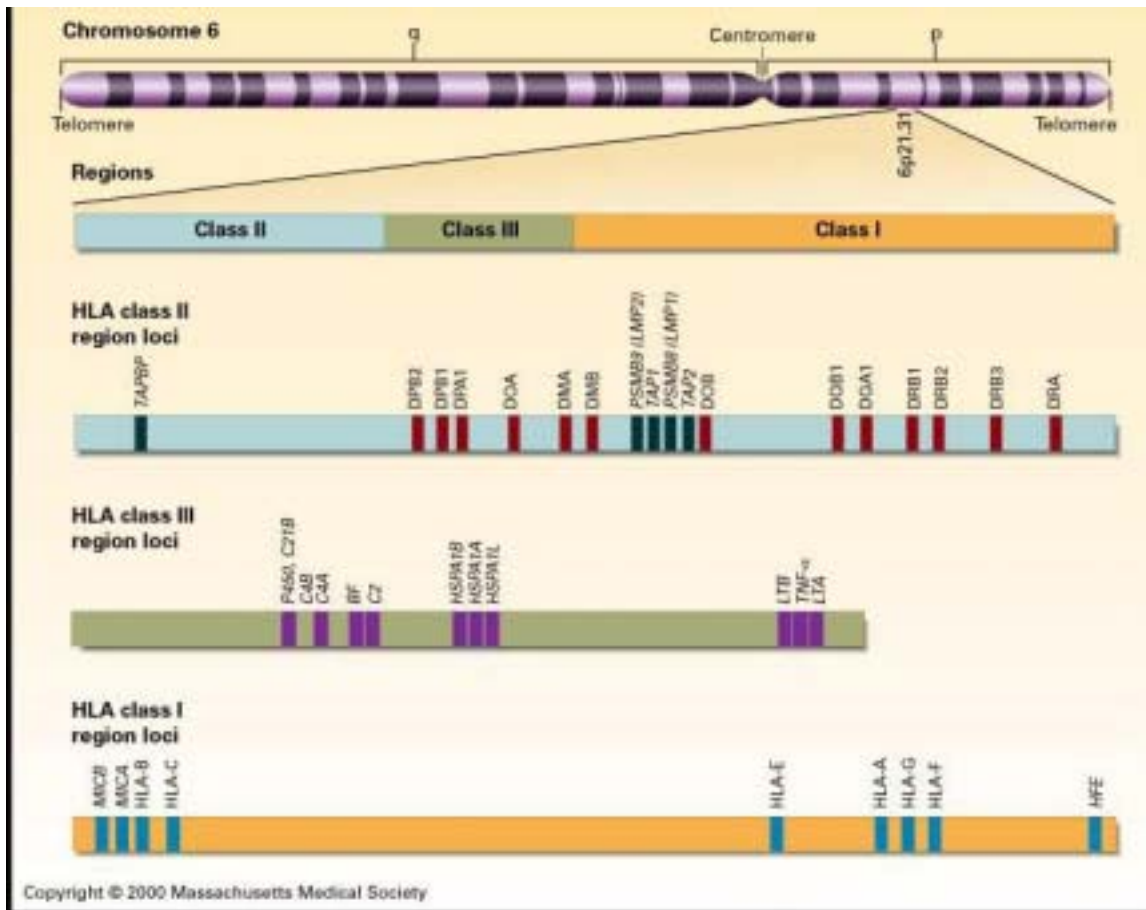
El compromiso ocular puede presentarse en las tres formas de ARJ, pero es más frecuente en el subgrupo oligoarticular, al punto que debe ser investigado rutinariamente en todos los pacientes mediante un examen oftalmológico periódico. Característicamente es un cuadro subclínico y la severidad de las secuelas está asociado a la cronicidad del proceso inflamatorio intraocular no controlado. Cataratas, pérdida visual, glaucoma, son los signos más frecuentes. Adicionalmente, puede haber dicotomía entre la severidad de la artritis y la uveítis. La frecuencia de esta complicación está entre el 20 y 70% (15).

1.4 EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (CMH)

El CMH se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6. Ocupa un segmento de aproximadamente 3500 kb (3.500.000 bases) de ADN. Dentro de este complejo se ubican un conjunto de genes que codifican y controlan la síntesis de glicoproteínas de membrana celular, las cuales se expresan en las diferentes poblaciones de células inmuno competentes. Este sistema protéico se denomina sistema HLA (Sistema de Antígenos de Leucocitos Humanos) tiene una característica de suma importancia y es la presencia de un desequilibrio de enlace entre alelos de un *loci*, lo cual se manifiesta en el hecho de que dichos alelos se hereden juntos en forma preferencial. El desequilibrio de enlace génico puede ser consecuencia de la selección natural entre una combinación génica específica.

También puede ser debido al hecho de que la población está en un estado de transición y no ha alcanzado aún el equilibrio. Estos genes codifican para la expresión de los Antígenos HLA clase I y HLA clase II denominados HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G HLA-D, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ. Igualmente se encuentran los genes HLA clase III que gobiernan la síntesis de los factores del Complemento como son C2, C4A y C4B de la vía clásica y el factor Bf de la vía alterna (16) (Figura 1).

Figura 1. Cromosoma 6, organización de los antígenos HLA clase I y clase II.



Tomado de: Klein J. Sato A. The HLA system. First of two parts. N Eng J Med 2000; 343:702-9.

1.4.1 Genes MHC Clase I. Estructura y función Estos genes codifican para la expresión de una serie de moléculas presentes en la superficie de las células nucleadas. Estas moléculas son glicoproteína de membrana (cadena pesada de peso molecular de 44k) que se asocian a un segundo polipéptido denominado beta 2-microglobulina (de peso molecular 12 K), la

cual es codificada por otro cromosoma. Cada cadena pesada puede ser dividida en regiones: tres dominios extracelulares (cada uno de aproximadamente 100 aminoácidos de largo), una región de transmembrana y una cola citoplasmática. Cada cadena pesada es inicialmente sintetizada con un péptido endógeno en su amino terminal. Este péptido es removido del polipéptido durante el transporte a la superficie celular y no se le encuentra en la proteína madura (16) (Figura 2).

Los *loci* de clase I son muy similares entre sí. Las secuencias que identifican un alelo del *locus* A de un alelo del *locus* B o C están localizados en el primer exón, o en los exones localizados en el 3' del gen (que codifican las regiones de transmembrana y citoplasmática) o en los intrones que separan a los exones.

Cada exón dentro de un gen codifica una región específica de la cadena pesada clase I. En los alelos de Clase I, los exones segundo y tercero que codifican el primer y segundo dominio de las cadenas pesadas, contienen la mayoría de las diferencias alélicas. Existen tres moléculas de Clase I denominadas HLA-A, HLA-B y HLA-C, las cuales presentan los péptidos a los linfocitos T CD8. Una característica fundamental de las moléculas de Clase I es su enorme polimorfismo poblacional. Actualmente, el uso de anticuerpos monoclonales permite una mayor exactitud para la determinación de subtipos HLA. El comité de nomenclatura HLA de la Organización Mundial de la Salud realiza talleres Internacionales de

Histocompatibilidad para definir especificidades para los diferentes Loci. Se dice que existen más de 30 alelos distintos para la molécula HLA-A, más de 60 para la HLA-B y más de 15 para HLA-C. La expresión de éstas moléculas es codominante, por lo que la mayoría de los individuos son heterocigotos. Cada célula de un individuo expresa por lo menos tres diferentes moléculas de clase I, HLA-A, HLA-B y HLA-C. Estas moléculas son muy similares entre sí. Hay aproximadamente entre 0.5 y 1 millón de moléculas de clase I en la superficie de una célula. Es un *loci* altamente polimórficos. La designación es dada por números. Por ejemplo, A*0202 y A*0301 son alelos del *locus* HLA-A. B*2701 es un alelo del *locus* HLA-B. Existen alelos nulos o no expresados el cual se identifican con la letra "N" en el nombre del alelo, por ejemplo, A*2411N (17).

1.4.2 Genes MHC Clase II. Estructura y Función Los genes que codifican las cadenas alfa y beta de las proteínas de clase II están localizados uno cerca del otro, se ubican cerca al centrómero en la siguiente secuencia: DP, DQ y DR. Otros genes también ubicados en la misma región, no presentan productos génicos como los SX, DZ, DO, DX y DV (18).

Estas glucoproteínas están constituidas por un heterodímero, con una cadena α de 229 aa (32-34 KD) y una β de 237 aa (28-29 KD), unidas no covalentemente. Cada cadena posee dos dominios globulares externos, con puentes de disulfuro intracatenarios en ambos dominios de la cadena α . Durante su síntesis y

transporte intracelular, el dímero $\alpha\beta$ se halla asociado a una cadena de 31 KD llamada invariante. El complejo migra a través del aparato de Golgi y luego hacia los endosomas, en donde el pH ácido liberaría la cadena invariante. Cada cadena esta codificada por un gen respectivo en el sistema HLA, denominados $DR\alpha_1/DR\beta_1$, $DQ\alpha_1/DQ\beta_1$ y $DP\alpha_1/DP\beta_1$. Algunos individuo expresan además productos denominados: DRw52, DRw53 o DR β 51, donde la cadena $DR\alpha$ es igual a la que está presente en las moléculas HLA-DR y la cadena β es producto de un gen denominado DR β 3, DR β 4 o DR β 5 .

La información de un gen en particular no se localiza en una sola porción de pares de bases sino que se encuentra en múltiples segmentos de ADN de doble banda llamados exones. Estos segmentos, a su vez, son separados por segmentos de ADN interpuestos llamados intrones. El conjunto entero de exones que contiene la información codificante para una cadena polipeptídica completa constituye un gen. La estructura dominante de las proteínas de clase II es un reflejo del arreglo exón/intrón de los genes a nivel del DNA. Los genes de la cadena α contienen 5 exones, el primero codifica la señal de secuencia, el segundo el dominio extracelular α_1 , el tercer exón codifica el dominio extracelular α_2 , el cuarto la porción transmembrana y la cola citoplasmática y el quinto codifica la región 3'UT. Los genes de la cadena β tienen un arreglo idéntico excepto para la cola citoplasmática la cual es codificada por el exón 5 separada de la región 3'UT por 24 pb, cerca del exón 6. Los genes α y β de los diferentes subgrupos difieren

significativamente en la longitud de sus intrones. La subregión DR es única entre los antígenos HLA clase II, la organización de los genes de la cadena β no es la misma para todos los haplotipos. El gene de la cadena α es virtualmente invariable (19).

El polimorfismo de los antígenos de HLA clase II tienen un significado fundamental en la función de las moléculas de HLA clase II con relación a la restricción inmune de las interacciones celulares. Los residuos polimórficos de los antígenos de clase II están principalmente localizados en el dominio externo NH₂-terminal de la cadena β , codificada por el segundo exón (20). Las expresiones alélicas de los antígenos HLA-DR y DQ representan numerosas especificidades y están determinadas primariamente por las variaciones alélicas en el segundo exón de los genes DR β 1 y DQ β 1 respectivamente (21). Más aún, los epítopes celulares definidos que contienen las especificidades HLA DW están en la mayoría de los casos correlacionados con las variaciones alélicas en el mismo exón del gene DR β 1 (22). Los alelos HLA clase II, se definen inicialmente por las letras de cada subregión DR, DQ o DP, a continuación LA letra α o β de acuerdo a la cadena a la cual codifican, luego los dos dígitos indican el subtipo y los dos siguientes indican el numero cronológico respectivo por ejemplo, el alelos HLA DRB1*0403 pertenece a la especificidad DR4 y subtipo genético 0403.

El polimorfismo localizado en el exón 2 de los cuatro genes DR β expresados, están restringidos a tres regiones hipervariables en las posiciones de los aminoácidos 9-13, 26-33 y 67-74. Entre los genes de HLA Clase II estas variaciones estructurales son la clave de las diferencias funcionales en el reconocimiento inmune, del fenómeno de presentación antigénica lo que conlleva a la inmunomodulación de la respuesta inmune, al procesamiento y presentación de epítopes inmunogénicos y la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad (16).

Las moléculas HLA clase II se encuentran en la superficie de las células del sistema inmune como linfocitos B y macrófagos, (células presentadoras de antígenos que juegan un papel fundamental en el reconocimiento de antígenos foráneos). Cada célula del sistema inmune de un individuo expresa tres diferentes tipos de moléculas de clase II, HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Estas moléculas son muy similares entre sí y se estima que hay entre 0.5 y 1 millón de moléculas de clase II en la superficie celular.

Figura 2. Estructura HLA clase I - II.

Tomado de: Klein J. Sato A. The HLA system. First of two parts. N Eng J Med 2000; 343:702-9.

1.4.3 El papel biológico de los Antígenos HLA La expresión de las moléculas de Clase I y Clase II en la superficie de la célula es un proceso complejo que contempla la síntesis, el procesamiento, el transporte y la secreción de ellas. La ruta de biosíntesis presenta una regulación ontogénica precisa, a la vez que está sometida a la modulación por interferón y por la disponibilidad y procesamiento del

propio antígeno que ha de ser presentado. En el contexto de esta regulación, tiene particular interés la modulación de la expresión de los antígenos del CMH por virus y oncogenes. Por su parte, las moléculas de clase I, presentan antígenos endógenos procesados, bien como señales de identidad, que en situaciones patológicas se comportan como extraños, dando lugar a las enfermedades autoinmunes, o bien como antígenos que se expresan como resultado de un proceso patogénico (Infección viral o transformación maligna) (23).

Las moléculas de clase II presentan en cambio, antígenos exógenos procesados y capturados previamente, bien de manera inespecífica por los macrófagos o de manera específica mediante las inmunoglobulinas de la superficie de las células B. Por otro lado esta molécula estabiliza el heterodímero durante el procesamiento de ambas estructuras en el sistema de Golgi durante su recorrido hacia la superficie (24); acontecimiento que es igualmente válido para los HLA clase I.

Las moléculas del CMH de Clase I se presentan como marcadores universales sometidos a la vigilancia de los linfocitos T CD8. Por otra parte las moléculas HLA Clase II se expresan exclusivamente en células relacionadas con el sistema inmunológico, cuya vigilancia corresponde a los linfocitos T CD4.

La susceptibilidad a una gama de enfermedades está asociada a los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, y a sus productos fenotípicos (antígenos HLA). La asociación entre la expresión de un antígeno particular HLA y una

enfermedad no es muy clara para todas ellas. No todos los individuos con una enfermedad dada tienen el antígeno HLA asociado y la mayoría de la población que presenta el antígeno en cuestión no tiene asociada la enfermedad. Una explicación de lo anterior es que hay una penetrancia incompleta del rasgo controlado genéticamente (25,17).

Otras explicaciones posibles son:

- La asociación observada es debida a un gen estrechamente ligado en un desequilibrio de enlace con el gen del antígeno HLA identificado.
- Existe una heterogenicidad adicional de los antígenos HLA que no se ha detectado y sólo ciertas variantes llevan el riesgo de enfermar.
- Epítopes relevantes son compartidos entre alelos diferentes del mismo *loci* ó de *locis* diferentes.
- La asociación de la enfermedad con diferentes antígenos puede caracterizar diferentes subclases del estado de la enfermedad.

El proceso de la enfermedad puede ser debido a la interacción de otros productos génicos codificados en o fuera del complejo HLA. La diversidad del sistema HLA representa ventajas diferenciales asociadas con numerosos alelos en diferentes nichos ecológicos, y presenta una ventaja selectiva que se incrementa con el estado heterocigoto (25).Las asociaciones del sistema HLA se demuestran mediante el incremento o la disminución de las frecuencias de un alelo HLA en la

enfermedad objeto de estudio, comparándose con la frecuencia del mismo marcador en individuos sanos pertenecientes al mismo grupo étnico (26).

1.5 ASOCIACIÓN HLA Y ENFERMEDAD

Los primeros estudios sobre HLA y enfermedad, se realizaron en relación con la susceptibilidad a las patologías infecciosas. Teniendo en cuenta, que la capacidad de reacción a diferentes tipos de patógenos está determinada genéticamente, los elementos básicos para desencadenar una respuesta inmune pueden ser factores determinantes en el desarrollo de estas enfermedades. En este caso, como los antígenos HLA son los primeros elementos en entrar en contacto con los péptidos o moléculas derivadas de patógenos, el repertorio de un individuo puede estar a favor o no de iniciar una adecuada respuesta que confiera resistencia y/o una respuesta inadecuada que confiera susceptibilidad (27). Los estudios epidemiológicos apuntan a la existencia de factores dependientes del sistema HLA, sumado a la interacción con otros elementos, que están implicados en la predisposición a ciertas patologías. Por otra parte, los antígenos HLA deben presentar péptidos endógenos que deben ser reconocidos como propios para no desencadenar respuestas anómalas. Alteraciones en la composición de péptidos endógenos, así como también alteraciones en el posible aprendizaje del reconocimiento de lo propio, pueden estar relacionadas con el establecimiento de una respuesta inmune anormal contra elementos propios y la presencia de enfermedades autoinmunes.

Al buscar el verdadero papel biológico del MCH, se iniciaron las investigaciones de genes de susceptibilidad HLA en enfermedades de etiología obscura y en cáncer. El hallazgo de la asociación intensa entre el B27 y la espondilitis anquilosante en los años 70 desencadenó el estudio del papel del CMH en la expresión de la enfermedad. Actualmente hay más de 70 entidades clínicas en las que está confirmado el fondo genético HLA y lo publicado hasta 1985 en las diferentes poblaciones ha sido elegantemente revisado por Tiwari y Terasaki (5). El progreso es espectacular y los mecanismos moleculares se empiezan a aclarar. Dichas enfermedades se pueden clasificar en:

- Padecimientos con alteraciones inmunológicas de cualquier naturaleza (inmunodeficiencias, autoinmunes, alérgicas, etc.) relacionadas con genes DR, DQ o DP, a excepción de las primeras que lo están con los genes de clase I.
- Enfermedades metabólicas y deficiencias de complemento (hemocromatosis, hiperplasia suprarrenal, deficiencias de C2, C4), que se deben a la alteración o delección de un solo gen.
- Tumores malignos sólidos o hematológicos que dependen del locus A y/o de la clase II.
- Enfermedades infecciosas y parasitarias que pueden tener participación de clase I o de clase II.

Dentro de estas categorías caen los padecimientos hemato-oncológicos, inmunodeficiencias, reumatológicos, nefrológicos, oftalmológicos, autoinmunes,

endocrinológicos y sistémicos, digestivos, neurológicos, dermatológicos. Valga señalar que en muchas de las enfermedades con etiología infecciosa evidente, también se ha confirmado el papel del complejo HLA tanto en la protección como en la susceptibilidad, estos aspectos se abordarán a continuación (28).

En 1973 se publicaron dos trabajos claves en los que se informó una asociación de la Espondilitis Anquilosante (EA) con el HLA-B27 (29,30). Desde entonces ha sido evidente la asociación del B-27 con las siguientes enfermedades: EA, Síndrome de Reiter, Uveítis anterior aguda, Artritis Reactiva, Artropatía Psoriática, Sacroileítis y en general cualquier procedimiento que este involucrando las grandes articulaciones (30), la asociación ocurre en todos los grupos étnicos y la más intensa es con la EA. Es importante mencionar que la distribución geográfica de la EA corre paralela con la distribución del B-27. La prevalencia es alta en Caucásicos, intermedia en grupos del Medio Oriente, baja en Orientales y ni la EA ni el B-27 existen en aborígenes Australianos o en negros Africanos.

Un gran número de enfermedades autoinmunes han sido asociadas con los alelos HLA-DR. Sin embargo, debido al fuerte desequilibrio de enlace entre los exones DR β 1* y DQ β 1*, no se puede excluir la asociación de la enfermedad con los alelos HLA-DQ. Con el advenimiento de las sondas de DNA y el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como el análisis de los Polimorfismos en Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) para

amplificar secuencias específicas de DNA, se han podido clonar y secuenciar muchos de los alelos involucrados en una enfermedad, como es el caso de alelos DQ α y β para pacientes con Diabetes tipo I (31).

En otro aspecto importante del estudio de los genes HLA, se ha considerado el papel de estos genes en el origen y desarrollo de las enfermedades auto inmunes. En este caso, los genes HLA estarían reconociendo como "no propios" a elementos del organismo que no fueron "aprendidos" correctamente durante la etapa de aprendizaje intratímico o que han sido modificados por patologías orgánicas propias y por lo tanto se genera una respuesta autoinmune (32). Enfermedades autoinmunes como por ejemplo, la Artritis Reumatoide, la Diabetes Mellitus tipo I, la Espondilitis Anquilosante y, el Lupus Eritematoso Sistémico entre otras, son patologías en las cuales se ha estudiado el papel que ejercerían los genes HLA en su etiología y también en su pronóstico y desarrollo.

La Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (DMID), Tipo I, está asociada a los antígenos de histocompatibilidad HLA-DR3 y HLA-DR4. Dependiendo de las poblaciones estudiadas los genes HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0301 y DQB1*0201 en población Caucásica, se encuentran asociados a esta enfermedad. Se puede decir que los genes HLA, son responsables hasta de un 60% de la base genética para la DMID. Además, en esta enfermedad también se ha descrito posibles alelos protectores como es el caso de los genes DQB1 *0602 y

DRB1*1001, que han sido demostrados a través del análisis de estudios de secuenciación su papel en la protección contra esta patología (33, 34).

Algunas posiciones aminoacídicas como: Arginina en la posición 52 de HLA-DRB y Aspártico en la posición 57 de HLA-DQB, se consideran factores de riesgo para DMID, en forma contraria Glutámico en la posición 57 de DQB se considera protector (35, 33, 36,37).

Existen numerosas patologías que muestran asociación con los genes HLA. Algunas de ellas tienen marcadores estrechamente relacionados como son la Enfermedad Celíaca y los alelos HLA-DQ2, la Narcolepsia que cursa en el casi 95% de los casos con alelos HLA-DR2, DRB1*1601, DRB1*1502 y la Psoriasis asociada a HLA-Cw*0602 (37). La Tabla 1, muestra una lista de algunas patologías que han sido asociadas a los antígenos HLA.

La asociación de los genes HLA a enfermedad, se ha postulado a través de varios mecanismos fisiopatológicos entre los cuales se consideran:

1.5.1 El mimetismo molecular Consiste en el evento mediante el cual se produce una reacción cruzada entre antígenos microbianos y autoantígenos que origina una respuesta inmune anómala. En la enfermedad Espondilitis Anquilosante (EA), se ha observado que anticuerpos contra la *Klebsiella Cruzi* patógeno causante de procesos infecciosos en el tracto intestinal reaccionaban contra aquellos pacientes HLA-B27 positivos. Otros experimentos han encontrado

además, que anticuerpos monoclonales dirigidos contra HLA-B27, reconocen antígenos expresados por microorganismos tipo Klebsiella, Salmonella, Shiguella y Yersinia. En este mismo sentido, se postula que el antígeno HLA- B27, puede presentar péptidos derivados del tejido vertebral que guarden similitud con péptidos de algunos de los agentes infecciosos mencionados y se establezca una reacción cruzada en los individuos afectados.

1.5.2 Presentación de autoantígenos En condiciones normales, durante el desarrollo del tejido linfoide en la etapa embrionaria, los linfocitos T deben realizar un aprendizaje para reconocer los antígenos propios de cada organismo. La posibilidad de una falla inicial en este proceso, como la posibilidad de antígenos que hayan permanecido "aislados" durante un tiempo y luego expuestos a los antígenos HLA y/o una modificación tardía de los elementos propios puede ser la causa de la generación de una presentación de autoantígenos por parte de las moléculas HLA.

1.5.3 La molécula HLA como receptor de virus Los sistemas de entrada de un virus al interior de la célula, necesitan de un elemento receptor que permita su unión a la superficie celular para posterior endocitosis. El receptor, debe reconocer y aceptar a los virus con cierta especificidad de acuerdo al patrón de restricción existente en cada tipo de receptor. Los antígenos HLA, se han propuesto como elementos capaces de funcionar como receptores como en el caso del Adenovirus tipo 2 que se une a moléculas HLA clase I.

Otras moléculas también actúan como receptores virales, CD3 interacciona con el virus de Epstein-Barr y la molécula CD4 es el receptor para el virus HIV (38). En estos casos ya sea como receptor directo y/o mediante la interacción con otras moléculas como CD4, las moléculas HLA pueden intervenir como elementos de restricción o mediador para la generación de una respuesta inmune adecuada; aquí los diferentes alelos podrían actuar como elementos de protección y/o susceptibilidad para determinadas infecciones virales.

De otra parte los genes del sistema HLA tienen un papel preponderante a nivel de las interacciones fisiológicas del sistema inmune. Se ha establecido que muchos antígenos foráneos son reconocidos por el sistema inmune cuando se asocian con los productos del CMH. Sin embargo, el genotipo del CMH de la célula blanco puede limitar este reconocimiento, fenómeno conocido como restricción del CMH (30,39).

La fuerza de una asociación se expresa en términos de Riesgo Relativo (RR), que indica cuantas veces la enfermedad se expresa en un individuo con un determinado marcador HLA en relación con un individuo en quien no exprese dicho marcador. Un riesgo relativo mayor de 1 indica una relación positiva con dicho marcador. La mayoría de las patologías se asocian con antígenos HLA Clase I o HLA Clase II. Ellas pueden mostrar relación con autoanticuerpos

y células inflamatorias como es el caso de la *Myastenia Gravis*, Artritis Reumatoidea y Diabetes Juvenil (Tabla 1) (30). En las enfermedades asociadas a la clase I se presenta una respuesta de linfocitos T citotóxicos mientras que en las enfermedades asociadas a la Clase II se involucran linfocitos T ayudadores (40).

Tabla 1. Antígenos de Leucocitos Humanos (HLA) ligados a Enfermedades

ENFERMEDAD	ALELO
Artritis Reumatoidea	DR4, DR3-DRB1*0404, DRB1*0401
Espondilitis Anquilosante	B27
Enfermedad de Reiter	B27
Uveítis Aguda	B27
Fiebre de Ambrosía	B7
Psoriasis Vulgar	B13, B17, B37,Cw*0602
Hiperplasia Adrenal Congénita	B5
Hepatitis Autoinmune crónica	B8, DRw3
Myastenia Gravis	B12
Dermatitis Herpetiforme	Dw3, Drw3
Enfermedad Celíaca	Dw4, DQ2
Diabetes Juvenil Insulino Dependiente	DR3 , DR4
<i>Pemphigus Vulgaris</i>	DR4
Narcolepsia	DR2
Arteritis de Takayaso	DR2 , DR3
Lupus eritematoso Sistémico	DR3, DR2
Tuberculosis	B8, B15, B5, DR5, A2, B18, B35, B27,
Tiroiditis de Hashimoto	DR5
Esclerosis Múltiple	DR2

1.5.4 Probable papel del polimorfismo de los Alelos HLA-Clase-II en Artritis

Reumatoide Juvenil En las enfermedades autoinmunes del humano se ha podido documentar una asociación entre el polimorfismo de los alelos HLA-Clase I y Clase II con susceptibilidad a desarrollar dichas enfermedades. De hecho se ha postulado que en las enfermedades hereditarias complejas y poligénicas, la

respuesta inmune dirigida contra antígenos propios es crucial en la etiopatogenia de la enfermedad, y que ésta respuesta estaría condicionada por una particular expresión o rearreglo de los genes en un individuo. De esta forma, un alelo HLA específico podría favorecer la presentación antigénica de un péptido artritogénico a un repertorio de TcR predeterminado genéticamente (41).

A diferencia de la Artritis Reumatoide del adulto, la Artritis Reumatoide Juvenil es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista clínico, con un curso variable, en la que se definen subgrupos clínicos claramente diferentes (42). El componente genético en la patogénesis de Artritis Reumatoide del adulto ha sido bastante investigado, a diferencia de la Artritis Reumatoide Juvenil, en el cual los estudios al respecto no son concluyentes, sin embargo, es claro que los genes y los mecanismos que condicionan la predisposición y/o protección en ARJ son diferentes (43).

ARJ es una enfermedad compleja, poligénica en la cual se han podido documentar asociaciones no solo con los genes asociados al CMH sino también con muchos otros marcadores tales como: Los genes promotores de IL-1, IL-6 e IL-10, TNF alfa/beta y el polimorfismo de la región variable 6.1 de TcR entre otros (44).

Aunque las asociaciones más consistentes y reproducibles han sido las descritas con el polimorfismo de los genes CMH, los otros marcadores genéticos complican el análisis de las bases genéticas de esta enfermedad. Además es evidente que

no existen razones para suponer que ARJ sea diferente de las otras enfermedades autoinmunes en las cuales se ha podido documentar varios sistemas genéticos esparcidos por diferentes cromosomas asociados a la susceptibilidad y expresión de la enfermedad (45).

A pesar de muchos estudios encaminados a asociar Antígenos de Leucocitos Humanos y Artritis Reumatoide Juvenil (46), no está claro aún, cuáles de los genes del CMH están directamente involucrados en la patogénesis de esta enfermedad. Ella, por ser una enfermedad heterogénea, hace más compleja su asociación con los alelos HLA. Todos los estudios publicados han sido desarrollados en pacientes caucásicos y anglosajones más no en grupos étnicos mestizos.

La ARJ es una enfermedad autoinmune caracterizada por inflamación crónica de la membrana sinovial, la cual produce una destrucción de la articulación. En ella la respuesta inmunitaria parece estar determinada en parte por el polimorfismo de las moléculas Clase II del CMH, por el Reconocimiento y la interacción entre péptidos artritogénicos con las moléculas de HLA Clase II y el Receptor de Células T CD4+ (TcR). El proceso Biológico iniciaría una cascada de eventos que resultan en una respuesta inflamatoria, en una alteración de la inmunorregulación y en su defecto, una respuesta autoinmune (3-4).

Mucho se ha investigado e informado respecto a la asociación entre antígenos HLA y las diferentes formas de la enfermedad. También se han documentado asociación entre determinadas complicaciones de la enfermedad y la presencia o ausencia (factor de riesgo o factor protector) de ciertos antígenos HLA. Sin embargo, existen significativas variaciones entre este tipo de asociación en los diferentes grupos étnicos o incluso dentro de la misma población caucásica. El informe de varios familiares con Artritis Reumatoide Juvenil y de Artritis Reumatoide Juvenil de gemelos idénticos, apoya también la existencia de predisposición genética como un factor importante en la patogenicidad de la enfermedad (47).

Las más fuertes asociaciones entre antígenos HLA y subgrupos de ARJ se han encontrado en el subgrupo de ARJ oligoarticular. En la forma oligoarticular también se han descrito asociaciones que permiten identificar inclusive subgrupos que tienden a desarrollar formas severas de enfermedad. En la ARJ sistémica, se han encontrado menos asociaciones y son también más débiles (48).

Parece ser que los genes HLA Clase II del CMH portan la predisposición primaria que afecta la Artritis Reumatoidea Juvenil Pauciarticular con Cuadros Clínicos de Instalación Temprana (EOPA-JRA). Haas JP y colaboradores (49), encontraron una diferencia entre los datos de frecuencia y distribución del subtipo DR β *11 en pacientes con y sin enfermedad ocular al compararlos con los publicados por Melin Aldana y colaboradores (50) y las encontradas por ellos en la que no se

detectó una asociación significativa de DRB1*1101, *1102 y *1103 en ambos grupos. Sólo se observó una tendencia no muy significativa del DRB1*1104 en pacientes sin enfermedad ocular (33%) Vs pacientes con enfermedad ocular (22%). La frecuencia del DRB1*0801 no fué significativa (49).

En adultos con Artritis Reumatoide y Factor Reumatoide negativo (FR -), se observa una menor frecuencia de expresión del Antígeno HLA-DR4. Sin embargo en niños que sufren de ARJ y presentan un FR negativo, la frecuencia del antígeno HL-DR4 expresa una marcada disminución. Por otro lado, los niños con ARJ y FR positivo, tienen una frecuencia incrementada del HLA-DR4, en forma similar a la de los adultos con AR y FR (+). Estos conceptos permiten inferir que el alelo HLA-DR4 es un factor de riesgo para la producción de FR en ARJ y que estos alelos asociados a los *locis* HLA-DQ o HLA-DP pueden ser responsables de inhibir la producción de Anticuerpos anti-IgG de naturaleza factor Reumatoideo. De particular interés es el hallazgo descrito entre la asociación del alelo HLA-DP β 1*0301 y la asociación de FR positivo en niños con AR (44).

Ciertas combinaciones de los alelos DR β 1 y DP β 1 son características de sujetos con ARJ pauciarticular y Factor reumatoide negativo. En pacientes sin Anticuerpos Antinucleares e Iridociclitis Crónica se observó una disminución de DR β 1*0101/02 y DQ α 1*0101 (51). En un análisis de los alelos DP β 1 se mostró una disminución del alelo DP β 1*0201 en pacientes con ARJ pauciarticular conforme a otros reportes mencionados (52-55) y una disminución del DP β 1*0301 en aquellos con

FR negativo y enfermedad poliarticular (56). Los pacientes con enfermedad severa y FR positivo se encontró el DR β 1*0401 elevado en conjunto con una elevación del DR β 1*04 en homocigotos (57). También encontraron que en niños con ARJ Poliarticular y FR negativo, estaban presentes simultáneamente los alelos DP β 1*0301 y DR β 1*0801/03, confirmando una particular relación con la enfermedad. Con la población Noruega no se pudo explicar este hallazgo como una expresión de un desequilibrio de enlace (58).

El haplotipo HLA-DR5 y DR8 en heterocigotos dobles pueden representar una forma de herencia pseudorecesiva de ARJ oligoarticular, especialmente cuando se detecta en hermanos de los pacientes (56). Este epítoto compartido podría tener un papel importante en la patogenia de la enfermedad.

El subgrupo ARJ poliarticular RF+ clínicamente recuerda el cuadro clínica de AR en el adulto. Este está asociado con alelos HLA-DR4. Un análisis de secuenciación de estos alelos ha revelado un incremento en las frecuencias de DRB1*0401 y *0404, en población Caucasoide y del alelo DRB1* 0405 en pacientes japoneses (59-61). Todo lo anterior refuerza el concepto de que ARJ poliarticular RF+ está estrechamente asociado desde el punto de vista fisiopatológico y genético en el adulto. De hecho, la predisposición genética de la AR hoy está plenamente demostrado, que está asociada a los genes CMH clase II de algunos *loci* HLA DRB1. Lo anterior ha dado origen a la teoría del "Epítoto

Compartido". En resumen, un grupo de aminoácidos en la posición del motivo ^{67 - 74} ubicado en la región alfa hélice del sitio unión con el péptido artritogénico, define un grupo de alelos HLA DRB1*04 estrechamente asociado con susceptibilidad al desarrollo al AR del adulto (62-63-64).

1.6 UN MODELO MOLECULAR PARA EL ENTENDIMIENTO DE LA SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA AL DESARROLLO DE ARJ

El análisis a nivel molecular de la asociación de alelos del CMH en determinadas enfermedades con etiología auto-inmune, parece apoyar la hipótesis de que segmentos polimórficos de varios productos alélicos, actuando en conjunto, son responsables de la susceptibilidad o de la resistencia a desarrollarla (65).

Los mecanismos de asociación entre AR y HLA-DR4 son un ejemplo. Se empezaron a identificar primero por Cultivo de Mezcla de Linfocitos (66), posteriormente por medio de técnicas moleculares se confirmó que existen 12 variantes alélicas (67). Estos alelos difieren entre sí por uno ó cinco *a.a.* localizados entre los residuos 67 a 74 del dominio externo β 1 de la cadena DR β (68-69).

Ahora es evidente que ciertos subtipos de algunos alelos al nivel de los exones HLA DR β 1 condicionan la susceptibilidad a AR en caucásicos. Ellos son : DR β 1*0401, *0404, *0405, 0408 Los alelos DR β 1*0402, DR β 1*0403 y DR β 1*0407 parecen conferir resistencia al padecimiento. Estos datos indican que la

variación estructural en ciertos sitios de la cadena DR β 1 y sus efectos en el reconocimiento de los Linfocitos T, están muy relacionados con la inmunopatogenia de AR(69). De otra parte, no está claro aún si la asociación primaria de ARJ es con los alelos HLA- DR β 1 ó DQ α 1 o con la formación de heterodímeros responsables de los haplotipos DR β 1/DQ α 1 cuando estos últimos se asocian con la expresión de HLA-DR5 y HLA-DRw8 en éstos pacientes. Se teoriza diciendo que probablemente el polimorfismo de los alelos DQ β 1 es menos importante que la combinación de los haplotipos DR β -DQ α , dado que los genes DR β 1 definen el subtipo DR5 y Drw8 y los genes DQ α se encuentran en desequilibrio de enlace con los genes DR β . Posiblemente la secuencia de las bases nucleotídicas de los genes DR β establecen la secuencia aminoacídica requerida para la susceptibilidad a la enfermedad, de forma semejante como ocurre en el modelo de la Diabetes Mellitus Insulino Dependiente, en el cual, el cambio de un solo *a.a.* da una información importante, la cual contribuye significativamente en la susceptibilidad a la enfermedad. Todd y col. en 1987 notaron que la susceptibilidad a la Diabetes Tipo I estaba directamente relacionada con la ausencia en doble expresión o en forma "homocigota" del ácido aspártico en la posición 57 de la cadena β del DQ (Asp-57) (70).

En los haplotipos diabetogénicos, el *a.a.* en la posición 57 de sus alelos DQ β 1, puede ser Alanina, Valina o Serina. A pesar de que varios estudios en Caucásicos confirmaron esta observación (71-72-29), han aparecido importantes excepciones, como la presencia de Asp-57 en haplotipos DRw9, DR4 y DQw9 en Japoneses con Diabetes Tipo I (30-73) y aún en Caucásicos heterocigotos DR4/DR1 y DR4/DRw8 (74).

Los resultados obtenidos en grupos étnicos no Caucásicos han revelado que aunque la posición 57 de DQ β tiene gran importancia, es necesario considerar igualmente la contribución de la cadena DQ α (75-77). Se ha sugerido que la presencia de Arginina en la posición 52 de la cadena DQ α (Arg-52) confiere susceptibilidad a la Diabetes Tipo I (77) y está relacionada a la expresión de un heterodímero en la superficie de la célula compuesto de una cadena DQ α con Arg-52 y una cadena DQ β que no lleva el Asp-57. Los mismos autores proponen que la combinación DQA1*0102/DQ β 1*0602 da protección dominante (78-29).

Todo lo expuesto ha justificado el uso de la oligotipificación del DNA genómico amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y la interpretación de resultados obtenidos con el uso de tablas que listan la presencia de Arg-52 y Asp-57 en los diferentes alelos DQA y DQ β para expresarlos en forma de “genotipos” DQA/DQ β que serían SS/SS cuando se trata de haplotipos homocigotos Arg-52+/Asp57-; o PP/PP o cualquiera de otras combinaciones

posibles SP/PS, SS/PP, PS/PP etc (77). Como los haplotipos HLA-DR3 y DR5 generalmente se asocian al mismo alelo DQA1*0501, es indudable que los heterocigotos DR5/DR7 presentan en *trans* cadena alfa del DR5 y cadena β del DR7, el mismo heterodímero DQA1/DQ β 1 que el haplotipo DR3 presenta en *cis*, se ha informado en posición *trans* que el 90% de los pacientes con enfermedad celíaca presenta DQ (79). A diferencia de las enfermedades mencionadas hasta ahora, en la Esclerosis Múltiple el antígeno HLA que confiere susceptibilidad en caucasoides es predominante, el DR2 (80); aunque también existe asociación con DR4 y DRw6 (5), aún en Caucasoides, una tercera parte de los pacientes son DR2 negativo, y en otros grupos étnicos, no existe la asociación con este antígeno. Por esta razón se piensa que existen dos enfermedades inmunogénicamente diferentes: una Esclerosis esencialmente crónica progresiva y otra con procesos de remisión y recaída (5).

El 96% de los pacientes y el 60% de los controles presentan uno de dichos alelos DQA1 y DQ β 1 mencionados arriba, lo que da un riesgo relativo de 13 (81). Se sugiere que la Esclerosis Múltiple pudiera estar asociada a determinados alelos DQA1 y DQ β 1 con residuos polimórficos comunes, los cuales codificarían heterodímeros DQ alfa- β tanto en *cis* como en *trans*, con capacidad similar para unirse a péptidos encefalitogénicos y presentarlos a clones específicos de células T (82).

Nuestro grupo durante los últimos 4 años ha estado estudiando la asociación entre ARJ y el polimorfismo de los alelos HLA DR β 1 y DQ β 1 en niños mestizos de nuestro país. Los resultados hasta el momento encontrados son congruentes con otros hallazgos descritos en la literatura por diferentes grupos de investigadores. En la serie de pacientes estudiados por nosotros se encontró que el alelo HLA DRB1* 1104, estuvo asociado a la susceptibilidad de desarrollar ARJ además nuestros resultados muestran que los alelos HLA DRB1* 1501 y HLA DQB1* 0602 están claramente asociados con protección (Tabla 2) (83).

De particular interés resulta el hallazgo de que todos los alelos HLA DRB1* comprometidos en la susceptibilidad en nuestro grupo de pacientes, mostraron un aminoácido común en la posición 70 del motivo AA⁶⁸ VEDRRA⁷³ (Ácido aspártico). Este aminoácido no está presente en esta específica posición en los alelos HLA DRB1 que se muestran como marcadores de protección. El motivo presente en estos últimos alelos muestra en vez de Aspártico, Glicina en la misma posición (Tabla 3). Se resalta que este motivo no está presente en los alelos DQB1* asociados ya sea con protección o susceptibilidad. Datos no publicados comunicación personal G Garavito y colaboradores.

Estos hallazgos encontrados en nuestra serie de pacientes colombianos son relevantes e importantes dado que desde el punto de vista molecular, a nivel de la

presentación antigénica, el aminoácido en la posición 70 en el motivo arriba descrito, a nivel de la molécula HLA podrían activar celular TH1 o TH2 las cuales estarían comprometidas en el inmunopatología de esta entidad. Otros factores genéticos y/o ambientales en asocio con estas características moleculares expresadas al nivel de la molécula HLA comprometida en la presentación antigénica podrían interactuar y su resultado estaría influenciando el desarrollo y la expresión de la ARJ.

Tabla 2 ALELOS HLA-DRB1 EN MESTIZOS COLOMBIANOS CON ARJ

ALELOS DR	CASOS CON ARJ		CONTROLES		OR	ANÁLISIS ESTADÍSTICO			
	N= 65	FA	N=65	FA		X ²	p	FE	FP
DR1	17	13.0%	17	13.0%	1.0	0.0	0.58	NS	NS
DR15	3	2.3%	13	10.0%	0.194	5.77	0.0078	NS	0.26
DRB1*1501	2	1.5%	12	9.2%	0.14	7.94	0.0048	NS	0.466
DRB1*1502	0	0%	1	0.8%	0	PEF	1.0	NS	NS
DRB1*1503	1	0.8%	0	0%	2.02	PEF	1.0	NS	NS
DRB1*1602	8	6.1%	1	0.8%	8.98	PEF	0.016	0.88	NS
DRB1*0301	9	6.9%	7	5.3%	1.32	0.071	0.4	NS	NS
DRB1*04	28	21.5%	25	19.2%	1.21	0.28	0.59	NS	NS
DRB1*0405	8	6.1%	5	3.8%	1.68	0.76	0.38	NS	NS
DRB1*0407	10	7.6%	6	4.6%	1.79	1.13	0.28	NS	NS
DRB1*0404	7	5.3%	2	1.5%	3.80	2.96	0.085	NS	NS
DR11	13	10.0%	9	6.9%	1.56	0.87	0.35	NS	NS
DRB1*1101	3	2.3%	4	3.1%	0.74	PEF	0.5	NS	NS
DRB1*1102	2	1.5%	4	3.1%	0.48	PEF	0.68	NS	NS
DRB1*1104	7	5.3%	0	0%	16.79	PEF	0.013	0.93	NS
DRB1*1107	1	0.8%	0	0%	3.02	PEF	1.0	NS	NS
DR12	2	1.5%	3	2.3%	0.66	PEF	0.5	NS	NS
DRB1*06	3	2.3%	0	0%	7.3	PEF	0.12	NS	NS
DR13	16	12.3%	13	10.0%	1.31	0.40	0.52	NS	NS
DRB1*1301	9	6.9%	5	3.8%	1.93	1.27	0.26	NS	NS
DRB1*1302	3	2.3%	5	3.8%	0.581	PEF	0.72	NS	NS
DRB1*1303	3	2.3%	3	2.3%	1.0	PEF	1.0	NS	NS
DRB1*1305	1	0.8%	0	0%	3.02	PEF	1.0	NS	NS
DR14	5	3.8%	15	11.5%	0.28	5.86	0.015	NS	0.51
DRB1*1401	4	3.1%	6	4.6%	0.645	0.43	0.51	NS	NS
DRB1*1402	1	0.8%	9	6.9%	0.1	6.88	0.0087	NS	0.49
DRB1*0701	18	13.8%	14	10.8%	1.4	0.66	0.41	NS	NS
DRB1*0802	8	6.1%	9	6.9%	0.87	0.07	0.79	NS	NS
DRB1*1001	0	0%	1	0.8%	0	PEF	1.00	NS	NS

Tabla tomada del artículo publicado en revista Salud Uninorte Vol. 14-2003

N = Número de sujetos estudiados

PEF = Se aplica prueba exacta de Fisher

NS = no-significancia

FA = Frecuencia alélica

FE = Fracción etiológica

OR = Razón de disparidad

FP = Fracción Preventiva

Tabla 3 AMINO ACIDOS DE LA TERCERA REGION HIPERVARIABLE DEL EXON DRB1 ASOCIADOS CON PROTECCIÓN O SUSCEPTIBILIDAD, EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MESTIZOS COLOMBIANOS CON ARJ

ALELO DRB1*	SECUENCIA AA	POSICION DEL AMINO ACIDO							ARJ
		67	68	69	70	71	72	73	
1501	IVEQARA	Ile	Val	Glu (-)	Gln (N)	Ala	Arg	Ala	Protección
1402	LVEQRRA	Leu	Val	Glu (-)	Gln (N)	Arg	Arg	Ala	Protección
1104	LVEDRRA	Leu	Val	Glu (-)	Asp (-)	Arg	Arg	Ala	Susceptibilidad
O701 (*)	IVEDRRE	Ile	Val	Glu (-)	Asp (-)	Arg	Arg	Gly	Susceptibilidad
1602 (**)	LVEDRRA	Leu	Val	Glu (-)	Asp (-)	Arg	Arg	Ala	Susceptibilidad

(N)	Sin carga eléctrica
(-)	Carga negativa
(*)	ARJ Sistémica
(**)	ARJ Poliarticular

1.7 REFERENCIAS

1. Grom AA, Giannini EH, Glass DN. Juvenile Rheumatoid Arthritis and Trimolecular complex, HLA T cell receptor and from Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37(5):601-607.
2. Vehe RK, Begovich AB and Nepom BS. HLA susceptibility genes in Rheumatoid factor positive juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl.* 1990; 26:11-5.
3. Sakkas LI, Platsoucas CD. Immunopathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis: role of T cells and CMH. *Immunol Res* 1995;14(3):218-36.
4. Nepom BS, Nepom GT, Mickelson E, Schaller JG, Antonelli P, Hansen JA. Specific HLA-DR4-associated histocompatibility molecules characterize patients with seropositive juvenile rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1984; 74(1):287-91.
5. Tiwari JL, Terasaki PI. In: Springer-Verlag (editor). *HLA and disease associations.* New York: Springer-Verlag; 1985.p. 472.
6. Garavito G, Egea E, Malagón C, De La Cruz O, Uribe O, Ramirez LA, Navarro E, Angel L, Iglesias A. Patrones genéticos el MCH : alelos del HLA DRB1 y HLA DQβ1* en niños mestizos colombianos con Artritis Reumatoidea Juvenil. *Revista Colombiana de Reumatología,* 1999; 6(2): 219.

7. Garavito G, Egea E, Malagón C, De La Cruz O, Uribe Oscar, Ramírez LA, Navarro E, Iglesias A. Genetics patterns of CMH: HLA-DRB1- and HLA-DQB1* alleles in colombian mestizo children with Juvenile Rheumatoid Arthritis (JRA). In: ACR 63RD ANNUAL SCIENTIFIC MEETING, 1999, Memorias en la revista Arthritis and Rheumatism. Atlanta: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. v. 42, p. S260.
8. Nepom BS, Glass DN. Juvenile rheumatoid arthritis and HLA: report of the Park City III workshop. *J Rheumatol Suppl.* 1992; 33:70-4.
9. Falcini F, Cimaz R. Juvenile Rheumatoid Arthritis [Pediatric and heritable disorders] *Curr Opin Rheumatol.* 2000; 12(5):415-9.
10. Sakkas LI, Platsoucas CD. Immunopathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis: role of T cells and CMH. *Immunological Research* 1995; 14(3): 218-236.
11. Brewer EJ, Bass JC, Cassidy JT, et al. Criteria for the classification of Juvenile rheumatoid arthritis. *Bull Rheum Dis.* 1972; 23:712-719.
12. Cassidy JT. Rheumatic diseases of the childhood. In: Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB. *Textbook of Rheumatology.* Philadelphia: Saunders. eds.; 1993.p.1189-1208.

13. Pachman LM, Poznanski AK. Juvenile rheumatoid arthritis. In: McCarty D, Coopman W. eds. Arthritis and Allied Conditions. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993.p.1021-1038.

14. Brewer EJ Jr, Bass J, Baum J, Cassidy JT, Fink C, Jacobs J et al. Current proposed revision of JRA Criteria. JRA Criteria Subcommittee of the Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Section of The Arthritis Foundation. Arthritis Rheum 1977; 20(2 Suppl):195-9.

15. Bedford PA, Ansell BM And Woo P. Increased frequency of DR4 in systemic onset juvenile chronic arthritis. Clin Exp Rheumatol. 1992; 10(2):189-93.

16. Robinson MA And TJ Kindt. Major Histocompatibility Complex Antigens Genes. In Fundamental Immunology. P.E Williams (ed). Raven Press. New York. 1989.

17. Fainboim L, Satz M. Introducción a la Inmunología Humana. Ed. Mosby. Barcelona: Doyma Libros. .p. 67-84.

18. Marsh SG, Bodmer JG. HLA Class II Nucleotide Sequence. Eur J Immunogenet. 1991; 18(4):291-310.

19. Kappes D, Strominger JL. Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:991-1028.
20. Trowsdale J, Young JA, Kelly AP, Austin PJ, Carson S, Meunier H et al.. Structure, sequence and polymorphism in the HLA-D region. *Immunol Rev* 1985; 85:5-43.
21. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364(6432):33-9.
22. Brown JH, Jardetzky T, Saper MA, Samraoui B, Bjorkman PJ, Wiley DC. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988;332(6167):845-50.
23. Todd J. An molecular basis for CMH Class II associated autoimmunity. *Science* 1989; 240: 1003-1009.
24. Van Kerckhove C, Glass DN. The immunoglobulin supergene family and the polygenic nature of inherited predisposition to rheumatic disease *Arthritis Rheum* 1987 Aug;30(8):951-3.
25. Thorsby E. Invited anniversary review: HLA associated diseases. *Hum*

Immunol 1997;53(1):1-11.

26. Gorodezky L.C. Genes de susceptibilidad y suppresion inmunológica ligados al CMH en la lepra. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN México. D.F. Tesis Doctoral, 1989.

27. Parham P, Arnett K, Adams E. Episodic evolution and turnover of HLA-B in the indigenous human populations of the Americans. Tissue Antigens 50: 219-232, 1997.

28. Good RA. Mixed chimerism and immunologic tolerance. N Engl J Med 328:801, 1993.

29. Baisch JM, Weeks T, Giles R, Hoover M, Stastny P, Capra JD. Analysis of HLA-DQ genotypes and susceptibility in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1990;322(26):1836-41.

30. Carpenter CD And David J. Histocompatibility Antigens and Immune responses genes. Science Am C Immuno Histo Comp Aq 1988.

31. Svejgaard A, Ryder LP. Interaction of HLA molecules with non immunological ligans as explanation of HLA disease associations. Lancet 1976;2(7985):547-549.

32. Nepom G, Hansen J, Nepom B. The molecular basis for HLA class II

association with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* 7: 1, 1986.

33. Plugliese A, Bugawan T, Moromisato R, Einsenbarth S. Two subsets of HLA-DQA1 alleles mark phenotypic variation in levels of insulin autoantibodies in first degree relatives at risk for insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 93: 2447-2452, 1994.

34. Matín-Villa J, Martínez-Laso J, Moreno-Pelayo M, Castro-Panete M, Martínez-Quiles N, Amaiz-Villena A. Differential contribution of HLA-DR, DQ and TAP2 alleles to systemic lupus erythematosus susceptibility in Spanish patients: role of TAP2*01 alleles in Ro autoantibody production. *Ann Rheum Dis* 57:214-219, 1998.

35. Vicario J, Martínez-Laso J, Corell A, Martín-Villa J, Morales P, Anaiz-Villena A. Comparison between HLA-DRB and DQ DNA sequences and classic serologic markers as Type I (insulin dependent) diabetes mellitus predictive risk markers in the Spanish population. *Diabetología* 35: 475-481, 1992.

36. Gorodeszky C, Olivo A, Alaez C, Vasquez M, de la Rosa G, Montoya F, Villegas A, Vicario J. High- and low-risk molecular sequences in autoimmune diseases. Analyses of type I diabetes in Latin America. *Gac Med Mex* 133: 125-132, 1997.

37. López-Larrea C, Del Rio J, Martínez-Borra J, Gonzalez S. The OTF3 gene

polymorphism confers susceptibility to psoriasis independent of the association of HLA-Cw*0602. *J Invest Dermatol* 115: 821-828, 2000.

38. Hendel H, Caillat-Zucman S, Lebuance H, Carrinton M, O'Brien S. New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. *J Immunol* 162: 6942-6946, 1999.

39. Haspel MV, Pellegrino MA, Lampert PW, Adsytre MB. Human Histocompatibility determinants and virus antigens. Effect of measles virus Infection on HLA expression. *J Exp Med* 1977; 146(1):146-156.

40. Carbone FR and Bevar MJ. Major Histocompatibility Complex control T cell recognition. In: *Fundamental Immunology*. P.E. Williams (de) Raven Press. New York. 1989.

41. Heard R. HLA and autoimmune disease. In: Lechler R, editor. *HLA and disease*. London: academic Press; 1994.p.123-152.

42. Prieur AM, Petty RE. Definitions and classifications of chronic arthritis in children. In: *Arthritis in children and adolescent*. Clinical pediatrics. London: Bailleres Tindall; 1993. Vol. 63 .p. 124-30.

43. Stastny P, Fink CW. Different HLA-D associations in adult and juvenile

rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1979; 63:124-30.

44. Stastny P, Gao XJ, Fernandez-Vina M. Immunogenetics of rheumatoid arthritis and juvenile arthritis. *Recenti Prog Med* 1991; 82(7-8):409-16.

45. Okubo H, Itou K, Tanka S, Watanabe N, Kashiwagi N, Obata F. Analysis of the HLA-DR gene frequencies in Japanese cases of Juvenile rheumatoid arthritis by oligonucleotide DNA typing. *Rheumatol Int.* 1993; 13: 65-69.

46. Petz -Erlor ML, Gorodezky C, Layrisse Z, Klitz W, Egea E, Garavito G et al. Anthropology report for Region Latin-America: Amerindian and admixed populations. Anthropology report for Region Latin-America. In: Charron D (ed). Genetic diversity of HLA: functional and medical implication. Paris: EDK; Medical and Scientific International publishers. 1997; 337-345.

47. Glass David N, Giannini Edward H. Juvenile Rheumatoid Arthritis as a complex genetic trait. *Arthritis & Rheumatism.* 1999; 42: 2261-2268.

48. Miller ML, Aaron S, Jackson J, Fraser P, Cairns L, Hoch S et al. HLA gene frequencies in children and adults with systemic onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1985; 28(2):146-50.

49. Haas JP, Truckenbrodt H, Paul C, Hoza J, Scholz S, Albert ED. Subtypes of

HLA-DRB1*03, *08, *11, *12, *13 and *14 in early onset pauciarticular juvenile chronic arthritis (EOPA) with and without iridocyclitis. Clin Exp Rheumatol 1994;12 Suppl 10:S7-14.

50. Melin-Aldana H, Giannini EH, Taylor J, Lovell DJ, Levinson JE, Passo MH et al. Human leukocyte antigen-DRB1*1104 in the chronic iridocyclitis of pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis. J Pediatr 1992 Jul;121(1):56-60.

51. Ploski R, Vinje O, Ronningen KS, Spurkland A, Sorskaar D, Vartdal F et al. HLA class II alleles and heterogeneity of juvenile rheumatoid arthritis. DRB1*0101 may define a novel subset of the disease. Arthritis Rheum 1993; 36(4):465-72.

52. Hoffman RW. Shaw S. Francis LC. Larson MG. Petersen RA. Chylack LT et al. HLA-DP antigens in patients with pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1986; 29(9):1057-62.

53. Odum N. Morling N. Friis J. Heilmann C. Hyldig-Nielsen JJ. Jakobsen BK et al. Increased frequency of HLA-DPw2 in pauciarticular onset juvenile chronic arthritis. Tissue Antigens 1986; 28(4):245-50.

54. Begovich AB. Bugawan TL. Nepom BS. Klitz W. Nepom GT. Erlich HA. A specific HLA-DP-B allele is associated with pauciarticular Juvenile Rheumatoid Arthritis but not adult rheumatoid arthritis. Proc Natl Acad Sci USA 1989;

86(23):9489-93.

55. Van Kerckhove C, Luyrink L, Elma MS, Makrymowych WP, Levinson JE, Larson MG et al. HLA-DP/DR interaction in children with Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Immunogenetics* 1990; 32(5): 364-368.

56. Fernandez-Viña M, Fink CW And Stastny P. HLA antigens in juvenile arthritis. Pauciarticular and polyarticular juvenile arthritis are immunogenetically distinct. *Arthritis Rheum.* 1990; 33(12):1787-94.

57. Weyand CM, Xie C, Goronzy J. Homozygosity for the HLA-DRB1 allele selects for extraarticular manifestations in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1992 Jun;89(6):2033-9.

58. Ploski R, Forre O. Non HLA genes susceptibility to Juvenile Chronic Arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1994; 12 Suppl 10:S15-7.

59. Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1978; 298(16):869-71.

60. Nepom GT, Byers P, Seyfried C, Healey LA, Wilske KR, Stage D. Nepom BSHLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis Rheum* 1989; 32(1):15-21.

61. Wordsworth BP, Lanchbury JS, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS, Bell JI. HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility *locus* within the HLA class II region. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86(24):10049-53.
62. Hiraiwa A, Yamanaka K, Kwok WW, Mickelson EM, Masewicz S, Hansen JA et al. Structural requirements for recognition of the HLA-Dw14 class II epitope: a key HLA determinant associated with rheumatoid arthritis. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87(20):8051-5.
63. Fu XT, Bono CP, Woulfe SL, Swearingen C, Summers NL, Sinigaglia F et al. Pocket 4 of the HLA-DR (alpha,beta 1*0401) molecule is a major determinant of T cells recognition of peptide. J Exp Med 1995; 181(3):915-26.
64. Signorelli KL, Watts LM, Lambert LE: The importance of DR4Dw4 beta chain residues 70,71 and 86 in peptide binding and T cell recognition. Cell Immunol 1995; 162(2):217-24.
65. Davis CB, Mitchell DJ, Wraith DC, Toody JA, Zamvil SS, Mcdevitt HO et al. Polymorphic residues on the I-A beta chain modulate the stimulation of T cell clones specific for the N-terminal peptide of the autoantigen myelin basic protein. J Immunol 1989; 143(7): 2083-93.

66. Reinsmoen NL, Bach FH. Five HLA-D clusters associated with HLA DR4. *Hum Immunol.* 1982; 4(3):249-58.
67. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert DE, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA. et al. Nomenclature for factors the HLA system 1991. *Eur J Immunogenet* 1991; 19(5):327-44.
68. Gregersen PK, Shen M, Song QL, Merryman P, Degar S, Seki T et al. Molecular Diversity of HLA DR4 haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83(8):2642-6.
69. Nepom GT, Hansen JA, Nepom BS. The molecular basis of HLA class II Associations with Rheumatoid Arthritis. *J Clin Immunol.* 1987; 7(1):1-7.
70. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. A molecular basis for genetic susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Trends Genet* 1988; 4(5):129-34.
71. Horn GT, Bugawan TL, Long CM, And Erlich HA. Allelic sequence variation of the HLA-DQ *loci*: relationship to serology and to insulin-dependent diabetes susceptibility. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 85(16):6012-6, 1988.

72. Morel PA, Dorman JS, Todd JA, Mcdevitt HO And Trucco M. Aspartic acid at position 57 of the HLA-DQ beta chain protects against type I diabetes: a family study. Proc Natl Acad Sci U S A 1988;85(21):8111-5.

73. Yamagata K, Nakajima H, Hanafusa T, Noguchi T, Miyazaki D, Miyagawa J, Sada M, Amemiya H, Tanaka T, Kono N And Taru S. Aspartic acid at position 57 of DQ beta chain does not protect against type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Japanese subjects. Diabetologia 1989 Oct;32(10):762-4.

74. Ronningen K.S., Markussen G., Iwe T. And Thorsby E. An increased risk of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) among HLA-DR4,DQw8/DRw8,DQw4 heterozygotes. : Hum Immunol 1989 ;24(3):165-73.

75. Todd JA, Mijovic C, Fletchert J, Jenkins D, Bradwell AR and BARNETT AH. Identification of susceptibility *loci* for insulin-dependent diabetes mellitus by trans-racial gene mapping. Nature 1989 Apr 13;338(6216):587-9.

76. Sheeny MJ, Scharf SJ, Rowe JR et al. A Diabetes-susceptible HLA Haplotype Is Best Defined by a Combination of HLA-DR and -DQ Alleles J

Clin Investigation 1987; 83: 830.

77. Khalil I, d'Auriol L, Gobet M, Morin L, Lepage V, Deschamps I, Park MS, Degos L, Galibert F, Hors J. A combination of HLA-DQ beta Asp57-negative and HLA DQ alpha Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Invest 1990 Apr;85(4):1315-9.

78. Ronningen KS, Spurkland A, Iwe T, Vartdal F, Thorsby E. Distribution of HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 alleles and DQA1-DQB1 genotypes among Norwegian patients with insulin-dependent diabetes mellitus. Tissue Antigens 1991;37(3):105-11.

79. Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. J Exp Med 1989;169(1):345-50.

80. de Moerloose P, Jeannet M, Martins-da-Silva B, Werner-Favre C, Rohr J, Gauthier G. Increased frequency of HLA--DRw2 and DRw3 in multiple sclerosis. Tissue Antigens 1979;13(5):357-60.

81. Ollerup O. And Hillert J. Tissue Antigens. 1991, 38:1.

82. Spurkland A, Ronningen KS, Vandvik R, Thorsby E, Vartdal F, Charron D And

Fauchet R. Twelfth International Histcompatibility Workshop. HLA Class II refence booklet. 1996.

83.Garavito G, Malagón C, Ramírez LA, De La Cruz O, Uribe O, Navarro E et al. Polimorfismo de los alelos HLA-DRB1 y su asociación con ARJ en una muestra de niños mestizos colombianos. In press 2003; 23(3).

2. EL ESTUDIO DEL HLA Y SU APLICACIÓN EN GENÉTICA DE POBLACIONES.

2.1 EL DESCUBRIMIENTO y EL POBLAMIENTO DE AMERICA

El descubrimiento de América, por navegantes españoles en el siglo XV, ha sido uno de los eventos más trascendentales en la historia del Nuevo Mundo. Los cambios culturales, sociales, políticos y la llegada de una nueva población fueron marcados a partir de 1492 cuando Colón arribó a América por primera vez. Evidentemente, la estructura genética de los pobladores de América, sufrió cambios que han permanecido a través del tiempo y hoy día se pueden estudiar mediante el análisis de los marcadores genéticos del MHC.

Los conquistadores Europeos, llevaron a América, una serie de enfermedades infecciosas como la Viruela, Rubéola, Fiebre Tifoidea, Influenza y Malaria para las cuales el sistema inmune de los nativos no estaba preparado desencadenando epidemias severas que iniciaron el diezmo de la población. Las enfermedades, sumadas a las guerras, desnutrición y fenómenos de desequilibrio social ocasionado por la persecución y aislamiento de grupos fueron otros factores asociados a la muerte masiva de los nativos americanos (1-2). Se calcula que al final de la invasión Europea murieron en el continente Americano alrededor de 80.000.000 de habitantes (3), con el consecuente fenómeno de "Cuello de botella" que ha podido incidir en la aparición de una nueva estructura de la población (1-2-4-5). Además, los nuevos microorganismos sumados a la mezcla entre Europeos

y Nativos, ha podido iniciar la aparición de mecanismos de defensas como serían la generación de nuevos genes del MHC, para responder a nuevas enfermedades que cambiarían en parte la estructura genética nativa.

Por otra parte, el descubrimiento de América, conllevó el arribo de poblaciones provenientes de África para trabajar como esclavos. Las regiones de Malí, Senegal y República Centro Africana parecerían entre otras, haberse constituido en el principal origen de los individuos llevados a trabajar en América. Este hecho, es otro factor agregado al cambio en la composición genética de la población nativa de América, a través del mestizaje. Finalmente, la presencia de diversos grupos étnicos Europeos introdujo genes que contribuyeron en la estructura genética mixta de las poblaciones de América y posteriormente la asociación con la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes tales como la Diabetes tipo I (no observada en poblaciones nativas) .

2.2 LA POBLACION COLOMBIANA

Actualmente, la población Colombiana, está constituida por tres grupos principales de habitantes, las poblaciones Indígenas, organizadas en pequeños grupos de individuos y distribuidas en gran parte del territorio nacional. Estas poblaciones, representarían a los pobladores más antiguos y/o nativos del continente Americano, denominados Amerindios. En segundo lugar, se encuentra la denominada población mestiza (mezcla de Nativo, Europeo y Africano), los cuales representan el mayor porcentaje de la población y expresando diferentes grados

de mestizaje dependiendo de la región, y el tercer grupo es el Afro colombiano (mezcla resultante de descendientes de Africanos con europeos principalmente). Estos grupos, se encuentran establecidos generalmente en las regiones de las costas y región sur occidental en donde han permanecido organizados en pequeños grupos manteniendo sus tradiciones culturales y gran parte de su constitución genética ancestral (6).

El modelo de la población en Colombia, puede ser representativo del modelo existente en la mayoría de los países de centro y sur América. Los grupos nativos, de los cuales, muchos permanecen aislados, manteniendo su constitución genética inicial y, la presencia de grupos Negroides (Afroamericanos) descendientes directos de las poblaciones Africanas que llegaron a América durante el siglo XV, constituyen dos grupos de población característicos en varios países de América.

La población mestiza, representa la mayor parte de la población Colombiana (85%); constituida por mezcla de Caucasoides Europeos, con Amerindios nativos y Negroides, llega a conformar hasta un 85 % del total de la población. Las características fenotípicas, son una mezcla variada de los caracteres propios de cada una de las poblaciones y de igual manera, las patologías encontradas en ella, están influenciadas por elementos genéticos propios de las poblaciones originarias. Algunas enfermedades como la Diabetes Mellitus, la Fibrosis Quística entre otras, que son propias de poblaciones Caucasoides principalmente,

alcanzan tener un impacto notable en la morbimortalidad de este grupo poblacional. Los grupos mestizos, se encuentran distribuidos en todo el territorio nacional, guardando una constitución fenotípica homogénea (7).

Las poblaciones Indígenas, conforman otro grupo étnico que puede representar hasta un 10 % del total de la población Colombiana. Estas poblaciones nativas, son los representantes actuales de los primeros pobladores de América. Se calculan alrededor de 80 grupos diferentes de indígenas pertenecientes a diferentes troncos lingüísticos. Un alto porcentaje de los grupos indígenas, se encuentra ubicado en las regiones del sur y sur este del país, especialmente en las regiones del Amazonas y región de los Llanos Orientales. Igualmente, en la región de la Sierra Nevada de Santamarta, se encuentran ubicados algunos de los grupos más representativos de esta población (Arhuacos, Wayu y Kogi) (8,4).

Los grupos Afroamericanos, en este caso Afrocolombianos, conforman el tercer tipo de grupo étnico presente en Colombia (5-10% de la población). Estos grupos, son descendientes directos de aquellos pobladores Africanos que llegaron a América en la época colonial a trabajar en la minería, agricultura y se ubicaron en el sur del país, como también en las costas atlántica y pacífica. Los grupos Afrocolombianos, presentan un fenotipo mulato y son mezcla de Europeo y Africano. Las poblaciones Afrocolombianas, han permanecido mucho tiempo aisladas en los denominados "Palenques", lo que ha permitido y ha mantenido su carga genética (7,9,16).

2.3 ESTUDIO DEL SISTEMA HLA EN LAS POBLACIONES AMERINDIAS

Diferentes estudios HLA en Amerindios, han mostrado la peculiaridad de este sistema génico en estas poblaciones. Al mismo tiempo, estos análisis permiten inferir las presiones evolutivas que han influido en su evolución y polimorfismo así como también, las posibles rutas migratorias que han dado origen al poblamiento inicial de América y las posibles migraciones internas subsecuentes que han contribuido a la constitución genética de la población Americana (2,4, 10).

2.4 EVOLUCIÓN Y Aparición DE NUEVOS ALELOS HLA EN AMERINDIOS

El estudio de los genes HLA en las poblaciones Amerindias, ha mostrado una característica importante relacionada con la generación de un número importante de nuevos alelos especialmente en el locus HLA-B. Sin embargo, este fenómeno ha sido más relevante en las poblaciones de centro y sur América ya que en Norteamérica, el número de nuevos alelos descritos puede ser menor de 5 alelos comparado con un número aproximado de 60 nuevos alelos descritos en las primeras. Una de las explicaciones relacionada a esta diferencia, es la exposición de los *Paleoindians* a patógenos nuevos presentes en la zona intertropical de sur América, los cuales eran totalmente desconocidos por los inmigrantes provenientes de las zonas frías de Siberia y nordeste de Asia (2). La presencia de nuevos patógenos, ha podido ejercer una presión selectiva que favorecería la generación de nuevos alelos como un mecanismo de adaptación. El locus HLA-B, ha presentado una evolución más rápida con la generación de un mayor número

de nuevos alelos comparados a los generados por los loci HLA-A y HLA-C. Este fenómeno se ha relacionado con una evolución más rápida por parte del locus HLA-B posiblemente relacionada a mecanismos funcionales (11).

No obstante, si se parte de la base que las tasas de evolución fueran similares en el resto de los locus HLA, habría que deducir que las nuevas variantes en los locus HLA-A, HLA-C y HLA-DRB1 no presentan una frecuencia visible o se han perdido por deriva génica (2).

La generación de nuevos alelos HLA de clase I, en los grupos Amerindios, está asociada en un alto porcentaje a mecanismos de conversión génica y puede incluir alelos del mismo locus (frecuente) y/o alelos de diferentes loci (menos frecuente) (12,13). El análisis comparativo de las secuencias de ADN, de los nuevos alelos permite deducir los posibles alelos donantes y receptores que han intervenido en la generación del mismo. Por otra parte, en la mayoría de los casos, el exón comprometido es el exón 3 (dominio (X2) y los fragmentos de recombinación son generalmente menores de 100 nucleótidos. Además, los eventos de "mutación puntual", pueden estar asociados también a la generación de nuevos alelos HLA (14). Finalmente, otro mecanismo asociado a este fenómeno, puede ser la recombinación y/o formación de verdaderos genes híbridos que comprometen haplotipos Amerindios / Caucasoide - Negroide presentes en las poblaciones mestizas de los países Iberoamericanos. Este último fenómeno, podría estar asociado a la presencia de mecanismos de conversión génica en búsqueda de

polimorfismos productivos que aumenten la capacidad de respuesta contra patógenos desconocidos que han podido llegar a América mediante la llegada de grupos de poblaciones Europeas y Africanas después del descubrimiento del continente Americano.

2.5 HLA EN AFROAMERICANOS DEL NORTE Y SUR AMERICA

El análisis comparativo de las diferentes poblaciones Negroides, mediante la construcción de dendrogramas, análisis de correspondencia y cálculo de las distancias gen éticas, muestran una estrecha relación entre los grupos Afroamericanos. Igualmente, las distancias gen éticas mantienen una estrecha relación entre Negroides, seguidos por Mediterráneos norte Africanos y Europeos. Más distante se ubican, los Amerindios, lo que indica una relación genética menor.

Los estudios de frecuencias alélicas, desequilibrios de ligamiento y haplotipos, demuestran un mínimo flujo génico de las poblaciones indígenas hacia Afrocolombianos.

El estudio comparativo, utilizando sólo el análisis de HLA-DRBI, se observa la relación existente entre los Afrocolombianos y otras poblaciones negroides de Colombia, Norteamérica y Africa. En este análisis se incluyen Afroamericanos de Nueva York y de la isla de Bioko en Guinea Ecuatorial, estos trabajos, muestran la relación entre once grupos Negroides (cuatro de diferentes regiones de Colombia) (15,16). Una relación cercana entre Afrocolombianos, negroides del Chocó y Bubi,

puede indicar un origen común, mientras que los grupos del Cauca y Providencia, posiblemente procedan de regiones diferentes en África. Las distancias genéticas cercanas entre Afrocolombianos, Afroamericanos de Nueva York, Senegaleses y Negroides de Norteamérica, demuestra su relación genética directa.

2.6. CARACTERIZACION DE GENES MHC EN GRUPOS AFROAMERICANOS

La caracterización de los genes HLA en los grupos Afroamericanos, ha demostrado una elevada diversidad alélica HLA y asociación entre alelos HLA clase I y II no encontradas en otros grupos étnicos. Estas características, se han relacionado en primera instancia, con un mestizaje genético entre grupos Africanos ancestrales y en segunda medida al mestizaje más reciente con poblaciones Caucásicas y Americanas (15-20).

Los primeros pobladores de Norte América provenían del Norte de Siberia. Esto fue hace 10.000-40.000 años, cuando el Estrecho de Bering se convirtió en puerta de entrada. Tres distintos movimientos de emigración fueron necesarios para completar la colonización precolombina de Norte y Sur América. Las poblaciones modernas de Amerindios tienen una restricción en el número de alelos HLA Clase I y II, careciendo de muchos de los antígenos encontrados en otra parte del mundo (21).

Los alelos de clase I con restricción geográfica o étnica son los más idóneos para representar los recientes genes evolutivos. Consistente con esta hipótesis es la observación de que tales alelos pueden casi siempre estar relacionados a un alelo

de distribución diseminada, por un evento mutacional único. Además estos eventos generalmente involucran pequeños grupos de substituciones compartidas. Ejemplo, el alelo A*4301, que es exclusivo del Sur de Africa, difiere del alelo A*2601 por una substitución de un a.a. en la posición 62 y 63. A nivel de estas posiciones el A*4301 es idéntico al alelo A*2901, con quien el alelo A*4301 presenta reacción cruzada por serología. Las tribus indígenas de Sur América han sido inesperadamente una rica fuente de éstos alelos. Casi todos los alelos HLA-B estudiados hasta hoy muestran nuevas variantes que difieren del alelo común por un pequeño grupo de substituciones alélicas (22, 23).

La historia del continente Africano, ha indicado que poblaciones Negroides asentadas en el Golfo de Guinea, tuvieron una larga expansión a través de las regiones de Africa central y Africa sub-Sahariana estableciéndose finalmente en el sur Africano desde hace 3000 años aproximadamente (24). La mayoría de estas poblaciones expandidas pertenecientes a la lengua 8antú (Familia Niger-Congo), tomaron el área sub-Sahariana y eliminaron a la gran mayoría de tribus existentes en estas regiones con excepción de los grupos San (Bushman) y Khoisan (Hottentots) que fueron reducidos al cono sur del continente Africano (24, 25).

Actualmente, varios alelos HLA-A36, A74, A68, B53 y haplotipos como A68- B15, DRB1*0804-DQB1*0301 presentes en poblaciones Africanas Nuba, Bubi y Zulu (20, 26) son encontrados en los grupos negroides de sur y norte América. Estos hallazgos, serían el resultado de la influencia genética de los grupos Africanos del Oeste, que se expandieron a gran parte del continente y, al origen Oeste Africano

de las poblaciones negroides que fueron trasladadas a América durante el siglo XV (27).

Sin embargo, alelos comunes en Afroamericanos como HLA-A 43 y HLA-B42 y B45 presentes en el Oeste Africano, en Bubi, Zulu y Senegaleses, no están presentes en Afrocolombianos, lo cuales se han podido perder por deriva génica y/o durante eventos de recombinación entre genes HLA clase I y II que originen nuevos haplotipos extendidos. (28)

Las poblaciones Africanas llevadas a América, han vivido y trabajado en contacto con los nativos durante cinco siglos. No obstante, el flujo genético de Amerindios hacia la población Negroide es bajo. Existe una frecuencia baja de alelos HLA Amerindios en las poblaciones Afroamericanas (15 – 17, 19).

2.7 REFERENCIAS

1. Parham P, Arnett K, Adams E. Episodic evolution and turnover of HLA-B in the indigenous human populations of the Americans. *Tissue Antigens* 50: 219-232, 1997.
2. Cadavid L & Watkins D. Heirs of the jaguar and the anaconda: HLA, conquest and disease in the indigenous populations of the Americans. *Tissue Antigens* 50: 209-218, 1997.
3. Dobbind F. Disease transfer contact. *Annu Rev Anthropol* 22: 273-291, 1993
4. Petzl-Erler M, Gorodezky C, Layrisse Z. Anthropology report for Region Latin America: Amerindian and admixed populations. In: Charron D, ed. Genetic diversity of HLA. Functional ad medical implications. Vol. 1 Paris: EDK. 337-345, 1997.
5. Arnaiz-Villena A, Vargas-Alarcón G, Granados J, Gómez-Casado E, Longás J, Gonzalez-Hevilla M, Martinez-Laso J. HLA genes in Mexico Mazarecans, the peopling of the Americans and the uniqueness of Amerindians. *Tissue Antigens* 56:405-416, 2000
6. Arango R & Sánchez E. Los pueblos Indígenas de Colombia. (Guía etnográfica

de Colombia para actividades de Programa NUD y DNP, Bogotá. 1998.

7. Trachtenberg EA, Erlich HA, Hollenbach J, Keyeux G, Bernal J, Klitz W. HLA class II variation and linkage disequilibrium in nine Amerindian and three American populations from Colombia. Results of Expedición Humana. In: Charron Dominique ed. HLA Genetic diversity of HLA functional and Medical Implication. Paris: EDK; 1997; Vol. 2 .p.200-202.

8. Yunis JJ, Yunis EJ, Yunis E. Genetic relationship of the Guambino, Paez, and Ingano Amerindians of southwest Colombia using major histocompatibility complex class II haplotypes and blood groups. Hum Immunol. 62(9):970, 2001.

9. Cuellar-ambrosi F, Mondragon M, Figueroa M, Ruiz Linares A. SICKLE CELL anemia and beta-globin gene cluster haplotypes in Colombia. Hemoglobin 24: 221-225,2000.

10. Arnaiz-Villena a, Vargas Alarcon G, Granados J, Gomez Casado E, Longas J, Gonzales Hevilla M, Zuñiga J, Salgado N, Hernandez Pacheco G, Guillen J, Martinez Laso. HLA genes in Mexican Mazatecans, the peopling of the Americas and the uniqueness of a Amerindians. Tissue Antigens. 56:403-416, 2000.

11. Watkins D, McAdam S, Liu X. New recombinant HLA-B in a tribe of South American Amerindians indicate rapid evolution of MHC class I loci. Nature 357:

329-333, 1992.

12. Barber L, Percival L, Valiente N. The inter-locus recombinant HLA-B*4601 has high selectivity in peptide binding and functions characteristic of HLA-C J Exp Med 148:735-740, 1996

13. Fernandez-Viña M, Lazaro A, Marcos C, Stantny P. Dissimilar evolution of B-locus compared to A-locus and class II loci of the HLA region in South American Indian tribes. Tissue Antigens 50: 233-250, 1997.

14. Gómez-Casado E, Martínez-Laso J, González-Hevilla M, Longás J, Rubio I, Silvera-Redondo C, García-Gómez A, Lowy E, Arnaiz-Villena A. A novel HLA-A*6816 allele possibly generated by a point mutation in a Chilean from Punta Arenas (Magellan Strait). Immunogenetics 51: 257-260, 2000.

15. Just J, King M, Thomson G, Klitz W. African-American HLA class II allele and haplotype diversity. Tissue Antigens 49:547-555, 1997.

16. Trachtenberg E, Keyeux G, Bernal J, Noble J, Erlich H. Results of Expedition Humana II. Analysis of HLA class II alleles in three African American populations from Colombia using the PCR/SSOP: identification of a novel DQB1*02(*0203) allele. Tissue Antigens 48: 192-198, 1996.

17. Caraballo L, Marrugo C, Erlich H, Pastorizo E. HLA alleles in the population

of Cartagena (Colombia). *Tissue Antigens* 39: 128-133, 1992.

18. Stastny P & Kalil J. HLA in North American and South American negroids. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T, eds. *HLA 1991 Vol 1*. Oxford: Oxford University Press, 638-640, 1992.

19. Motomi M, Beatty P, Milford E. HLA gene and haplotype frequencies in the North American population. *The National Marrow Donor Program Registry. Transplantation* 64: 1017-1027, 1997.

20. Clayton J & Lonjou C. Allele and haplotype frequencies for HLA Loci in various ethnic group. In: Charron D, ed. *Genetic diversity of HLA: Functional and medical implications*. Vol. 1 Paris: EDK 665-820, 1997.

21. Watkins D.I., McAdams S.N., Liu X., Strang C.R., Mildford E.L., Evine C.G. et al. *Nature*. 357: 329, 1992.

22. Martell R.W., Du Toit E.D., Joysey V., Doran T.J., Cross D. May R. *Tissue Antigens*. 33: 41, 1989

23. Belich M.P., Madrigal J.A., Hildebrand IL W.H., Zemmour J., Williams R.C., Luz R., Petzl-Erler M.L., and Parham P. *Nature*. 357: 326, 1992.

24. McEvedy C & Jones R. *Atlas of World Population History*. Harmondsworth

Penguin Books Ltda 99, London 1978.

25. Arnaiz-Villena A, Benmanar D, Alvarez M, Díaz-Campo N, Varela P, Gómez-Casado E, Martínez -Lazo J, HLA allele and haplotype frequencies in Algerians. Relatedness to Spaniards and Basques. *Hum Immunol* 43: 259-268, 1995

26. Imanishi T, Akaza T, Kimura A, Tokunaga K, Gojorobi T. Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T, eds. *HLA*. 1991. Vol 1 Oxford: University Press: 1065-1220, 1992.

27. Gutiérrez I. *Historia del Negro en Colombia Nueva América* Bogotá, 1986.

28. Blank M, Blank A, King S, Sonoda S. Distribution of HLA alleles and haploypes of Colombian and Jamaican black population. *Tissue Antigens* 45: 111-116, 1995.

3. APLICACIONES DIAGNOSTICAS DEL MHC

3.1 GENERALIDADES

Cada día el desarrollo tecnológico avanza de una manera extraordinaria, ayudando a esclarecer y/ o ampliar muchos interrogantes que existen en diferentes áreas del conocimiento. Dentro de este desarrollo, una nueva metodología de alta sensibilidad y eficiencia, permite detectar el microquimerismo a un nivel genómico, pudiendo así identificar la coexistencia de células genéticamente diferentes en un individuo, después, de un trasplante ya sea de medula ósea u órganos sólidos.

El microquimerismo definido como la coexistencia de células genéticamente diferente en un individuo crea importancia en el contexto de los fenómenos de tolerancia de trasplante de órganos(1). La correlación de estos quimerismos después de trasplante de medula ósea fue demostrado con el modelo murino (2) el cual fue soportado posteriormente por otras investigaciones.(3-4)

Hay varios grupos de investigadores desarrollando actualmente varios protocolos , entre otros Startz(5), quienes apoyan la hipótesis en la cual una infusión de células provenientes de un donante de medula ósea puede generar un microquimerismo y mejorar la supervivencia del alo-injerto a través de mecanismos de tolerancia inmunológica. Se considera que una minuciosa y eficaz evaluación del microquimerismo, es importante no solo para detectar su presencia para determinar los niveles mínimos de microquimerismo con el propósito de

relacionarlos con la supervivencia del injerto.

Actualmente, el microquimerismo es detectado utilizando una gama de métodos analíticos basados en el PCR con P32(6-7) y la citometria de flujo pero estos solo dan un umbral de detección de un 0.5% (8). El PCR en tiempo real ha sido comparado con la cuantificación por citometria de flujo de células plasmáticas provenientes de mieloma(9) encontrándose que el PCR en tiempo real presenta una gran sensibilidad, una alta especificidad y una reproducibilidad de la cuantificación de las células del mieloma. (10)

En el instituto de investigación de Diabetes de la Universidad de Miami, nosotros desarrollamos un método de detección de este quimerismo a través de la tipificación de los antígenos de leucocitos Humano, HLA, utilizando el nuevo sistema de ciclador *LIGH CYCLER* equipo muy sensible que responde con velocidad y alta sensibilidad a los cambios de temperatura. Se logró así en aproximadamente una hora, hacer la detección, identificación y cuantificación del producto amplificado. Este método se propone como el de escogencia para el análisis cuantitativo y cualitativo de ácidos nucleicos. (11-12)

Para el desarrollo de esta metodología realizamos una simulación experimental con dos diseños, el primero consistía en realizar In Vitro, quimerismos celulares. Tomamos líneas celulares establecidas y transformadas por el virus de Epstein Barr a diferentes concentraciones entre las células de un posible donante y células

de un posible receptor.

El otro diseño experimental consistió en realizar los quimerismos In Vitro con diferentes concentraciones a partir de ADN, todo esto con el objeto de encontrar los niveles mínimos de detección de un quimerismo. En esta estandarización utilizamos como patrón de identificación para el receptor el alelo HLA DQB1*0602 y el DQB1*0201 para el donante.

El producto amplificado a estudiar de 205 pb fue del segundo exón del DQB1*0201 utilizando iniciadores de secuencia específica diseñadas por Olerup y col (12). La especificidad de estos iniciadores fue confirmada por la amplificación negativa del DNA template del receptor DQB1*0602. Las reacciones fueron estandarizadas a las siguientes condiciones: 3 mM MgCl₂, 0.5 μM de cada iniciador y una mezcla de dinucleótidos que contenían un marcador denominado SYBR Green I, marcador de doble cadena de ADN que se vuelve fluorescente solo cuando se une a la doble cadena de ADN del template a estudiar pudiéndose así ser utilizada para el monitoreo directo del producto amplificado en cada ciclo.

Realizábamos una preincubación de 5 minutos con el anticuerpo Taq Start para reducir la formación de primer dimers. La programación de la amplificación fue de: Un ciclo de 95 °C para la desnaturalización y 50 ciclos de 4 etapas que consistían en:

Un una desnaturalización de 2 minutos a 95°C

Un anealing de 20 segundos a 68C

Una extensión de 30 segundos a 72C

Con una ultima etapa de fluorescencia de 88C por 1seg

Para esta simulación experimental de quimerismo y reproductividad de datos se realizaron para cada dilución tripletas que se repetían 4 veces dando un total aproximado de 500 experimentos.

Con el desarrollo de este método el cual combina la PCR en tiempo real con SSP-PCR, podemos detectar y cuantificar niveles bajos de microquimerismo alogénicos detectando el alelo específico HLA del donante extraído del un DNA de un receptor.

La primera etapa del tiempo real de la amplificación del PCR consistió en calcular la temperatura de fusión del template blanco a estudiar. LA curva de fusión que observamos es el resultado del análisis de la temperatura de fusión del producto amplificado.

El PCR-SSP en tiempo real posee una alta sensibilidad por lo que nos da una reproducibilidad de niveles cuantitativos de microquimerismo hasta de un 0.1%. Permittiéndonos evaluar bajas concentraciones de DNA proveniente de células de un donante en un receptor a través de la determinación de marcadores HLA. Dando así unas grandes ventajas sobre las otras metodologías existentes.

3.2 REFERENCIAS

1. Liégeois, A., Gaillard, M.C., Ouvre, E., Lewin, D. Microchimerism in pregnant mice. *Transplant. Proc.* XIII, 1250-1252. 1981.
2. Fontes P, Rao A, Demetris AJ et al. Augmentation with bone marrow of donor migration for kidney, liver, heart, and pancreas islet transplantation. *Lancet* 1994; 344: 151.
3. Rudert WA, Kocova M, Rao AS, Trucco M. Fine quantitation by competitive PCR of circulating donor cells in posttransplant chimeric recipients. *Transplantation* 1994; 58:964.
4. Qin, S., Cobbold S., Benjamin, R., Waldman, H. Induction of classical transplantation. *Transplantation*. 58:964-965. 1989.
5. Starzl T, Demetris AJ, Trucco M, Murase N, Ricordi C, Ildstad S, Ramos H, Todo S, Tzakis A, Fung JJ, Nalesnik M, Zeevi A, Rudert WA, Kocova M: Migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology*: 17:1127-1152, 1993.
6. McDaniel O, Naftilan J, Hulvey K, Shaneyfelt S, Lemons J, Lagoo-Deenadayalan S, Hudson S, Diethelm A, and Barber W. Peripheral Blood Chimerism in Renal Allograft Recipients Transfused With Donor Bone Marrow. *Transplantation* 57:852-856, 1994.

7. McDaniel DO, Naftilan J, Barber WH. Limiting detection of an amplification signal for HLA-D region and VNTR genes by 32P-PCR. *Biotechniques* 15:140; 1993
8. Garcia-Morales R, Esquenazi V, Zucker K, Gomez C, Fuller L, Carreño M, Cirocco R, Alamo A, Karatzas T, Burke III G, Ciancio G, Temple D, Fernandez H, Ricordi C, Tzakis A, and Miller J. An assessment of the effects of cadaver donor bone marrow on kidney allograft recipient blood cell chimerism by a novel technique combining PCR and flow cytometry. *Transplantation* 62:1149-1160, 1996.
9. Wilhelm J, Hahn M., Pingoud A. Influence of DNA target melting behavior on REAL-TIME PCR quantification. *Clin Chem.* Nov ;46(11):1738 - 43. 2000
10. Rasmussen T, Poulsen Ts., Honore L., Johnsen HE. Quantification of minimal residual disease in multiple myeloma using an Allele-Specific REAL-TIME PCR Assay. *Exp. Hematol.* Sep; 28(9) : 1039 - 45. 2000
11. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, and Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome. Res.* 6: 986-994. 1996.
12. Olerup O, Aldener A, Fogdell A: HLA-DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hrs. *Tissue Antigens* 41:119-134, 1993

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar marcadores genéticos del MHC y asociarlos con los diferentes subgrupos clínicos de la ARJ en niños mestizos colombianos provenientes de dos zonas geográficas del país: Santa Fe de Bogotá y Medellín.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Encontrar, comparar y asociar la frecuencia de los diferentes alelos y haplotipos genómicos de los antígenos HLA clase I y HLA clase II con los diferentes subgrupos clínicos de ARJ en niños mestizos Colombianos.
- Identificar marcadores genéticos de susceptibilidad o resistencia (genes de la respuesta Inmune) al desarrollo de la ARJ en niños mestizos Colombianos.
- Establecer y asociar combinaciones alélicas del Sistema HLA de los haplotipos genómicos DRB1* / DQβ1* con distintos patrones de comportamiento clínico en niños mestizos Colombianos.

MATERIALES Y METODOS

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1.1 Tipo de estudio

Es un estudio analítico, de corte transversal, en el cual se hace un análisis descriptivo en su componente clínico epidemiológico. El estudio biológico diseñado corresponde a un estudio exvivo e Invitro, en donde el análisis del polimorfismo genético y molecular del sistema HLA y sus genes del MHC, corresponde a un estudio de casos y controles.

5.1.2 Muestra poblacional

5.1.2.1 Selección de la Muestra La muestra en esta investigación esta conformada por 65 niños, pacientes con ARJ, mestizos colombianos en edades comprendidas entre 2 y 16 años de edad, provenientes de la consulta Reumatológica Institucional de las ciudades de Santafé de Bogotá y Medellín. Está conformado por subgrupos de pacientes mestizos de cada ciudad, así mismo por 65 niños clínicamente normales no relacionados familiarmente, de los mismos grupos étnicos y étnicos de cada localidad. Estos últimos son controles sanos, clínicamente normales sin antecedentes de enfermedades autoinmunes y reumáticas, del mismo rango de edades. El estado de salud de cada sujeto control fue dado por los investigadores clínicos a través del interrogatorio y el examen físico general. A cada paciente y control se le tomó muestras biológicas requeridas para el protocolo. Estos sujetos controles tienen las mismas características del ecosistema de cada subgrupo de pacientes. La escogencia de

los pacientes y controles fueron tomados totalmente al azar y se seleccionaron del grupo de individuos, que recibían asistencia médica en cada una de las consultas ambulatorias en sus respectivas ciudades. Esta selección se hizo por Muestreo Aleatorio Sistemático con una fracción de muestreo de 1:5.

5.1.2.2 Fuente de Casos Los pacientes objeto de este estudio, son pacientes institucionales, provenientes de la consulta externa de los hospitales del ISS y Colsubsidio de Santa fe de Bogotá.

5.1.3 Criterios de Inclusión

- Artritis crónica de inicio antes de los 16 años
- Curso de la artritis de más de 6 meses
- Seguimiento por el servicio de reumatología por lo menos 5 meses antes de su ingreso.
- Haber recibido valoración oftalmológica periódica en los últimos 6 meses.
- Deberán haber sido sometidos a un mínimo de dos estudios radiográficos (uno inicial y otro de seguimiento para correlacionar agresividad y progresión radiológica).
- Habérsele realizado los siguientes exámenes: Hemograma, VSG, AAN, RA test.

5.1.4 Criterios de Exclusión

- Diagnóstico no confirmado.
- Tiempo de evolución menor de 6 meses.
- Pacientes que no hayan sido valorados por los servicios de reumatología de las instituciones involucradas en la fuente de casos.
- Que no hayan tenido seguimiento por Oftalmología.
- Que tengan Compromiso de articulaciones sacro ilíacas en pacientes seronegativos para AAN y RA test
- Historia familiar de Psoriasis o Espónimo artropatía.

5.1.5 Recolección de la información

La fuente fue primaria, ya que los datos fueron recolectados directamente de los pacientes, fue tomada por los investigadores clínicos, quienes le llenarán a cada paciente una hoja de Recolección de Información Clínica y de Laboratorio

5.2 MÉTODOS

5.2.1. Extracción de DNA (Metodología de Salting-Out) (1) La Extracción de ácidos nucleicos se realizó a partir de sangre periférica con un sistema al vacío (Venoject, Terumo) que contenían EDTA como anticoagulante.

Procedimiento:

- Centrifugación a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C.

- Separación de la capa de células blancas o Buffy-Coat para transferirlas a un tubo falcon de 15 ml.
- Se adicionó reactivo de lisis de glóbulos Rojos, hasta completar 15 ml se Homogenizó la solución y se centrifugó por 15 minutos a 1500 rpm a 4°C.
- Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 5 ml de lisis de glóbulos rojos, homogenizándolo y centrifugándolo posteriormente a 1500 rpm por 15 minutos.
- El sobrenadante se descarta y se resuspende el botón en 3 ml de buffer lisis de glóbulos Blancos, adicionándole 50 ul de SDS al 10% y 50 ul de Proteinasa K.
- Se incuba a 37°C en agitación constante durante la noche.
- Se adicionó 3 ml de NaCl 5 M, para ser agitado fuertemente por 15 segundos.
- Se centrifuga a 3000 rpm por 25 minutos para obtener un sobrenadante el cual se traspasa en un tubo nuevo.
- La precipitación se realizó agregando igual volumen de etanol frío al 100%., mezclando suavemente la solución hasta obtener el DNA precipitado.
- Se lava el DNA por 3 minutos en etanol frío al 70%. Y se transfiere el DNA a un tubo eppendorf nuevo para sacar completamente el etanol.
- El DNA se disolvió en TE 1X y dH₂O. Posteriormente se realizaron las lecturas de su concentración en un espectrofotómetro a una dilución de

1/1000, La absorbancia se obtiene a 260 y 280 nm el cual se obtuvieron purezas finales entre 1.6 y 1.8.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

A través de esta metodología obtendremos un número elevado de copias a partir de un segmento de Ácido Nucleico a estudiar, utilizando este método es posible generar millones de copias de un gen específico, el cual se obtienen por medio de una repetición cíclica de tres etapas:

- Desnaturalización: se obtiene separando las cadenas de ADN con temperaturas elevadas, generando un molde de hebra simple.
- Anillamiento: ocurre una hibridación o unión de iniciadores a sus secuencias homologas al ADN sustrato, se unirán solamente a secuencias complementarias bajo condiciones específicas de temperatura.
- Polimerización o elongación: es la extensión en sentido 5´- 3´ del complejo iniciador-sustrato. Esto se obtiene con al utilización de la Taq polimerasa el cual va incorporando los deoxinucleótidos.

5.2.2 Tipaje molecular de alelos HLA clase I y HLA clase II PCR- SSOP(2), INNOLIPA (3), PCR-SSP (4). El locus HLA-B se oligotipificó por la técnica PCR-SSOP, utilizando el protocolo del XIII th. International Histocompatibility Workshop y el locus HLA-A, y HLA-C por PCR-SSP. Para las asignaciones de Los antígenos HLA-clase-II: DRB1* y DQB1* se

utilizaron procedimientos de resolución intermedia con; INNO-LIPA. Posteriormente por PCR-SSP de DYNAL (Ollerup. alta resolución), se realizaron los subtipos y las determinaciones que no fueron posible asignarse.

5.2.3 Tipificación HLA CLASE I: PCR-SSOP (Sondas de Oligonucleótidos de Secuencia Específica). El protocolo de referencia fue diseñado para analizar el extraordinario polimorfismo de los genes.

El método permite obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA en presencia de Taq - polimerasa. Al someter el DNA a temperaturas de ebullición, las cadenas se separan, es decir se desnaturalizan y al enfriarlo entre 54 y 64 grados centígrados se incorporan los iniciadores (secuencias de oligonucleotidos), éstos se alinean en la región adyacente al fragmento que se desea amplificar. Al elevar la temperatura a 72 grados Centígrados que es la optima a la que funciona la polimerasa, junto con el cofactor catiónico Mgcl2 se incorpora cada uno de los desoxinucleotidos para formar la nueva cadena. Así se completa un ciclo de amplificación y en lugar de tener las dos cadenas originales, se tendrán cuatro, las cuales sirven como molde para el siguiente ciclo de amplificación. Al final de este se obtienen ocho cadenas y así después de 30 a 35 ciclos habrá 10/6 copias del fragmento específico de DNA.

Una vez amplificado el ADN se utiliza las sondas de oligonucleotidos de secuencia específica.

Mezclas de Amplificación del ADN

Agua bidestilada estéril	38.3 ul
Buffer 10X	5.0 ul
MgCl ₂ 50 mM	1.5 ul
dNTPs 10mM	1.0 ul
primer 1	0.4 ul
Primer 2	0.4 uL
Taq DNA Polimerasa	0.4 ul
DNA genómico	3.0 ul

Condiciones de los Ciclos

Desnaturalización inicial	95°C	4 minutos	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	30 segundos	33 ciclos
Anealing	70°C	50 segundos	33 ciclos
Extensión	72°C	30 segundos	33 ciclos
Extensión final	72°C	8 minutos	1 ciclo

Control de la amplificación en Electroforesis en gel de Agarosa

El análisis se realiza en agarosa al 1.5% en TBE 0.5X, con Bromuro de etidio 10mg/ml. mezclando 10 ul del producto amplificado con 2 ul de loading buffer. Se coloca como referencia un marcador de peso molecular como el ϕ 174/HaeIII. La confirmación se realiza con la visualización de las bandas de amplificación

DOT BLOT del producto del PCR usando el método de Quimioluminiscencia

Quimioluminiscencia: se basa en la emisión de luz que ocurre en ciertas reacciones químicas debido al paso de una molécula del estado excitado a su estado electrónico en reposo. La hibridación con oligonucleotidos marcados con digoxigenina y el análisis quimioluminiscente de los mismos se utiliza para la tipificación de HLA clase II. En este caso se realiza el marcaje enzimático del oligonucleotido con DIG-dd-UTP en su extremo 3' con la enzima terminal transferasa (TdT) que es capaz de añadir desoxi o didesoxirribonucleotidos al

extremos 3' de un fragmento de DNA de 100-200 pb a un oligonucleotido. La hibridación se realiza con este oligonucleotido marcado y después de los lavados convenientes, este se identifica empleando el fragmento Fab de un anticuerpo anti DIG, que tiene unida fosfatasa alcalina. El anticuerpo se unirá en el sitio donde se haya hibridado el oligonucleotido.

La visualización se lleva a cabo empleando AMPPD que es un sustrato directo para la fosfatasa alcalina, el cual no requiere de otras sustancias para activar la quimioluminiscencia. La enzima desfosforila al AMPPd e inmediatamente este se descompone emitiendo luz a 477nm. La membrana se expone y se obtiene una hibridación positiva, similar a la interpretación que se hace cuando se trabaja con radiactividad.

DOT BLOT

Una vez obtenido el producto del PCR se transfiere a el dot-blot ensamblado con membranas de nylon, previamente se denatura el DNA agregando a 25 ul de ADN amplificado y 250 ul de NaOH 0.4M. La transferencia se realiza con 50 ul de cada DNA desnaturalizado en cada pozo del aparato de DOT BLOT, adicionándole 10 ul de TE Buffer (Tris-HCL 10mM, EDTA 1mM pH 8) a cada pozo para lavar las muestras. Finalmente se Saca la membrana del DOT BLOT se seca y se coloca en el transiluminador por 5 minutos para fijar el ADN.

Hibridización

La hibridación posterior depende de las condiciones de las sondas utilizadas. Se

coloca las membranas en tubos falcón de 50 ml y se adiciona 10 ml de buffer de hibridización incubándolas en el horno por 45 minutos. Posteriormente se le agrega los picomoles de cada sonda y se incuba por segunda vez a 45°C durante 2.5 horas. Se elimina el exceso de sondas realizando un lavado de la membrana con una solución que contenga: SSPE 2X/SDS 0.1% a temperatura ambiente por 10 minutos. Finalmente la astringencia se realiza con en una solución de SSPE 5X / SDS 0.1%, durante 40 minutos.

Detección, exposición y revelado por quimioluminiscencia

- A Las membranas se les adicionan una dilución 1:10000 de conjugado anti-DIG-ALP en buffer 2, conteniendo Blocking reagent al 2% por membrana.
- Incubar por 30 minutos. Y agregar a la membrana buffer 3 que contiene una dilución de 1:100 de CSPD
- Incubar y Realizar la autorradiografía. Colocando las membranas en la bolsa de plástico y exponiéndola a placas de radiográfica para posterior analisis

5.2.4 Tipificación de los locis HLA clase II, exónes DRB1* y DQB1* a través de la amplificación con iniciadores de secuencia específica - PCR-SSP

El método se basa en que un iniciador cuya secuencia es totalmente complementaria a la del DNA molde se aprovecha más eficientemente en la reacción de amplificación del DNA que un primer que tenga una o varias bases desapareadas (mismatches) en un extremo 3´.

Los primers se diseñan y las condiciones se ajustan para que se amplifiquen con

gran sensibilidad y especificidad a alelos o grupos de alelos. La asignación de las especificidades están basadas en la presencia o ausencia del producto amplificado, el cual se visualiza en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio e iluminado con luz ultravioleta.

AMPLIFICACIÓN DE DNA

Se realiza una mezcla con el buffer, dNTP's, MgCl y Taq polimerasa. y 200 ng de DNA se llevan a un ciclador con los siguientes condiciones:

Desnaturalización	95 °C	50 segundos
Alineación	60°C	50 segundos
Extensión	72°C	50 segundos
Ultimo ciclo	72°C	5 minutos

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La identificación de las bandas de amplificaciones se visualizan en un gel de azarosa al 2% de en 0,5 X de buffer TBE, agregándole Bromuro de Ethidium (10 mg/ml). Las muestras (10ul) amplificadas son sembradas con buffer de carga (3 ul) colocando un control de peso molecular (100 pares de base ladder, producto 103.201-100). El analice y las asignaciones de cada uno de los alelos se da de acuerdo al tamaño en pb de cada banda.

AMPLIFICACION Y TIPIFICACION DE LOS LOCI HLA CLASE II

METODOLOGIA: INNO-LIPA-AMPLICOR-INNOGENETICS

Principio del procedimiento

El tipaje de los antígenos HLA por el kit de INNO-LIPA se basa en el principio de hibridación reversa.

El material genético (ADN) biotinilado y amplificado es hibridizado con sondas oligonucleóticas específicas, las cuales han sido inmovilizadas como líneas paralelas sobre una membrana de nitrocelulosa. Después de la hibridización, la streptavidina marcada con fosfatasa alcalina es adicionada y esta se une a los productos híbridos biotinilados formados previamente. La incubación con cromógenos BCIP /NBT da como resultado un precipitado púrpura /marrón.

Para el tipaje de los alelos DRB1 se realiza una tipificación del exón 2 de los alelos del loci DRB1 más asociados (DRB3, DRB4, DRB5) permitiendo así un tipaje completo.

Para realizar el dot blot reversa el sistema contiene 62 oligosondas distribuidas en 2 tiras. Para el tipaje de los alelos DQB1 se realiza una amplificación del exón 2 del locus HLA-DQB1 similar a HLA-DRB1, las tiras contienen 21 oligosondas que permiten tener el tipaje.

Mezcla reacción PCR

- Solución de iniciadores 10 ul
- Buffer de Amplificación 10 ul
- Taq polimerasa 0.5 ul
- ADN genómico 5 ul
- Volumen final 50 ul

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN DE LOS ALELOS HLA-DRB1 Y HLA-DQB1

aplicadas a un termociclador PCR-9.600 (Pelkin Elmer Cetus).

1.- Desnaturalización	95 C , 5 min	
-----------------------	--------------	--

2.- Desnaturalización	95 C , 30 seg	Repetir ciclos
3.- Ubicación de los iniciadores	58 C , 20 seg	paso 2 a 4
4.- Extensión de los iniciadores	72 C , 30 seg	35 veces
5.- Alargamiento	72 C , 10 min	

Control de amplificación

La presencia del producto amplificado puede ser constatada usando PAGE al 6% o en gel de agarosa al 1%. Use 10 μ l del producto amplificado. El producto amplificado debe aparecer como una banda sencilla con una longitud de más o menos 255 pb.

DOT BLOT REVERSO

Se realiza en una bandeja múltiple donde se lleva a cabo los pasos de hibridación, lavados y revelado del color, calentando y enfriando soluciones así como dispensando y aspirando las mismas.

Interpretación de los resultados

Se realiza a través de un sistema de Software de las bandas presentes en cada tira para su interpretación final.

5.3 ANALISIS ESTADISTICO

El presente estudio exploratorio asume incurrir en una probabilidad de error del 0.05 y con una probabilidad de 80%. Se asumió igualmente una correlación del 10% o menos, entre el caso y su control. La relación caso/control fue de 1:1 y el mínimo riesgo relativo será de 3. Por lo anterior se estima que el tamaño de la muestra permitirá el análisis de los datos con diferencias significativas. Las comparaciones de promedios y porcentajes en los subgrupos clínicos que contengan un número de individuos menor de 5, se analizaron mediante el uso

de análisis no paramétricos: test de Mann Whitney y test exacto de Fisher. Para el análisis y la interpretación de los datos se utilizó herramientas estadísticas como frecuencia antigénica y génica, Chi-cuadrado, Coeficiente de correlación, riesgo relativo, OOD Radio, fracción etiológica, y Fracción Preventiva. (5-7).

5.3.1. Frecuencias Antigénica y Génicas El análisis estadístico de cada antígeno en una población dada, permite evaluar si hay diferencias entre las poblaciones estudiadas. Las comparaciones se hacen para cada antígeno HLA entre la población sana y enferma; para ello se calculan los siguientes parámetros:

- Frecuencia Antigénica o Alélica (FA): es la proporción de sujetos del total, que son portadores de un determinado antígeno. Se calcula en porcentajes. La estimación de este parámetro se hace contando el número de veces que un alelo dado aparece en una población, dividiendo por el número total de alelos encontrados en esa misma población y multiplicando por 100.

$$FA = \frac{a}{N} \times 100$$

a = Número de veces que aparece un determinado alelo en la población en estudio.

N = Número total de alelos presentados en la población en estudio.

- Frecuencia Génica: Se calcula a partir de la FA, la cual se toma en números absolutos mediante la fórmula de Haldane que se describe a continuación:

$$FG = 1 - \sqrt{1 - A}$$

A = FA en números absolutos, Ej: si la FA = 12.7% A = 0.127

Se sigue este método estadístico para cada uno de los antígenos HLA- Clase I y II objeto del estudio tanto en controles como en pacientes por grupo étnico, así como en los subgrupos clínicos e inmunológicos polares e intermedios. Posterior al cálculo de la frecuencia de los controles, de los pacientes totales y de los subgrupos de pacientes, se calcula la significancia estadística de las diferencias de las frecuencias de cada antígeno en comparación con la población sana. Se hace el análisis con cada subgrupo de la enfermedad para determinar si hay o no desviación significativa de las frecuencias de un antígeno y establecer si alguno de ellos se asocia positiva o negativamente a la enfermedad. Este análisis se realizó mediante la X^2 corregida de Yates cuya expresión matemática es:

$$X^2 \text{ Yates} = \frac{(ad - bc \times N/2)^2 N}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

a = Número de pacientes positivos para el marcador.
b = Número de pacientes negativos para el marcador.
c = Número de controles positivos para el marcador.
d = Número de controles negativos para el marcador.
N = Número total de sujetos estudiados.

El valor de X^2 ha de buscarse en la tabla de referencia para obtener el valor de la probabilidad (p) teniendo en cuenta los grados de libertad (N-1). El límite de significancia es $p = 0.05$. El valor de p se multiplica por el número total de antígenos HLA estudiados para obtener la probabilidad corregida (pc).

5.3.2. Riesgo relativo Es una medida relativa que indica la intensidad con la que se asocia un antígeno dado, e implica la probabilidad que tiene un individuo sano portador del antígeno, de desarrollar la enfermedad

Este procedimiento estadístico se calcula según el método postulado por Woolf y modificado por Haldane:

$$RR = \frac{ad}{Bc}$$

Los parámetros a, b, c, y d son los mismos que los enumerados para Chi Cuadrado (X^2).

5.3.3. Fracción Etiológica La Fracción Etiológica (FE) indica cuanto de la enfermedad es debida al marcador genético involucrado en la asociación.

Mientras más cerca esté ésta a 1, más depende la susceptibilidad del factor genético. La FE se calcula por el método de Bengtsson y Thomson.

$$FE = \frac{RR-1}{RR} \frac{a}{a+b}$$

Los parámetros a y b son los mismos que los enumerados para Chi Cuadrado (χ^2).

5.3.4. Fracción Preventiva La Fracción Preventiva (FP) es una medida relativa que muestra cuanto de la protección se debe al marcador involucrado, en los caso de la presencia de un antígeno significativamente disminuido.

Mientras el valor se acerca más a 1, más se relaciona el gen en cuestión con la protección. Se calcula de la siguiente forma:

$$FP = \frac{(1-RR) hp}{RR (1-RR) + hp}$$

Donde $hp = \frac{a}{a+b}$

Los parámetros a y b son los mismos que los enumerados para Chi Cuadrado (χ^2).

5.4 REFERENCIAS

1. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16 (3):1215,1988.
2. Middleton et al, Modification of an HLA-B PCR SSOP typing system leading to improved allele determination. *Tissue Antigens* 45: 232-236, 1995.
3. Buyse I, Decorte R, Cuppens H, et al. Rapid DNA typing of class II HLA antigens using the polymerase chain reaction and reverse dot blot hybridization. *Tissue Antigens* 41: 1-14, 1993.
4. Olerup, O, and Zetterquis, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours; An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantations. *Tissue Antigens* 41: 55-56, 1993.
5. Dubey D.P. Quantitative Aspects of HLA IN: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Rose N., Macario DE E.C., Fahey J. L., Frisman H. And Penn G. M. (ed) A, . Soc. Microb. Washington D.C. 4th ed.. P: 867-876, 1993.

6. Bengtsson B.O., Thomson G. Measuring the strengt of associations between HLA antigens and Diseases. *Tissue Antigens*. 17: 356-363, 1981.

7. Zacharay A., A., Statistical Analysis of Genetic Data. *ASHI Quaterly*. 18 (4): 5-6, 1995

RESULTADOS

6. ANTHROPOLOGY REPORT FOR REGION LATIN-AMERICA: AMERINDIAN AND ADMIXED POPULATIONS¹

ML Petz-Erler¹, C Gorodezky², Z Layrisse³, W Kliz⁴, L Fainboim⁵, C Vullo⁶, JG Bodmer⁷, E Egea⁸, C Navarrete⁹, E Infante², C Alaez², A Olivo², H Debaz², N Bautista², G de la Rosa², MN Vasquez², JL Navarro, ML Pujol, C Duran, C Schafhauser¹, FR Faucz¹, M Janzen¹, P Maciog¹, ABW Boldt, PSA Souza¹, CM Probst¹, GF da Silva¹, N Makhatadze³, E Dominguez³, S Montagnani³, M Matos³, A Martinez³, F Herrera³, J Hallenbach⁴, G Thomson⁴, M Pando⁵, L Satz⁵, J Larriba⁵, G Fernandez⁵, SA Pessoa⁶, A Borosky⁶, **G Garavito**⁸, L Angel⁸, J Brown⁹, E Llop¹⁰

¹ Laboratorio de Genética Molecular Humana, Departamento de Genética, Universidad Federal de Paraná, Caixa Postal 19.071, 81531-990 Curitiba, Brazil

² Department of Immunogenetics, Indre & Programa de Biomedicina Molecular, Cinvestav; # Laboratorio Estatal de Salud Pública de Sonora, México

³ Department of Experimental Medicine, IVIC, Caracas, Venezuela

⁴ Department of Integrative Biology, University of California, Berkley, USA

⁵ Laboratorio de Inmunogenética, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

⁶ HLA Laboratory, Hospital Nacional de Clínicas, Cordoba, Argentina

⁷ Tissue Antigen Laboratory, The imperial Cance Research Fund, London, UK

⁸ Immunogenetics and Molecular Biology Laboratory, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia

⁹ Histocompatibility and Immunogenetics. N. London Blood Transfusion Centre, London, UK

¹⁰ Department of Genetics and Cell Biology, University of Chile; Santiago, Chile

⁶Artículo publicado en: Libro EDK. Dominique Charron. Vol.1. HLA. Genetic diversity of HLA functional and medical implication. Anthropology, contribution of HLA. 1997. Pp:337-353.

INTRODUCTION

Fifteen populations were studied by nine laboratories, summing up 1,124 individuals analyzed for at least one HLA locus. Twelve of the populations were Amerindian, and three were Mestizo populations from Mexico, Colombia and Venezuela that have a triracial composition (Amerindian, Spanish and African ancestry). The group of populations is quite heterogeneous, having distinct cultures and belonging to different linguistic groups. They are scattered around a north-south axis of roughly 8,500 km. Some of their features are summarized in Table 1. Table II shows which groups were typed by serology and which by DNA methods, for each locus.

The data have been submitted to central; regional and local analyses. The allele frequencies are depicted on Table III for Class I loci, Table IV for HLA-DRB1, Table V for HLA-DQA1 and HLA-DQB1, Table VI for HLA-DPA1 and HLA-DPB1. Class II haplotypes are shown on Table VII.

RESULTS

Serology

The results of serological analyses are not shown here to avoid redundancy. In general the agreement with molecular typings was excellent. Discrepancies are shown in Table III.

HLA class I typing by ARMS-PCR

The ARMS-PCR kit was used to type Class I alleles of the following groups: Seri Indians from Mexico, Ticuna Indians from Brazil, as well as Mestizos from Venezuela and from Mexico. This method allows low to medium resolution typing. Although it is well known from previous studies that in Amerindians Class I diversity is greater at least for the HLA-B locus (1-3), because of the limited resolution of this method, few alleles were detected for HLA-A as well as for the HLA-B locus in all 3 Indian groups. The Mestizos from Mexico and Venezuela showed more variability than the Amerindians, as expected. The results are shown in Table III. When Ticunas from Brazil and Seris from Mexico are compared, the genetic profile of Class I shows some differences: e.g. A68 is absent in the former, while it is high in Seris. Differences are also seen at the HLA-B locus: The Amerindian B*4801, for instance, is seen in Seris and not in Ticunas. Even at this level of resolution, Seris and Ticunas are quite different and Seris have more Class I diversity for the HLA-A locus but not for HLA-B, although the prevalent alleles differ.

Class II alleles

The following Class II loci and genetic markers were typed by PCR-SSO, HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DPA1, HLA-DPB1, QAP, QBP (results for QAP and QBP can be found in the corresponding reports). As said above for each of these loci a different number of populations was analyzed (see Table II).

As expected, diversity is higher in all the 3 admixed populations as shown for Latin

Americans previously (4), for all loci analyzed. Differences of Colombian, Mexican and Venezuelan Mestizos regarding the subsets of alleles as well as the frequencies of shared alleles are evident by inspection of Table IV. This reveals the different origins and ethnic composition of the populations. Thus, the Amerindian component is highest in the Mexican Mestizos, and the African is highest among the Colombian, as revealed, for instance, by the DRB1 alleles and their frequencies.

HLA Class II alleles typical of Amerindians as known from previous studies (5-8) have been found in all the Amerindian populations analyzed. At the HLA-DRB1 locus, these alleles belong to the DR2, 4, 6, 8 and 9 groups (alleles shown in bold, Table IV), although the different populations may present subsets of this group of alleles. Thus, for instance, in some tribes, such as the Mexican Lacandones, the DRB1*0802 allele disappeared either because of genetic drift or bottleneck effects (9), and a similar phenomenon is observed for the Seris regarding allele DRB1*1602, which is common in all other tribes analyzed.

Group-specific typing of 9 of the populations revealed the DRB1 alleles of each of these groups (Table IV). In 8 of these 9 Amerindian populations, DRB1*0802 was the only DR8 allele; in the Chiriguanos, in addition to DRB1*0802, DRB1*0804 and DRB1*0807 were seen at low frequencies.

When found and subtyped, the DR9 allele was DRB1*0901. Similarly, the DR2

group was quite homogeneous, with only one allele seen in Amerindians: DRB1*1602. Interestingly, this allele is quite frequent in the Mexican Oaxacan tribes (Mixe, Zapateco and Mixteco), as a most Amerindians, but is absent from another Mexican tribe, the Seris, suggesting either genetic drift in the latter or some form of positive selection in the former.

In contrast, especially the DR4 group but also the DR6 group presented higher intra- interpopulational diversity. Typically “Amerindian” alleles are DRB1*0403, *0407 and 0411. DRB1*0403 was shared by six of nine tribes, and DRB1*0404, DRB1*0407. DRB1*0411 by seven of the nine tribes subtyped for the DR4 group. Diversity of the DR4 group was lowest for the Guarani, Kaingang and Seri, which presented only one polymorphic (frequency ≥ 0.01) DR4 allele each: DRB1*0411, DRB1*0404 and DRB1*0407, respectively.

For the DR6 group, four alleles were seen among Amerindians: DRB1*1402, DRB1*1406, DRB1*1413 and DRB1*1401. With the exception of DRB1*1401 (see below), these alleles have been previously found in non-admixed Amerindians. While the Yukpa and the Seri have only DRB*1402, which is known to be widespread among American native (and other) populations, the Chiriguano, Zapoteco, Mixteco and Mixe have both DRB1*1402 and DRB1*1406 at polymorphic frequencies. The Guarani remain the only population thus far analyzed presenting allele DRB1*1413, an allele identified a few years ago in families of the same Guarani population (7,10).

Other DRB1 alleles found in Amerindians, shown on Table IV, are indicative of admixture with non-Amerindians. Examples are DRB1*0401 and DRB1*1401, seen in the Wayuu and/or Mixteco, probably being the result of admixture, a hypothesis sustained by the DQA1 and DQB1 alleles included on the same haplotypes (data not shown). Another example shows the haplotypes including allele DRB1*0701, found in several Seris and also in other tribes.

HLA-DQA1 alleles characteristic of the Amerindians are DQA1*03 (which, when subtyped was DQA1*03011), DQA1*0401 and DQA1*0501. All the nine populations analyzed had these alleles at frequencies > 10% (Table V). The other alleles seen are most probably markers of genetic admixture with non-Amerindians.

Typically "Amerindians" HLA-DQB1 alleles are DQB1*0301, DQB1*0302, DQB1*03032, and DQB1*0402. With the exception of DQB1*03032, they were seen in all the Amerindian samples analyzed (Table V).

The Mexican Mestizos were the only non-Amerindian population typed for HLA-DQA1. For HLA-DQB1, information was available for the Mexicans and the Colombians (Table V) Diversity at both loci and populations again was greater than in Amerindians, and included the set of alleles found in Amerindians, as well as alleles of Caucasoid and Negroid origin.

Three population were studied for HLA-DPA1: The Gurani and Kaingang Indians,

and the Mexican Mestizos (Table VI). In all, DPA1*0201 is also common in all three populations. Alleles DPA1*0202, DPA1*0301 and DPAI*0401 seem to be absent from the Amerindian gene pool. The last was seen at polymorphic frequency in the Mexican population sample. For the sample, the method used did not allow distinction between DPA1*01 and DPA1*0301.

HLA-DPB1 was analyzed in five Amerindian and one Mestizo population (Table VI). Intra and Interpopulation diversity is higher for HLA-DPB1 than for DPAI. Due to the scarcity of previous studies on these loci in Native Americans (5,6), it is difficult to distinguish between alleles supposedly introduced in the Continent by the Paleo-Indians, and those introduced more recently, by Caucasoids and Negroids. However, at least DPB1*0402, DPB1*0401, DPB1*0301, DPB1*0901, DPB1*1401, DPB1*1301, DPB1*2701 and DPB1*0201 are most likely "Paleo-Indian" alleles. Some interesting results are (1) DPB1*0402 is the commonest allele in all populations. In none of the other loci analyzed does one allele so clearly predominate in all populations: (2) DPB1*0901 is seen only in the Kaingang and Guarani: (3) DPB1*2701, previously found in just one Amerindian population, the Eastern Toba (6), and very rare or absent in all populations thus far studied, appears only in the Guarani, at very high frequency (24,7%).

Class II haplotypes

The majority of the DRB-DQA1-DQB1 haplotypes seen in the Amerindian populations correspond to those described previously, with a few interesting

exceptions (Table VII). The DR4 alleles occurs most commonly with DQB1* 0302 but, DRB1*04 alleles were occasionally found associated with DQB1*0402 in the Mixteco, Zapateco, Wayuu and Kollas. Besides DRB1*04-DQB1*0402, DRB1*08-DQB1*0301, and very unusual DRB1*1602-DQB1*0302 were found in Kollas. Some of the haplotypes, *e.g.*, those including allele DRB1*0102 in the Zapoteco and Mixteco, are derived from recent admixture. Formerly, unusual haplotypes and possible gene conversion events for the HLA-DQA1 locus have been shown for the Lacandones from Mexico (9) leading the authors to suggest selection in the absence of high Class II polymorphism. Apart from this and considering the diversity of the promoters (QAP and QBP, see the corresponding report), THE SERIS, Kaingang and Guarani have a very common haplotype bearing DRB1*0802 on which DQB1*0402 is always found in cis with QBP4.1. Further, the promoter variant QBP4.1 is found on some of the DRB1*0407, DQB1*0302 haplotype among the Seris. In Caucasoids and East Asians. QBP4.1 is associated with DQB1*0401. It would be interesting to investigate further the origin of the unusual QBP4.1-DQB1 alleles of these Amerindians. The Amerindian population analyzed for several Class I and II loci are a nice example of how limited polymorphism in the Class II region becomes much more extensive when other loci are taken into account. In fact, among the Seris, for instance, the six Class II haplotypes were observed in 100 individuals, became 19 haplotypes when the HLA-A locus diversity was incorporated.

Genetic admixture of the Amerindian populations

The estimation was based on the HLA allele frequencies of the loci best known in Amerindians. The most informative locus is shown for each population, below. Apart from the customary sampling errors, this may be an underestimate of the degree of admixture (11), since some of the alleles seen in Amerindians are common also in other ethnic groups.

Huilliches	(DRB1)	18.9%
Chiriguanos	(DRB1)	13.0%
Kolla	(DQB1)	2.0%
Guarani	(DQB1)	4.5%
Kaingang	(DQB1)	2.9%
Ticuna	(HLA-B)	9.7%
Wayuu	(DRB1)	15.7%
Yukpa		0%
Seri	(DRB1)	4.5%
Mixe	(DRB1)	2.7%
Zapoteco	(DRB1)	12.9%
Mixteco	(DQB1)	12.3%

CONCLUSION

It is already clear that HLA diversity of the Amerindians is not as low as supposed previously, on the basis of HLA serology and in comparison to urban populations. Intrapopulation diversity is higher in Mestizos, which have alleles of Caucasoid, Amerind, and Negroid origin. Some interesting differences of the pattern of polymorphism of different Class II loci are seen in Amerindians. These populations

present relatively limited intrapopulation diversity for HLA-DRB1, while interpopulation heterogeneity is pronounced in this locus. In comparison to other Class II loci, HLA-DPB1 shows the highest intrapopulation diversity; however one allele, DPB1*0402, probably an ancestral allele, is the commonest in all populations studied. Other loci, like HLA-DQA1, DQB1 and DPA1, show the lowest diversity, at both the intra- and interpopulation levels. No “new” Class II alleles were seen. DRB1*1413, an allele originally described in the Guarani (7,10), remains exclusive to this population. Another distinctive feature of the Guarani is the allele DPB1*2701, present at high frequency. This allele is uncommon in all populations thus far analyzed. Analysis of other Amerindian populations should determine whether it belonged to the ancestral Paleo-Indian gene pool, or if it had been generated *de novo* in the ancestors of the Guarani and the Eastern Toba.

The DRB-DQA1-DQB1 haplotypes seen are those described previously for Amerindians, with a few interesting exceptions. Some of the unusual haplotypes could be explained by recombination event in the Class II region, but their origin deserves further investigation. In face of the sequencing results of a few populations, revealing rapid evolution of the HLA-B, but not of HLA-A and -C in South American Indians (1,2), it would be of interest to perform comprehensive molecular studies of Latin-American populations to examine the diversity of these classical Class I loci. Further studies are needed for the detection of new variants, such as those described in this Workshop for some B35s found in Mexican Mestizos from laboratory MEX-GOR (see AHS#4 report).

REFERENCES

1. Belich MP, Madrigal JA, Hildebrand WH, Zemmour J, William RC, Luz R, Petzl-Erler ML, Parham P. Unusual HLA-B allele in two tribes of Brazilian Indians. *Nature* 1992;357:326-9.
2. Watkins DI, McAdam SN, Liu X, Strang CR, Milford EL, Levine CG, Garber TL, Dogon AL, Lord CI, Ghim SH, Troup GM, Hughes AL, Letvin NL. New recombinant HLA-B alleles in a tribe of South American Amerindians indicate rapid evolution of MHC class loci. *Nature* 1992; 357: 329-33.
3. Satz ML, Fernández-Viña M, Theiler GC, Marcos YC, Lindel N, Capucchio M, Gorodezky C, Fainboim L, Strastny P. Allelic heterogeneity of HLA-B35 subtypes in different populations as assessed by DNA typing. *Tissue Antigens* 1995; 46: 196-203.
4. Gorodezky C, Loon J, Molitemo R, Torres E, Gerbase de Lima M, Pelegrino J, Ferreira E, Alvarez I, Carranza JM, Hernandez O, De La Rosa G, Debaz H, Olivo A, Moreno M, Layrisse Z, Elias M. HLA in some Latin American populations: Mexicans, Brazilians, Venezuelans, and Uruguayans. In: Tsuji K *et al.* eds. *Histocompatibility Testing 1991*. Oxford: Oxford University Press, 1992.
5. Sonoda S, Arce-Gomez B, Satz ML, Gorodezky C, Juarez V, Olivo A, Debaz

A, Ferreira E, Giraudo C, Yashiki S, Kuwayama M, Odashiro K, Miyashita H, Fujiyama C, Fujiyoshi T, Petzl-Erler ML, Lacerda MGB, Theiler G, Augustovski F, Achino B, Fainboim L, Lefevre- Witier PH, Torres EA, Zaninovic V, Sanzon F, Cartier L, Tajima K, Hayami M. Ethnic Report on native Americans in South America and in Mexico. In: Tsuji K *et al.* eds. *Histocompatibility Testing 1991*. Oxford: Oxford University Press, 1992.

6. Cerna M, Falco M, Friedman H, Raimondi E, Maccagno A, Femández-Viña MA, Strastny P. Differences in HLA class II alleles of isolated South- American Indian populations from Brazil and Argentina. *Hum Immunol*1993; 37: 213-20.

7. Petzl-Erler ML, McDevitt HO. Molecular analysis of the HLA-DRB genes in two tribes of Brazilian Indians. *Hum Immunol*1994; 41: 180-4.

8. Layrisse Z, Guedez Y, Dominguez E, Herrera F, Soto M, Balbas O, Matos M, Alfonzo JC, Granados J, Scorza J. Extended HLA haplotypes among the Bari Amerindians in the Perija range. Relationship to other tribes based on four-loci haplotype frequencies. *Hum Immunol*1995; 44: 228-35.

9. Olivo A, Alaez C, Debaz H, Moreno M, Vásquez M, De La Rosa G, Gorodezky C. The influence of the MHC on survival of human isolates. *Genetic Diversity of HLA. Funtional and Medical Implication*. Vol. II. Sevres, France: EDK, 1997.

10. Pando M, Theiler G, Melano R, Petz-Erler ML, Satz ML. A new DR6 allele (DRB1*1413) found in a tribe of Brazilian Indians. *Immunogenetics* 1994;39:377.

11. Petzl-Erler ML, Luz R, Sotomayor VS. The HLA polymorphism of two distinctive South-American Indian tribes: The kaingang and the Guarani. *Tissue Antigens* 1993;41:227-37.

Table I. Populations analyzed

AMERINDIAN N = 12	CODE	LANGUAGE FAMILY	SPECIFIC LANGUAGE	SAMPLE SIZE	POPUL. SIZE	COUNTRY	LABORATORY
SERI	57	HOKANO-HUITLAKA	SERI	101	619	MEXICO	MEX GOR
MIXE	209	MIXE-ZOQUE	MIXE	55	50,000	MEXICO	USA KLI
ZAPOTECO	210	MACRO-MIXTECA	ZAPOTECO	91	250,000	MEXICO	USA KLI
MIXTECO	211	MACRO-MIXTECA	MIXTECO	103	180,000	MEXICO	USA KLI
WAYUU	205	MACRO-ARAWAK	WAYUU	30	6,000	COLOMBIA	COL EGE
TICUNA	212	MACRO-TUCANOAN	TUCUNAN	67	31,000	BRAZIL-COLOMBIA	UKI BOD
YUKPA	185	CARIB	YUKPA	73	4,000	VENEZUELA	VEN LAY
GUARANI	8	TUPI	GUARANI-MBYA	98	400/3,000*	S BRAZIL	BRA PTZ
KAINGANG	9	MACRO-GE	KAINGANG	109	2,600/15,000*	S BRAZIL	BRA PTZ
CHIRIGUANOS	130	TUPI	GUARANI+SPANISH	44	15,000	N ARGENTINA	ARG FAI
KOLLA	198	ANDEAN	KOLLA	61	5,000	ARGENTINA	ARG VUL
HUILICHES	181	ANDEAN	MAPUCHE	40	(30,000)	CHILE	UKI NAV
MESTIZO							
N = 3							
MEXICAN	58	INDO-EUROPEAN	SPANISH	164	70 x 10 ⁶	MEXICO	MEX GOR
COLOMBIAN	207	INDO-EUROPEAN	SPANISH	61	7 x 10 ^{6#}	COLOMBIA	COL EGE
VENEZUELAN	199	INDO-EUROPEAN	SPANISH	27	4 x 10 ⁶	VENEZUELA	VEN LAY

* Population size in the sampled areas/total population of all reservation areas of Southern Brazil.
Colombian Mestizos living in the Caribbean area.

Table II. Populations and loci studied by participating laboratories

COUNTRY	LABORATORY	LAB. CODE	POPULATION NAME	MAP #	SEROLOGY	DNA TYPING
ARGENTINA	L. Fainboim	ARG FAI	Chiriguano	130		DRB1, DQA1, DQB1
	C. Vullo	ARG VUL	Kolla	198		DRB1, DQB1
BRÁZIL	M.L. Petzl-Erler	BRA PTZ	Guarani	8	DR, DQ	DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1, QAP, QBP
			Kaingang	9	DR, DQ	DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1, QAP, QBP
	J. Bodmer	UK1 BOD	Ticuna	212		CLASS I
CHILE	C. Navarrete	UK1 NAV	Huilliches	161		DRB
COLOMBIA	E. Egea	COL EGE	Wayuu	205		DRB1, DQB1
			Mestizos	207		DRB1, DQB1
MEXICO	C. Gorodezky	MEX GOR	Seri	57		CLASS I, DRB1, DQA1, DQB1, QAP, QBP
			Mestizos	58	A, B, C, DR, DQ	CLASS I, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1
	W. Klitz	USA KLI	Mixe	209		DRB1, DQA1, DQB1, DPB1
			Zapoteco	210		DRB1, DQA1, DQB1, DPB1
		Mixteco	211		DRB1, DQA1, DQB1, DPB1	
VENEZUELA	Z. Layrisse	VEN LAY	Yukpa	185	A, B, C, DR, DQ	DRB1, DQA1, DQB1,
			Mestizos	199	A, B, C, DR, DQ	CLASS I, DRB1

Table III. HLA class I allele frequencies

CLASS I ALLELE	AMERINDIAN POPULATIONS		MESTIZO POPULATIONS	
	TICUNA	SERIS	VENEZUELAN	MESTIZO
HLA-A	n = 66	n = 100	n = 25	n = 2
A*01	0	0	0.084	0.07
A*02	0.174	0.535	0.288	0.34
A*03	0.015	0	0.062	0.03
A*11	0	0	0.049	0.03
A*23	0	0.005	0	0.031 (a)
A*24	0.500	0.090	0.126	0.13
A*26	0	0	0.023	0.03
A*28	0	0.045	0	0.043 (a)
A*29	0	0.01	0.067	0.03
A*30	0	0	0.075	0
A*31	0.311	0.170	0.042	0.03
A*32	0	0	0.042	0.03
A*33	0	0	0	0.022 (a)
A*35	0	0	0	0.043 (a)
A*68	0	0.145	0	0.065 (a)
A*89	0	0	0	0.01
A null	0	0	0.163	0.00
HLA-B	n = 67	n = 58	n = 23	n = 2
B*06	0	0	0	0
B*07	0.015	0	0.152	0.04
B*08	0	0	0.130	0
B*14	0	0	0.022	0.06
B*15	0.127	0.060	0.085	0.17
B*15*46	0.015	0	0	0
B*18	0	0	0.067	0.06
B*22	0	0	0	0.00
B*27	0	0.025	0	0.00
B*35	0.104	0.388	0.109	0.11
B*38	0	0	0	0.022 (a)
B*39	0.291 (b)	0	0.022	0.04
B*40	0.254	0.302	0	0.04
B*42	0	0	0.022	0
B*44	0.062	0.017	0.065	0.00
B*47	0	0	0.022	0
B*48	0	0.017	0	0.043 (a)
B*49	0	0	0.030	0.00
B*50	0	0	0.022	0
B*51	0.112 (c)	0.181	0.055	0.20
B*53	0	0.009	0.087	0
B*54	0	0	0.022	0
B*58	0	0	0.043	0
B*78	0	0	0.022	0
B null	0	0	0.023	0.00
HLA-C	n = 66	nt	n = 15	nt
Cw*0101	0.076	nt	0.033	nt
Cw*0201	0	nt	0.067	nt
Cw*0303	0.032	nt	0	0.109 (a,d)
Cw*0304	0.279	nt	0	nt
Cw*04	0.114	nt	0.133	nt
Cw*05	0.063	nt	0.033	nt
Cw*07	0.288	nt	0.482	nt
Cw*08	0.045	nt	0.087	nt
Cw*12	0	nt	0.100	nt
Cw*1501	0.114	nt	0	nt
Cw*16	0	nt	0.033	nt
Cw*17	0	nt	0.033	nt
Cw null	0	nt	0.026	nt

- (a) These results were determined by serology. Frequencies based on serological data are shown based on serological data are shown only when ARMS-PCR resulted in frequency zero, and serology in frequency >0.
- (b) Indistinguishable between B*51 AND b*52.
- (c) Cw*03.
- (d) Nt= not tested.

In bold: alleles previously found in genetically isolated South-American and Mexican Amerindian populations.

Table IV. HLA-DRB1 allele frequencies

DRB1* ALLELE	AMERINDIAN POPULATIONS											MESTIZO POPULATIONS		
	HUILICHES n = 40	CHIRIGUANOS n = 56	KOLLA n = 60	GUARANI n = 32	KANGANG n = 225	WAYU n = 52	YUKPA n = 73	BERI n = 100	MIXE n = 55	ZAPOTECO n = 76	MIXTECO n = 103	COLOMBIAN n = 61	VENEZUELAN n = 26	MEXICAN n = 164
01*	0.05				0.002							0.016		
0101	nt	0.009						0.005				0.041		0.025
0102	nt									0.006	0.019	0.008	0.038	0.055
0103	nt											0.025		
02*	0.088											0.008		
1501	nt					0.060						0.057	0.038	0.061
1502*	nt	0.027										0.008		0.006
15021	nt													0.015
15022	nt													0.003
1503	nt												0.019	0.020
1504	nt													0.063
16*	nt		0.060									0.025		
1601	nt		nt											0.006
1602	nt	0.179	nt	0.402	0.117	0.130	0.105		0.309	0.185	0.185		0.019	0.034
1603	nt		nt								0.005			
03*	0.013											0.016		
0301*	nt											0.057		
03011	nt												0.089	0.030
03012	nt												0.019	
0302	nt												0.019	
0303	nt													0.003
04*	0.275	0.045	0.420									0.180		0
0401	nt	0.013	nt				0.040						0.019	0.003
0402	nt		nt										0.019	0.017
0403	nt	0.018	nt			0.150	0.105		0.038	0.056	0.039		0.019	0.017
0404	nt	0.009	nt		0.280	0.020		0.006	0.054	0.160	0.010			0.037
0405	nt		nt			0.020				0.025	0.005			0.025
0407	nt	0.049	nt			0.173	0.012	0.445	0.162	0.117	0.291		0.077	0.149
0408	nt		nt							0.018			0.058	
0409	nt		nt											0.003
0410	nt		nt						0.009	0.006	0.015		0.038	
0411	nt	0.009	nt	0.219	0.007	0.269	0.616			0.019	0.015		0.019	0.026
0415	nt		nt									0.008		
0417	nt		nt											
11*	0.088				0.023							0.123		0.003
11011	nt							0.005	0.018				0.019	0.024
1102	nt											0.008	0.019	0.006
11041	nt												0.038	0.018
1106	nt												0.058	0.003
12*												0.025		
1201		0.045												0.006
13*	0.025	0.009										0.082		0
1301	nt											0.008	0.038	0.021
1302	nt									0.031	0.005	0.008	0.038	0.020
1303	nt													0.006
1304	nt													0.003
1305	nt													0.006
1308	nt													0.006
1312	nt											0.008		0.003
14*	0.213		0.160		0.009							0.074		
1401	nt		nt			0.040					0.049		0.019	0.012
1402	nt	0.214	nt				0.047	0.132	0.036	0.056	0.049		0.019	0.030
1403	nt		nt										0.025	
1404	nt		nt										0.019	
1406	nt	0.188	nt						0.073	0.056	0.097			0.047
1410	nt		nt											
1413	nt		nt	0.150										
1416	nt		nt											
0701		0.018			0.002			0.035		0.012		0.123	0.089	0.069
08*	0.225		0.170				0.116					0.049		0.010
0801	nt		nt											0.015
0802	nt	0.116	nt	0.176	0.514	0.060		0.373	0.282	0.222	0.214		0.019	0.119
0804	nt	0.018	nt										0.019	
0807	nt	0.009	nt											
0809	nt		nt										0.019	
09*	0.013		0.120											
0901	nt	0.0179	nt		0.007							0.008		0.006
10*	0.013													
1001	nt								0.031	0.005		0.016		0.003
null		0.007	0.070	0.054	0.035	0.038						0.019	0.034	0.026

* The "broads" (e.g., DR4) include only alleles not subtyped.
 In bold: alleles previously found in genetically isolated South-American and Mexican Amerindian populations.
 nt: not tested; empty cells: frequency = zero.

Table V. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 allele frequencies

DQA1 ALLELES	AMERINDIAN POPULATIONS									MESTIZO		
	CHIRIGUANOS n = 64	GUARANI n = 94	KAINGANG n = 106	YUKPA n = 73	SERI n = 101	MIXE n = 66	ZAPOTECO n = 81	MIXTECO n = 103	COLOMBIAN n = 85	MEXICAN n = 166		
0101	0.045	0.005	0.032	0	0.005	0.009	0.050	0.078		0.105		
0102	0.028	0.011	0	0	0	0	0.028	0.034		0.119		
0103	0	0	0	0	0	0	0	0		0.026		
0104	0	0	0	0	0	0	0	0		0		
0201	0.018	0	0	0	0.035	0	0.022	0		0.067		
03*	0.107											
0301		0.298	0.245		0.768	0.450	0.291	0.383	0.398	0.282		
0401	0.130	0.149	0.514		0.113	0.366	0.264	0.217	0.189	0.141		
0801	0.611	0.827	0.206		0.120	0.144	0.436	0.300	0.301	0.246		
0502	0	0.011	0		0	0	0	0		0		
null	0	0	0		0	0	0	0		0.018		
DQB1 ALLELES	CHIRIGUANOS n = 28	KOLLA n = 60	GUARANI n = 77	KAINGANG n = 88	WAYUJ n = 30	YUKPA n = 73	SERI n = 101	MIXE n = 66	ZAPOTECO n = 78	MIXTECO n = 103	COLOMBIAN n = 85	MEXICAN n = 166
02*	0.036			0	0.017	0		0				
0201	0	0.020	0.026	0	0.019	0	0.035	0	0.013	0.005	0.176	0.094
03*	0.018		0.839									
0301	0.689	0.260	0.648	0.204	0.136	0.143	0.149	0.409	0.318	0.284	0.223	0.243
0302	0.107	0.480	0.208	0.215	0.480	0.757	0.448	0.147	0.263	0.343	0.125	0.251
03032	0	0.100	0.045	0.023	0	0	0	0.018	0.083	0.015	0.024	0.015
0304	0.018	0	0	0	0	0	0	0	0.006	0.010	0	0
0401	0	0	0	0	0	0	0	0	0.006	0	0	0
0402	0.143	0.150	0.117	0.529	0.289	0.100	0.366	0.291	0.218	0.235	0.047	0.143
0501	0.054	0	0.006	0.029	0	0	0.005	0.009	0.038	0.029	0.106	0.083
0502	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.010	0.012	0.014
0503*	0	0	0	0	0.017	0	0	0	0.013	0.064	0.047	0.006
05031	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.012
0601	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.012	0.003
0602	0.018	0	0.013	0	0.058	0	0	0	0	0	0.106	0.074
0603	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.047	0.022
0604	0	0	0	0	0	0	0	0	0.006	0	0.059	0.011
06051	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.003
0606	0	0	0	0	0	0	0	0	0.032	0.005	0	0
0608	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.012	0
0609	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.003
null	0.017	0	0	0	0	0	0	0.126	0.004	0	0.004	0.023

The "broads" (e.g., DQB1*03) include only alleles not subtyped. In bold: alleles previously found in genetically isolated South-American and Mexican Amerindian populations.

Table VI. HLA-DPA1 and HLA-DPB1 allele frequencies

DPA1 ALLELES	AMERINDIAN POPULATIONS		MESTIZOS			
	GUARANI n = 96	KAINGANG n = 106	MEXICANS n = 71			
01 (0103)	0.646	0.774				
01 + 0301						0.575
0201	0.349	0.226				0.211
0202	0.005	0				0
0401	0	0				0.085
blank						0.150

DPB1 ALLELES	GUARANI	KAINGANG	MIXE	ZAPOTECO	MIXTECO	MEXICANS
	n = 87	n = 104	n = 55	n = 91	n = 103	n = 159
0101	0.012	0	0	0	0	0
0201	0.006	0.019	0.046	0.022	0.087	0.230
0301	0.012	0.120	0	0.011	0	0.013
0401	0.161	0.053	0.028	0.135	0.010	0.172
0402	0.408	0.577	0.907	0.702	0.752	0.573
0501	0	0	0.009	0.022	0.034	0
0601	0	0	0	0	0	0
0901	0.023	0.173	0	0	0	0
1001	0	0	0	0	0.019	0
1101	0	0	0	0.028	0	0
1301	0	0.029	0	0	0	0
1401	0.126	0.024	0	0.017	0.010	0
1601	0	0.005	0	0	0.005	0
1501	0	0	0	0	0	0.003
1701	0	0	0	0.006	0	0
2001	0	0	0	0	0.029	0
2301	0	0	0	0.017	0.048	0.016
2701	0.247	0	0	0	0	0
3001	0	0	0	0.022	0.005	0
3901	0.006	0	0	0	0	0
4601	0	0	0	0.011	0	0
5101	0	0	0.009	0	0	0
5201	0	0	0	0.006	0	0

In bold: alleles previously found in genetically isolated South-American and Mexican Amerindian populations.

Table VII. DRB1-DQA1-DQB1 haplotypes in Amerindians

DRB1	DQA1	DQB1	POPULATIONS
COMMON HAPLOTYPES			
1602	0501	0301	All but the Seri
0403	03011	0302	Chiriguano, Wayuu, Yukpa, Zapoteco, Mixteco, Mixe
0404	03011	0302	Chiriguano, Kaingang, Wayuu, Seri, Zapoteco, Mixteco
0407	03011	0302	Chiriguano, Wayuu, Yukpa, Seri, Zapoteco, Mixteco, Mixe
0411	03011	0302	Chiriguano, Guarani, Kaingang, Wayuu, Yukpa
1402	0501	0301	Chiriguano, Yukpa, Seri, Zapoteco, Mixteco, Mixe
1406	0501	0301	Chiriguano, Zapoteco, Mixteco, Mixe
1413	0501	0301	Guarani
0802	0401	0402	All populations (f < 0.1 in the Wayuu)
0901	03	03032	Guarani, Kaingang, Chiriguano
UNUSUAL HAPLOTYPES			
0407	03011	0302	QB*4.1 Seri
0407	0301	0303	Zapoteco
0410	0301	0402	Mixteco, Zapoteco
0411	0301	0402	Zapoteco
0411	nt	0402	Wayuu
04	nt	0402	Kolla
08	nt	0301	Kolla
1602	nt	0302	Kolla

Populations analyzed: Chiriguano, Guarani, Kaingang, Wayuu, Yukpa, Seri, Zapoteco, Mixteco, Mixe.

Shown in **bold/italics**: alleles uncommon in the haplotype.

Shown in **bold**: populations presenting frequency > 10% of the haplotype.

Nt: not tested.

7. A NEW HLA-CW ALLELE (CW*0808) FOUND IN A COLOMBIAN MESTIZO INDIVIDUAL POSSIBLY GENERATED BY AN INTRALOCUS/INTERLOCI GENE CONVERSION ²

Carlos Silvera-Redondo , Eduardo Gomez-Casado, Jorge Martinez-Laso - Eduardo Egea - Gloria Garavito, Pilar Varela - Arantza Pacho, Juan Moscoso Isabel Rubio, Antonio Arnaiz-Villena

The contribution by C. Silvera-Redondo, E. Gomez-Casado.

and Jorge Martinez-Laso is equal and the order of authorship is arbitrary

Departamento de Inmunología y Biología Molecular, Hospital 12 De Octubre, Universidad Complutense, Carretera Andalucía, 28041 Madrid. Spain E-mail: aarnaiz@evcmx.sim. vcm.es Phone: +34-91-3908315 Fax: +34-91-3908399

E. Egea G. Garavito .

Immunology and Molecular Biology, Division of Health, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia

⁷ Articulo publicado en la Revista Immunogenetics (2000) 51:1053-1057.

Key words Amerindians, Colombian populations, Gene conversion, *HLA-Cw8*, Intralocus, Interloci, Recombination.

The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the GenBank nucleotide sequence database and have been assigned the accession numbers: *Cw*0808*, exon 2, intron 2 and exon 3, AF245437; *Cw*0802*, exon 2, intron 2 and exon 3, AF250557. The name *Cw*0808* has been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in March 2000. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature report, names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.

Seven different *HLA-Cw*08* (*Cw*0801*-**0807*) alleles have been described to date (Bodmer et al. 1999; Marsh 2000). *HLA-Cw*0801* and *Cw*0803* are mainly present in American Indians and Orientals (Belich et al. 1992; Parham et al. 1989); *Cw*0802* shows a Caucasoid distribution (Parham et al. 1989); *Cw*0804* was found in Negroid and Hispanic individuals (Turner et al. 1998); *Cw*0806* was described in American Indians, and *Cw*0805* and *Cw*0807* have an undetermined origin (<http://www.anthonynolan.com/HIG>). The frequency of *Cw*08* is still poorly studied among populations, but it has been reported in 4.5% of Ticuna Indians from Brazil-Colombia, and 8.7% of the Venezuelan-Mestizo population (Petzl-Erler et al. 1997). In the present study, a new *Cw*08* subtype is described in a 40-year-old healthy Colombian Mestizo born in Barranquilla City (north coast of Colombia;

Fig. 1). Nowadays, Colombia has a complex ethnicity, which is composed of mostly Mestizo groups and (to a lesser degree) of Amerindian and Mulatto groups. Most first Amerindian inhabitants were Chibchan and smaller groups of Achagua, Aymara, Arawak, Caribe, Quechua, Tupi-Guarani and Yaramangui also existed. A greater prevalence of the Mulatto groups (African American) has been found in both the Atlantic and Pacific coasts, and have mainly contributed to the genetic background of the coastal people (Fig. 1; Arango and Sánchez 1988; Gutiérrez 1986). The individual carrying the novel *Cw*0808* allele showed the following HLA DNA-typing: *A *0222, A *2902/Cw*0808, Cw*0802/B*1510, B*4801/DRBI*0407, DRB1*1102/ DQB1*0302, DQB1*0301*. Typing of his two children determined the following haplotypes: *A *0222-Cw*0808- B*4801-DRB1*0407-DQBI*0302* and *A*2902- Cw*0802-B*1510-DRB1*1102-DQB1*0301*.

Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes using standard methods. To obtain the complete exon 2, intron 2, and exon 3 sequence, a 5' HLA-C-specific primer was newly designed in our laboratory; it corresponds to the intron 1 5' end (5I1c: CGAGGGGCCCGCCCGGGAA). The 3' HLA-C-specific primer is located at intron 3 (3BCI₃: AGCGCTGATCCCATTTC; Gomez-Casado et al. 1997). Polymerase (PCR) products from two different amplifications were purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany); the resulting fragments were inserted in the PCR 2.1 vector (Invitrogen, The Netherlands). Ligation, transformation, and identification of recombinant colonies were carried out following the manufacturer's recommendations. Double-stranded DNA templates

were elongated using Sanger's method with dye-labelled dideoxy terminator chemistry. To avoid mistakes in the *Taq* polymerase amplification process, at least ten clones for each PCR were sequenced in a Perkin Elmer (Foster City, Calif.) 373A automated DNA sequencer, as described in detail by Arnaiz- Villena and co-workers (1992).

The new *HLA-Cw*0808* allele shows an identical exon 2 to that of the *Cw*0801* allele, whereas exon 3 bears a one-base difference at codon 97 (AGG→AGC; Fig. 2). This change results in a nonconservative amino acid substitution at this position (Arg→Ser).

Serine at position 97 is placed on the β sheet at the bottom of the peptide-binding site (Fig. 3), and affects pocket C access by the P9 of the antigenic peptide (Madden et al. 1991). The polarity changes from a positive arginine in *Cw*0801* to a neutral serine in *Cw*0808*; this may induce dramatic changes in the peptide repertoire able to bind to the new *Cw*0808* molecule. Serine instead of arginine at position 97 has been described in another *HLA-C* allele (*Cw*0305*; <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG>) and in some *HLA-B* alleles (Mason and Parham 1998).

The novel *Cw*0808* Amerindian allele could have arisen by an intralocus gene conversion between *Cw*0801* (as a receptor) and *Cw*0305* (as a donor, found also

in Amerindians; <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG>) or an interloci gene conversion between *Cw*0801* (as a receptor) and any of the following *HLA-B* Amerindian alleles: *B*1507* present in Whichi and Toba Indians (Argentina) and also in Navajo (Arizona and New Mexico, USA); *B*3505* found in Brazil (Kaingang and Guarani Indians) and in Argentina (Pilaga and Toba Indians); *B*3903* present in Kuna (Panama), Kaingang (Brazil), Whichi and Toba (Argentina), and Waorani (Ecuador); *B*4009* that is characteristic of Pilaga and Toba Indians (Argentina); *B*3516* and *B*3517* found in Mexican Mestizo (see Fig. 1; Cadavid and Watkins 1997; Vargas-Alarcon et al. 1996a, 1996b). The donor could also have been a non-Amerindian *HLA-B* allele (i.e., Caucasoid, Oriental, or Negroid) which is present in these populations, such as *B*0702*, *B*4002*, *B*4003*, *B*4102*, *B*4201*, or *B*4801* (Cadavid and Watkins 1997; own unpublished results). This mechanism is supported by the fact that the novel *Cw*0808* allele is included in the Amerindian haplotype *A *0222-Cw*0808-B*4801-DRB1*0407-DQB1*0302*.

*HLA-A *0222* was found in Terena Indians (Brazil) (Marcos et al. 1999), whereas *B*4801* and *DRB1*0407* are common alleles in Iberian-American countries from Mexico to Chile (Cadavid and Watkins 1997; own unpublished results). On the other hand, we cannot discount the possibility that *Cw*0808* was generated from *Cw*0801* by a point mutation at the third base of codon 97 (G→C; see Fig. 2). *Cw*0801* and *Cw*0305* intron 2 sequences (not yet described) would be helpful to determine the precise pathway of *Cw*0808* generation. According to our findings and those of others, the generation of most new *HLA* Amerindian alleles may be

explained by gene conversion events when sufficient intronic sequences are available (Gomez-Casado et al. 1999; Madrigal et al. 1993; Vargas-Alarcon et al. 1997). Further studies among Amerindian populations will be helpful to establish the frequency of this new *Cw*0808* allele.

HLA-C shows a lower degree of polymorphism than *HLA-A* and *HLA-B* (Mason and Parham 1998; <http://www.anthonynolan.com/HIG>). This fact may be due to a lack of suitable antisera and/or low cell surface expression (Snary et al. 1977; Zemmour and Parham 1992). However, this new allele described by using a DNA-based methodology for *HLA-C* typing which includes PCR amplification of flanking intronic sequences (see above) may detect more *HLA-C* alleles not only in American Indians but also in other populations; the study of flanking introns may be more helpful and precise for bone marrow and solid organ transplantation and for disease studies.

Finally, the fact that new *HLA* alleles are being detected in Meso and South Americans and that many may have originated by gene conversion events (including *Cw*0808*) (Gomez-Casado et al. 1999; Parham et al. 1995; Vargas-Alarcón et al. 1997), as shown by exon and intron sequencing, suggests that these subtypes have recently been generated from ancestral alleles, possibly by a pathogen-driven polymorphism diversification process to cope with new microbial peptides that appeared abruptly in American Indian populations following 15th-century European invasions and Black slave traffic from Africa. This caused a severe bottleneck, and about 80 million Amerindians died as a result of infections and war

during the 16th century (Dobbins 1993). Mechanisms of new Amerindian (or mixed Amerindian) allele generation (Cada- vid and Watkins 1997) may include the appearance of new Negroid-Caucasoid/Indian hybrid haplotypes and alleles that could cope with the newly imported diseases from the Old World; this could explain the extraordinary frequency of new *HLA* alleles found in present-day Meso and South American populations compared with Indians from the northern part of North America. The latter underwent a colonization mostly driven by families (less European admixture), while Iberian colonists were mainly single men (more European admixture; Crawford 1998; Wilson 1999).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by grants from the Spanish Ministry of Education (PM 57-95 and PM 96-21) and the Madrid Regional Community (06-70-97 and 8.3/14/98). We are grateful to Alberto García for his help with art design work on the computer.

REFERENCES

Arango R, Sánchez E (1988) Los pueblos Indígenas de Colombia (Guía etnográfica de Colombia para actividades de Planeación). Programa NUD y DNP, Bogotá.

Arnaiz-Villena A, Timon M, Corell A, Perez.Aciego P, Marlin- Villa JM, Regueiro JR (1992) Primary immunodeficiency caused by mutations in the gene encoding the CD3- γ subunit of the T-lymphocyte receptor. *N Engl J Med* 327:529-533.

Belich MP, Madrigal JA, Hildebrand WH, Zemmour J, Williams RC, Luz R, Petzl-Erler ML. Parham P (1992) Unusual HLA-B alleles in two tribes of Brazilian Indians. *Nature* 357:326-329.

Bodmer JG, Marsh SG, Alberl ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Hansen JA, Mách B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Stro-minger JL, Svejgaard A, Terasaki PI (1999) Nomenclature for factors of the HLA system, 1998. *Tissue Antigens* 53:407-446.

Cadavid LF, Watkins DI (1997) Heirs of the jaguar and the anaconda: HLA, conquest and disease in the indigenous populations of the Americas. *Tissue Antigens* 50:209-218.

Crawford MH (1998) The origins of Native Americans: evidence from anthropological genetics. Cambridge University Press. Cambridge, UK

Dobbins F (1993) Disease transfer contact. *Annu Rev Anthropol* 22:273-291.

Gomez.Casado E, Vargas.Alarcon G, Martínez-Laso J, Perez-Blas M, Granados J, Layrisse Z, Montoya F, Varela P, Arnaiz-Villena A (1997) Generation of the HLA-B35, B5, B16, and B15 groups of alleles studied by intron 1 and 2 sequence analysis. *Immunogenetics* 46:469-476.

Gomez-Casado E, Vargas-Alarcón G, Martínez-Laso J, Granados J, Varela P, Alegre R, Longas J, Gonzalez-Hevilla M, Marlin-Villa JM, Amaiz-Villena A (1999) Evolutionary relationships between HLA-B alleles as indicated by an analysis of intron sequences. *Tissue Antigens* 53:153-160.

Gutiérrez I (1986) *Historia del Negro en Colombia*. Nueva América, Bogotá

Madden DR, Gorga JC, Strominger JL. Wiley DC (1991) The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* 353:321-325.

Madrigal JA, Hildebrand WH, Belich MP, Benjamin RJ, Little AM, Zemmour J, Ennis PD, Ward FE, Petzl-Erler ML, Toit ED du, Parham P (1993) Structural

diversity in the HLA-A10 family of alleles: correlations with serology. *Tissue Antigens* 41:72-80.

Marcos CY, Fernandez-Viña MA, Lazaro AM, Moraes ME, Moraes JR, Stastny P (1999) Novel HLA-A and HLA-B alleles in South American Indians. *Tissue Antigens* 53:476-485.

Marsh SG (2000) Nomenclature for factors of the HLA System, update October/November 1999. *Hum Immunol* 61:354-356.

Mason PM, Parham P (1998) *HLA* class I region sequences, 1998. *Tissue Antigens* 51:417-466.

Parham P, Lawlor DA, Lomen CE, Ennis PD (1989) Diversity and diversification of HLA-A, B, C alleles. *J Immunol* 142:3937-3950.

Parham P, Adams EJ, Arnett KL (1995) The origins of HLA-A, B, C polymorphism. *Immunol Rev* 143:141-180.

Petzl.Erler ML, Gorodezky C, Layrisse Z, Klitz W, Fainboim L, Vullo C, Bodmer JG, Egea E, Navarrete C, Infante E. Alaez C, Olivo A, Debaz H, Bautista N, Rosa G de la, Vazquez MN, Navarro JL, Pujol MJ, Duran C, Schafhauser C, et al (1997) Anthropology report for Region Latin-America: Amerindian and admixed

populations. In: Charron D (ed) Genetic diversity of HLA: functional and medical implication. EDK, Paris, pp 337-345.

Snary D, Barnstable CJ, Bodmer WF, Crumpton MJ (1977) Molecular structure of human histocompatibility antigens: the HLA-C series. *Eur J Immunol* 8:580-585.

Turner S, Ellexson ME, Hickman HD, Sidebottom DA, Feman- dez-Viña M, Confer DL, Hildebrand WH (1998) Sequence- based typing provides a new look at HLA-C diversity. *J Immunol* 161:1406-1413.

Vargas-Alarcón G, Alvarez M, Martínez-Laso J, Granados J, Diaz-Campos N, Gómez-Casado E, Alcocer-Varela J, Amaiz-Vilena A (1996a) A new HLA-B35 (B*3516) allele found in a Mexican of Nahua (Aztec) descent. *Immunogenetics* 43:244-245.

Vargas-Alarcón G, Martínez-Laso J, Gómez-Casado E, Granados J, Diaz-Campos N, Varela P, Alvarez M, Arnaiz-Villena A (1996b) A novel HLA-B35 (B*3517) allele found in a Mexican of Otomi descent. *Tissue Antigens* 47:547-550.

Vargas-Alarcón G, Gómez-Casado E, Martínez-Laso J, Granados J, Layrisse Z, Alegre R, Amaiz-Vilena A (1997) Differences in intron 2 sequences between B*39061 and B*39062 in Amerindians: comparison with those of B*3901, B*5101, and B*52012 alleles. *Immunogenetics* 45:436-439.

Wilson DJ (1999) *Indigenous South Americas, of the past and present*. Westview, Boulder Co.

Zemmour J, Parham P (1992) Distinctive polymorphism at the HLA-C locus: implications for the expression of HLA-C. *J Exp Med* 176:937-950.

Figure 1



Fig. 1 Geographic location of Colombia and Barranquilla. Cities named within *black rectangles* are those with the greatest degree of mixed Amerindian, European and African population. *Dotted areas* represent coastal Mulatto groups (mixed Amerindian and Negroid people, the latter being in a higher proportion). Mestizo and Amerindian groups are dispersed all over Colombia. At present, about half the Colombian population is Amerindian-Spanish Mestizo and about one fifth is Spanish-African Mestizo.

Figure 2.

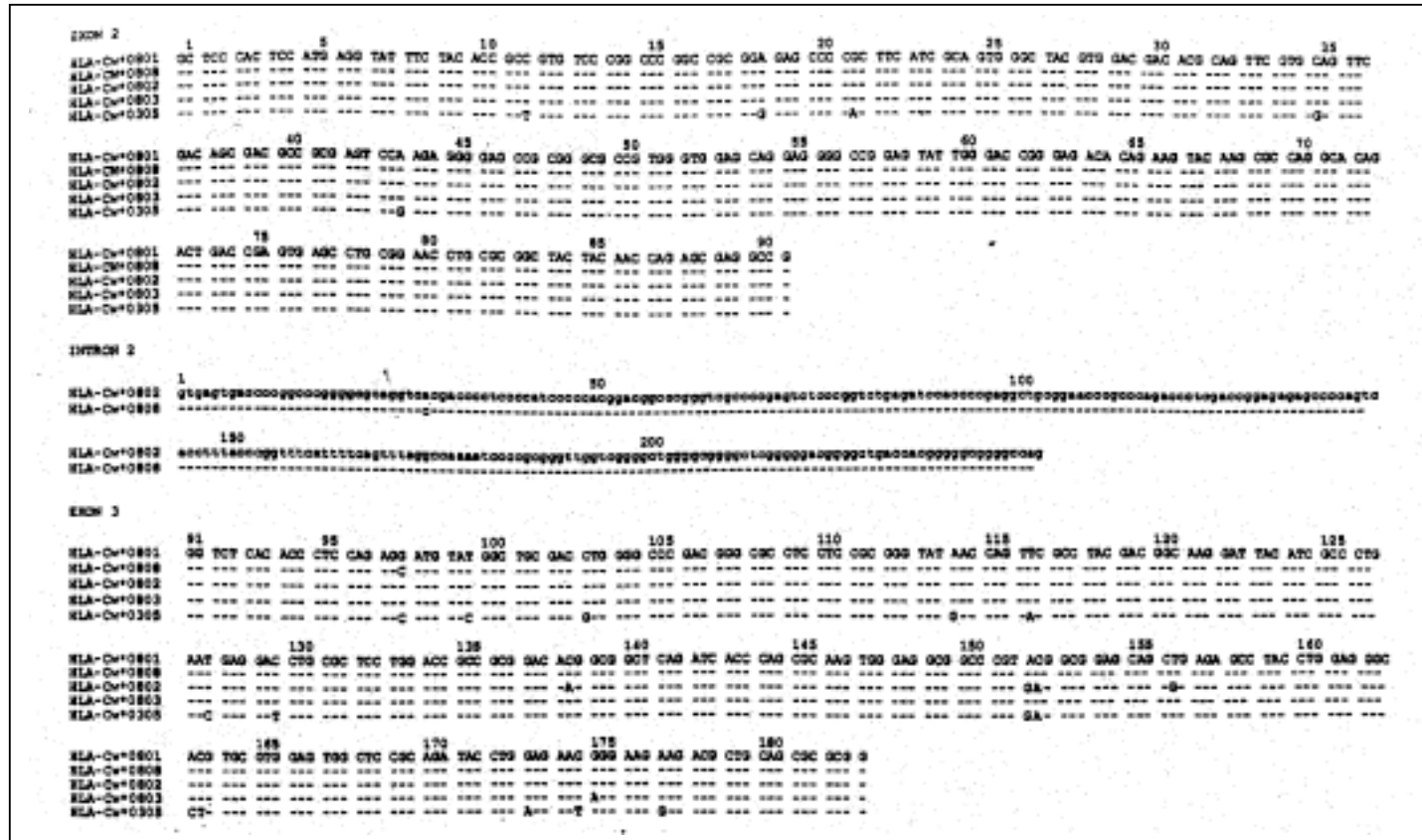


Fig 2. Complete exon 2, intron 2, and exon 3 sequence of the new Cw*0808 allele and Cw*0802 compared to exon 2 and exon 3 sequence of Cw*0801, Cw*0803, and Cw*0305 alleles.

Figure 3.

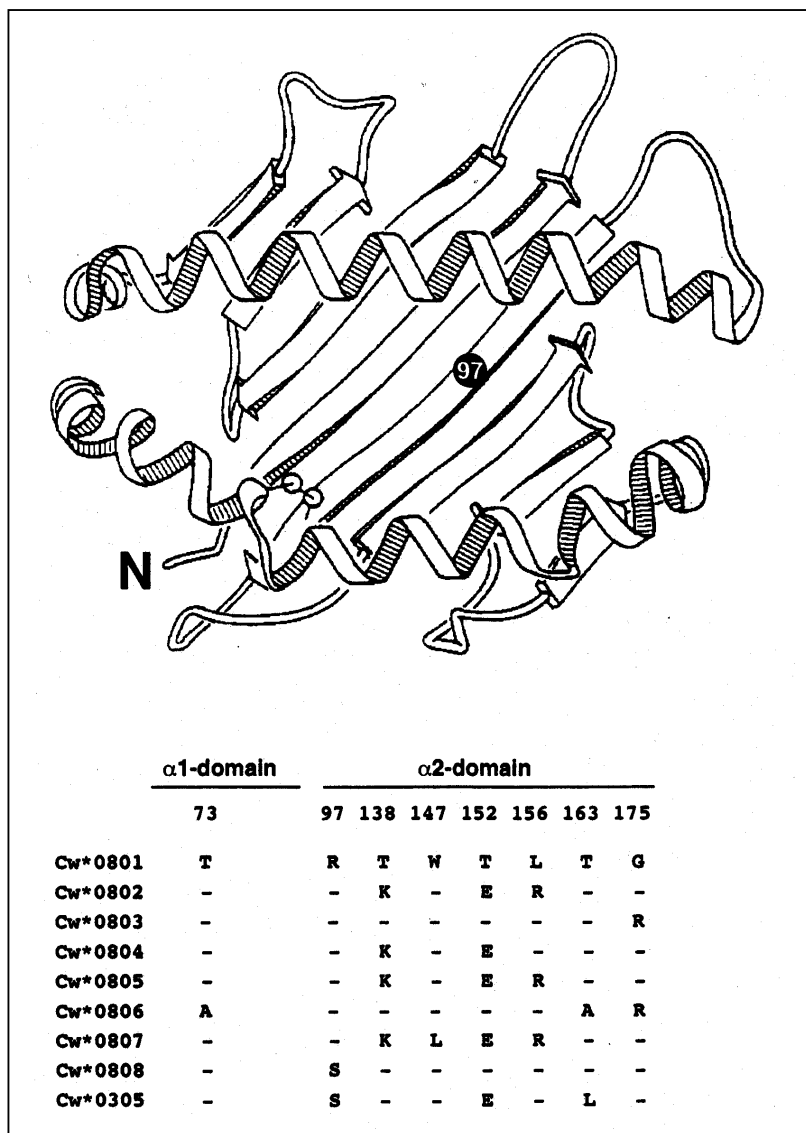


Fig. 3. Amino acid variability among *Cw*08* alleles and the *Cw*0305* allele. The one-letter standard code symbol is used. The *black circle* shows the single *Cw*0808* amino acid change referred to the *Cw*0801* sequence. *Cw*0801*, *0802, *0803, *0804, *0805, *0806, *0807, and *0305 amino acid sequences were taken from <http://www.anthonynolan.com/HIG>.

8. REAL-TIME SEQUENCE-SPECIFIC PRIMER POLYMERASE CHAIN REACTION AMPLIFICATION OF HLA CLASS II ALLELES: A NOVEL APPROACH TO ANALYSE MICROCHIMERISM ^{1 3}

GLORIA GARAVITO, ² DAGMAR KLEIN, ³ MELVIN DENIS, ³ ALBERTO PUGLIESE, ³ CAMILO RICORDI, ³ AND RICARDO L. PASTORI ^{3,4}

Departamento de Inmunología, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia, and Diabetes Research Institute, University of Miami School of Medicine, Miami, Florida 33136.

¹ This work was supported by a grant from the National Institutes of Health (DK-25802) and by the Diabetes Research Institute Foundation.

² Departamento de Inmunología, Universidad del Norte.

³ Diabetes Research Institute, University of Miami School of Medicine

⁴ Address correspondence to: R.L. Pastori, PhD, Diabetes Research Institute,

University of Miami School of Medicine, 1450 NW 10th Avenue, Miami FL 33136.

Email address: rpastori@med.miami.edu

⁸ Artículo publicado en la Revista Transplantation. Vol. 73(5) pp 822-825. March 2002.

The careful assessment of microchimerism is essential to investigate the effects of donor bone marrow-derived cells in transplantation. We have developed a protocol to assess microchimerism based on the HLA mismatch between the recipient and the donor. Our approach combines real-time polymerase chain reaction (PCR) with sequence-specific primer PCR (SSP-PCR) to selectively amplify and measure the abundance of donor HLA alleles in DNA samples extracted from the recipient after transplant. To optimize and validate the reliability of this method at different levels of microchimerism, we tested serial dilutions of donor DNA into recipient DNA. We demonstrate that donor alleles can be readily detected and reliably measured at concentrations as low as 0.1%. This method is simple and rapid and could find practical application in the assessment of microchimerism in patients receiving organ or cellular transplant in conjunction with donor bone marrow cell infusion.

INTRODUCTION

Microchimerism is defined as the coexistence of genetically different cells in one individual. This situation is often observed in transplantation, and the term microchimerism mostly refers to the presence of donor bone marrow-derived cells in the blood and organs of the recipient. Several studies pioneered by Starzl et al. (1) suggest that the persistence of donor-derived leukocytes and their migration into different organs may be key to the acceptance of the grafted organs or cells. Several trials are currently ongoing to test the hypothesis that infusion of donor bone marrow cells (DBMC) will induce allogeneic microchimerism and improve allograft survival possibly resulting in donor-specific tolerance (82). A careful

assessment of microchimerism is crucial for investigating the effects of DBMC and how levels of microchimerism correlate with graft survival. Microchimerism can be assessed by analyzing the presence of cells expressing donor HLA molecules in peripheral blood. At present, microchimerism is measured using flow cytometry with a threshold of detection of ~0.5%. A gamut of conventional polymerase chain reaction (PCR)-based analytical options have been described, such as competitive PCR and nested sequence-specific priming PCR (3-4), including a combination of PCR and flow cytometry analysis (5). The nesting PCR approach affords greater sensitivity, with some primer combinations being able to detect levels of microchimerism as low as 0.001%. However, these approaches are prone to contamination and PCR artifacts, especially when using nested primers (6).

Real-time PCR has been recently developed, and it is the method of choice for both qualitative and quantitative analysis of amplified nucleic acids (7). There is growing evidence demonstrating the versatility and reproducibility of real-time PCR (8). The aim of this study was to develop a method that combines real-time PCR with sequence-specific primers (SSP) to selectively amplify donor-specific alleles (SSP-PCR) to detect and quantify for the selective amplification HLA class II alleles were carefully defined by Olerup et al. (9). Therefore, we have developed a method to selectively measure the quantities of the DQB1*0201 allele (donor) in DNA from an individual homozygous for DQB1*0602 (recipient).

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines and DNA Isolation

Epstein-Barr virus (EBV) cell lines for this study were kindly provided by Dr. Zuheir Awdeh (The Center for Blood Research, Boston, MA). The two cell lines used were homozygous for HLA-B7, DR2, DQA1*0102, DQB*0602 and HLA-B8, DR3, DQA1*0501, DQB1*0201, respectively. DNA was isolated from both cell lines using the PUREGENE DNA kit (Gentra Systems). To simulate the various levels of chimerism that may be encountered in clinical samples, we prepared serial dilutions of two DNA samples purified from the above cell lines. The “donor” sample was homozygous for the DQB1*0201 allele, whereas the “recipient” sample was homozygous for the DQB1*0602 allele. Thus, known quantities of donor genomic DNA (1000, 500, 250 and 100 pg) were diluted into 100 ng of recipient DNA. This allowed us to generate samples with levels of microchimerism ranging from 1% to 0.1%.

Primers for Amplification of the DQB1*0201 Allele

A 205-bp product was amplified from the second exon of the DQB1*0201 allele using primers DQB1*0201F: GTC CGT CTT GTG AGC AGA AG and DQB1*0201R: GCA AGG TCG TGC GGA GCT. These are sequence-specific primers that have been originally developed and tested by Olerup et al. (9). The specificity of these primers was confirmed by a negative amplification when genomic DNA isolated from the DQB1*0602 DNA homozygous cell line was used as template in the PCR.

Real-time PCR Amplification

The fluorescent thermal cycler utilized in our experiments (Light-Cycler, Roche

Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) is equipped with software that allow each step to the PCR reaction to be followed in real time and to measure fluorescence at each cycle. The software also provides melting curve analysis and calculations of the melting temperature (T_M) of the PCR product.

Determination of the Temperature for Acquiring Fluorescent Data

We performed a preliminary melting curve analysis to determine the proper parameters for the acquisition of the fluorescence data. The melting curve analysis was carried out by heating to 95°C, cooling to 55°C at 20°C/sec, followed by heating to 94°C at the much slower rate of 0.2°C/sec and acquiring fluorescence continuously.

This analysis allows determining the melting temperature specific for the PCR product of interest. The identify of the PCR products was verified by electrophoresis in 2% agarose gels.

Program for Real-time PCR Amplification

PCR amplifications were performed in a final volume of 20 µl containing 3 mM of MgCl₂, 0.5 µM of each primer, 2 µl of ready-to-use reaction mix, and 10x DNA Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals). SYBR Green I is a dye that becomes fluorescent only when bound to double-stranded DNA and therefore can be used to monitor product formation in each cycle. The reaction was preincubated for 5 min at room temperature with 0.55 µg of TagStart antibody (Clontech) to

reduce the formation of primer-dimer products. The amplification program was as follows: a transition rate of 20°C/sec for all the steps, 1 cycle of denaturation at 95°C for 20 sec, 50 cycles of 4 steps with denaturation at 95°C for 2 sec, annealing at 68°C for 20 sec, extension at 72°C for 30 sec, and acquisition of fluorescence at 88°C for 1 sec.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study we developed a method that combines real-time PCR with SSP-PCR to detect and quantitate low levels of allogeneic microchimerism by measuring the levels of donor HLA alleles in the DNA sample of the recipient. As described below, we have defined the experimental conditions that donor-specific HLA alleles can be quantified in DNA extracted from the recipient.

Melting Curve Analysis

The first step in real-time PCR amplification is to calculate the melting temperature of the target template. This will determine the specific temperature that the fluorescence data collected are specific for the target template and can be acquired for quantitation. Figure 1 shows the melting curve analysis of the SSP-PCR amplification product of the DQB1*0201 allele, which in our experiments represents a donor-specific allele. As the temperature is slowly increased (0.2°C/sec), a sharp decrease in the fluorescence signal is observed at a temperature characteristic of the amplified DNA (Fig. 1A). The T_M of the amplified DQB1*0201 allele is displayed from the melting peak when the negative derivative

of the fluorescence ($-dF/dT$) is plotted against the temperature (Fig. 1B). The sharp peak with a T_M of 91.5°C represents the melting peak of the DQB1*0201 allele-specific amplification product. The size of the amplicon was confirmed by electrophoresis in a 2% agarose gel, shown in the inset of Figure 1. In contrast, the broad peak with melting temperatures ranging between 72°C and 87°C corresponds to the melting peak of primer-dimer amplification. Therefore, the quantitation of the DQB1*0201 allele was performed acquiring the fluorescence data at 88°C , a temperature at which any nonspecific fluorescence is excluded (Fig. 1B).

Determination of the Conditions under which Linear Amplification Occurs

It is important to determine the maximum amount of recipient DNA that can be used in the PCR amplification without interfering with the linearity and yield of the amplification of the donor allele. To determine this we performed experiments using 0.5, 1 and 2.5 ng of DQB1*0201 DNA diluted into 50, 100 and 250 ng of DQB1*0602 DNA, respectively, so that a constant ratio of 1:100 was maintained. The amplification of the DQB1*0201 allele remained linear in the presence of 50 and 100 ng of recipient DNA, but linearity was lost when using 250 ng (Fig. 2). In contrast in a similar experiment performed with 0.5, 1, and 2.5 ng of DQB1*0201 DNA diluted into 10 ng of DQB1*0602 DNA, the amplification of the DQB1*0201 allele was linear through the entire concentration range. Thus, indicating that the loss of linearity in the amplification was due to the presence of the 250 ng of DQB1*0602 DNA. We conclude that 100 ng of DQB1*0602 DNA is the maximum

amount of recipient DNA that can be used to quantitate the donor allele under linear amplification conditions.

Determination of the sensitivity of Real-time SSP-PCR for the DQB1*0201 Allele

To determine the sensitivity of our assay, we serially diluted known quantities of genomic DQB1*0201 DNA (1000, 500, 250 and 100 pg) into 100 ng of the recipient DQB1*0602 DNA, because this is the maximum amount of recipient DNA that allows to quantitate the donor DNA under linear conditions. The fluorometric data were displayed and analyzed with the LightCycler software throughout the reaction (10). The program has the capability to extrapolate and graphic the log-linear values of the log fluorescence versus cycle (Fig. 3A) and to calculate the fractional cycle number termed “crossing number” at which the onset of fluorescence is detected. A standard curve was generated by plotting the log concentration of the standards versus their respective crossing points (Fig. 3B). It was possible to produce a linear curve ($r=0.9$), adjusted automatically to reach the lowest mean squared error ($\epsilon=1.3 \times 10^{-3}$, sum of squares of deviation/number of measuring points) up to 0.1 ng of genomic DQB1*0201 DNA (Fig.3B). Thus, in these experiments, realtime SSP-PCR amplification allowed to reproducibly quantitate levels of microchimerism as low as 0.1%. Assuming that in the clinical setting most of the donors will be heterozygous for the HLA class II alleles, at least for this combination of donor/recipient DNA (DQB1*0201/DQB*0602) the sensitivity would be approximately 0.2% (0.2 ng of heterozygous genomic DQB*0201 in 100 ng of

recipient DNA).

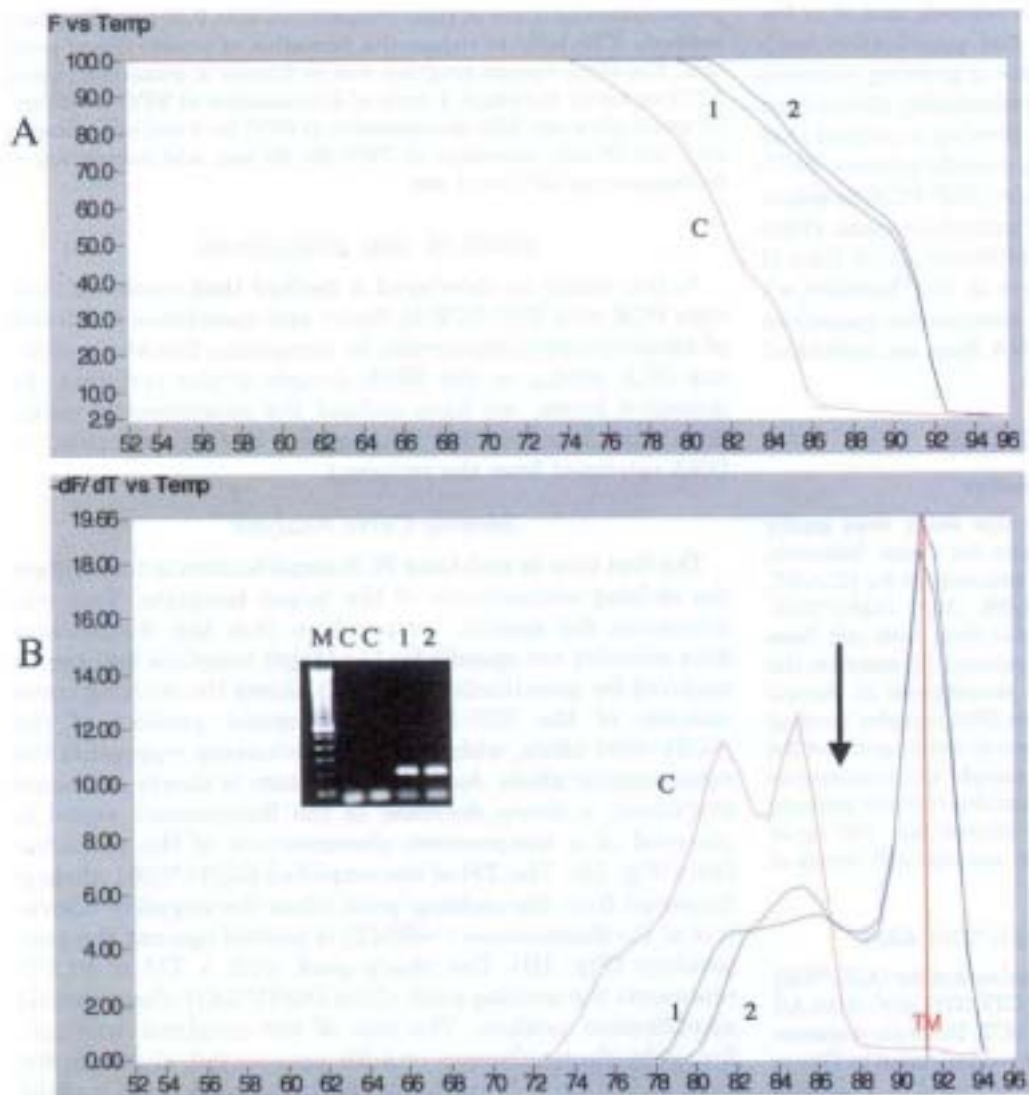
Although other reports described PCR-derived methods that could detect lower levels of microchimerism, these approaches are cumbersome and prone to contamination, and nonspecific results were reported using nested PCR (6). In our opinion, the simplicity and accuracy of the approach presented here vastly outweighs the relative lower sensitivity of the described technology, compared with the above mentioned assays. In fact, the 0.2% sensitivity of the proposed approach is sufficient to warrant its use for DNA detection in most studies of macro- and microchimerism. The high degree of fidelity and simplicity of execution are also critical factors when evaluation large numbers of samples and in particular longitudinal samples. Thus, the method described here may be ideally suited for studying microchimerism in the transplant setting.

REFERENCES

1. Starzl T, Demetris AJ, Trucco M, et al. Migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology* 1993; 17:1127.
2. Fontes P, Rao A, Demetris AJ et al. Augmentation with bone marrow of donor migration for kidney, liver, Herat, and páncreas islet transplantation. *Lancet* 1994; 344: 151.
3. Rudert WA, Kocova M, Rao AS, Trucco M. Fine quantitation by competitive PCR of circulating donor cells in posttransplant chimeric recipients. *Transplantation* 1994; 58:964.
4. Spriewald BM, Wassmuth R, Carl HD, et al. Microchimerism after liver transplantation: prevalence and methodological aspects of detection. *Transplantation* 1998; 66:77.
5. García Morales R, Esquenazi V, Zucker K et al. An assessment of the effects of cadáver donor bone marrow of kidney allograft recipient blood cell chimerism by a novel technique combining PCR and flow cytometry. *Transplantation* 1996; 62:1149.

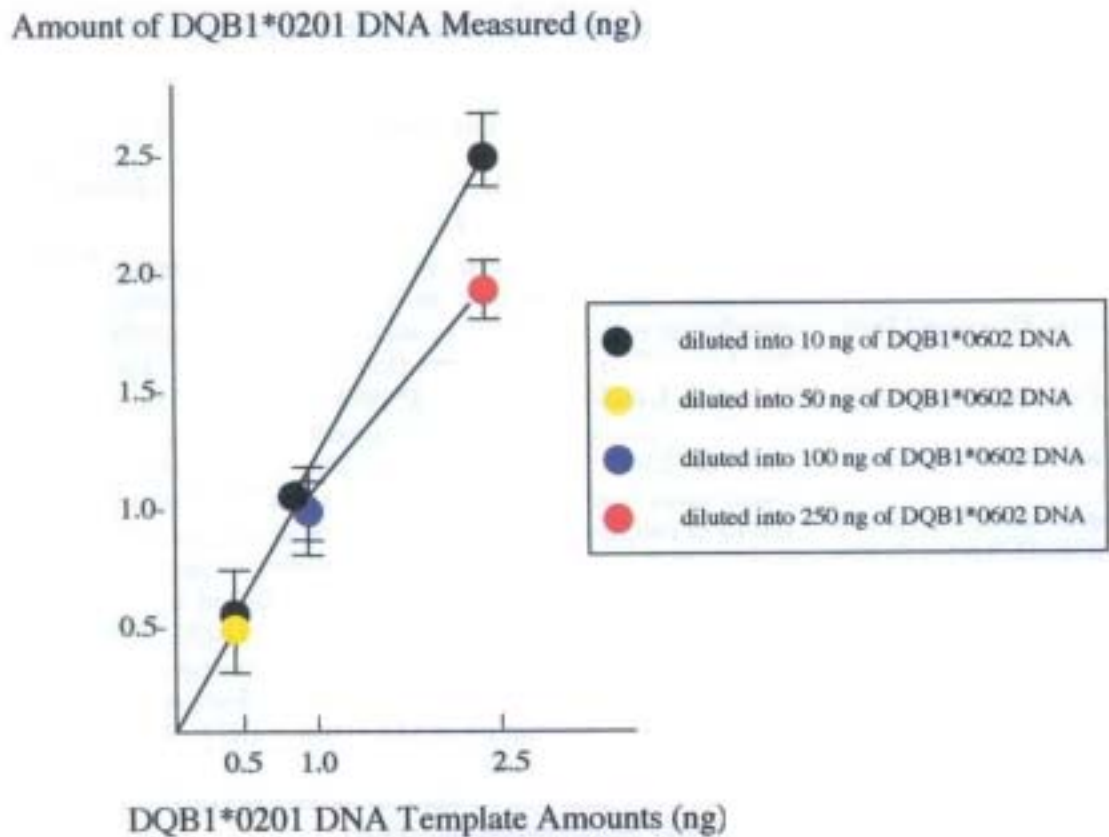
6. Carter AS, Bunce M, Cerundolo L, Welsh KI, Morris PJ, Fuggle SV. Detection of microchimerism after allogenic blood transfusion using nested polymerase chain reaction amplification with sequence-specific primer (PCR-SSP): a cautionary tale. *Blood* 1998; 92:683.
7. Mever S, Wittwer C, Nakagawara K, eds. *Rapid cycle real-time PCR: methods and applications*. New York: Springer-Verlag. 2001.
8. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real-time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6: 986.
9. Olerup O, Aldener A, Fogdell A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with séquence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* 1993; 41:119.
10. Wittwe CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: A microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *BioTechniques* 1997;22:176.

Figure 1.



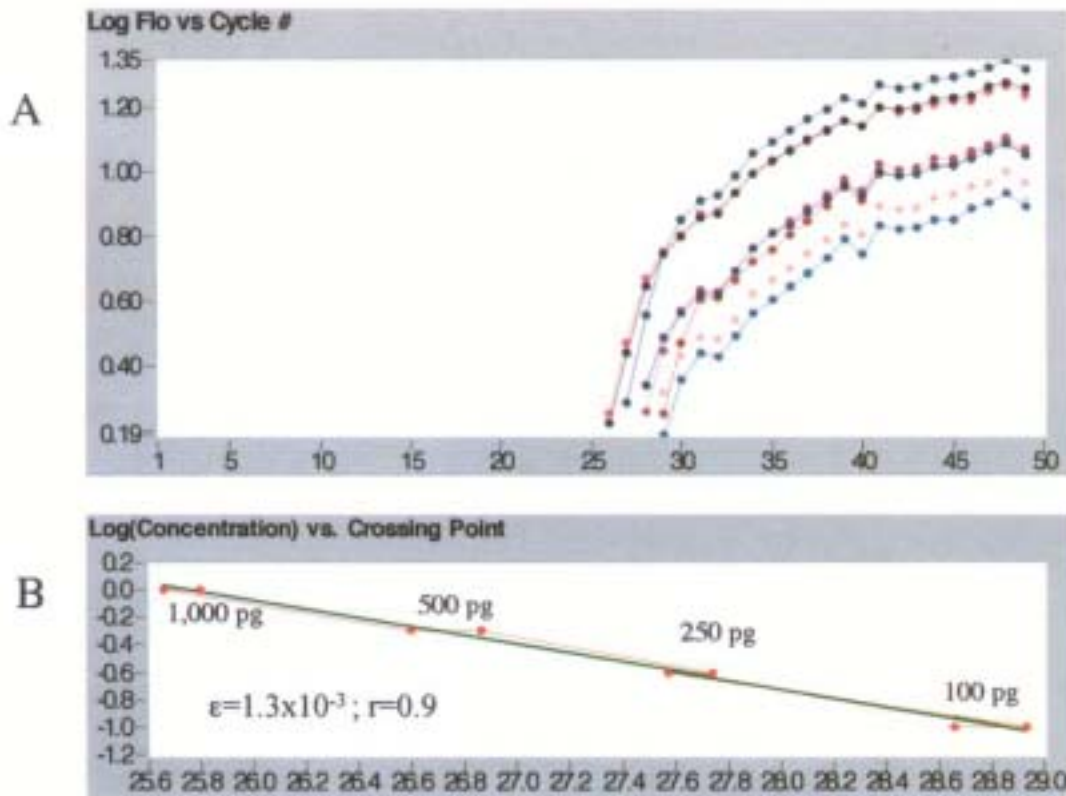
Melting curve analysis of the SSP-PCR DQB1*0201 amplicon. Melting curve analysis carried out using 10 ng of genomic DQB1*0201 DNA of H₂O (2). (C) Control reaction without DNA template and in the presence of 10 ng of DQB1*0602 DNA. The DQB1*0201 amplicon has a TM of 91.5°C. The arrow marks the temperature data for quantitation are collected. The vertical red line TM marks the melting temperature of the DQB1*0201 amplification product. Shown in the inset is an agarose-gel electrophoresis of the SSP-PCR amplification. The size of a DQB1*0201 amplicon is 205 bp. M is a 100 base pair ladder DNA marker (Gibco/BRL).

Figure 2.



Influence of the amount of DNA background on the linearity of the amplification reaction. Genomic DQB1* 0201 DNA, 0.5, 1.0, and 2.5 ng, were amplified in the presence of 10 ng of DQB1*0602 background DNA (black circles) or in the presence of 50 ng (yellow circles), 100 ng (blue circles), or 250 ng (red circles) of DQB1*0602 DNA, respectively. Lack of linearity is observed in the presence of 250 ng of DQB1*0602 DNA.

Figure 3.



Sensitivity of real-time SSP-PCR amplification of the DQB1*0201 allele. (A) the plot, Log Flo vs. Cycle, shows the fluorescence of the DQB1*0201 DNA amplification from reactions containing 1000, 500, 250, and 100 pg of DNA in the presence of 100 ng of DQB1*0602, equivalent to 1%, 0.5%, 0.25% and 0.1% microchimerism respectively, after the background fluorescence was automatically subtracted. Each reaction performed in duplicate (B) by plotting the log of standard concentration versus the fractional cycle number crossing points, a standard curve was generated. ($\epsilon=1.3 \times 10^{-3}$, sum of squares of deviation/number of measuring points). Each measurement was performed in duplicate. The standard curve is representative of three independent experiments.

9. POLIMORFISMO DE LOS ALELOS HLA-DRB1 Y SU ASOCIACIÓN CON

ARJ EN UNA MUESTRA DE NIÑOS MESTIZOS COLOMBIANOS ⁴

Gloria Garavito ^{5,5} M.D., Clara Malagón ² M.D., Luis A. Ramírez ³ M.D., Oscar F. De La Cruz ³ M.D., Oscar Uribe ³ M.D., Edgar Navarro ¹ M.D., Antonio Iglesias ⁴ M.D., Paz Martínez PhD⁵., Dolores Jaraquemada PhD⁵., Eduardo Egea M.D. MSc.
¹

¹ Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia.

² Servicio de Reumatología, clínica del niño, ISS, Bogotá, Colombia.

³ Departamento de Reumatología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

⁴ Departamento de Reumatología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

⁵ Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.

⁹ Artículo publicado en revista Biomedica. 2003, Vol 23: 254 - 62.

Correspondencia:

Gloria Garavito

División Ciencias de la Salud

Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular, Universidad del Norte

Km5 Vía Pto Colombia

Barranquilla, Colombia. Sur América

Tel. 3509 486. Fax: 3598852

ggaravit@uninorte.edu.co

RESUMEN

Se buscó tipificar a nivel molecular los alelos de los Antígenos de Leucocitos Humanos, HLA- DRB1 con un grupo de niños mestizos Colombianos (mezcla de Nativos Europeos y Africanos) con Artritis Reumatoidea Juvenil (ARJ), así como analizar su frecuencia de expresión y compararla con sujetos clínicamente normales e Investigar la asociación entre la frecuencia de los alelos con los diferentes subgrupos clínicos de ARJ.

El estudio involucró 65 pacientes con ARJ y 65 controles sanos. La tipificación de los alelos HLA-DRB1 se realizó por medio de la metodología Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizando sondas de oligonucleótidos de secuencias específicas (PCR-SSOP), protocolo recomendado por el XII International Histocompatibility Workshop realizado en St-Malo - Paris en el año 1996.

Los alelos HLADRB1* 1104 (Prueba Exacta de Fisher) (PEF)=0.013, Odds Ratio (OR)=16.79, Frecuencia Etiológica (FE)=0.93) y DRB1*1602(PEF= 0.016, OR=8.98, FE= 0.88) se evidencian como marcadores de susceptibilidad. HLA-DRB1*1501 (FP = 0.466; p = 0.005) y HLA DRB1*1402 (FP = 0.49; p = 0.009) se comportaron como alelos asociados con protección. Al comparar las asociaciones entre alelos y los diferentes subgrupos clínicos se encontró asociación entre ARJ oligoarticular con HLA-DRB1* 1104 (p = 0.0034, OR= 41.53, FE = 0.97), ARJ poliarticular se asoció con el alelo HLA-DRB1* 0404 (p = 0.012, OR= 8.75, FE = 0.88) y en el grupo sistémico, el alelo más expresado fue el HLA-DRB1*1602 (p =

0.005, OR = 21.33, FE =0.95). La presencia de Factor Reumatoide estuvo asociado con los alelos HLA-DRB1*0407 ($p = 0.05$, OR = 11.2, FE = 0.45) y HLA-DRB1*1302 ($p = 0.02$, OR= 22.8, FE= 0.63) En el grupo de pacientes con ANA+ solo hubo significancia estadística para el alelo HLA-DRB1* 0701 ($p = 0.001$, OR= 58, FE=0.73).

Nuestros resultados sugieren que los genes del MHC en este subgrupo étnico, participan no sólo en la susceptibilidad a desarrollar ARJ sino también en la expresión clínica de la enfermedad.

Palabras claves: ARJ: Artritis Reumatoide Juvenil, alelos HLA-DR, Polimorfismo, Subtipos HLA-DRB1.

ABSTRACT: POLYMORPHISM OF HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN HLA-

DRB1 ALLELES AND THEIR ASSOCIATION WITH JUVENILE RHEUMATOID ARTHRITIS IN A GROUP OF COLOMBIAN MESTIZO CHILDREN

Oligotypes of the Human Leukocyte Antigen; HLA class II, DRB1 alleles were characterized at the molecular level in a group of Colombian children suffering Juvenile Rheumatoid Arthritis (JRA). The distribution of these alleles was examined in a group of Colombian mestizo children (genetic admixture of Amerindian, European and Africans) suffering from clinically distinct JRA subsets in order to detect HLA allele frequency differences in patients with different JRA subsets. A group of 65 patients with JRA and 65 controls were characterized for the subtypes of the HLA- DRB1 alleles using Polymerase chain reaction with sequence specific oligonucleotide probes (PCR-SSOP). The oligotyping protocol recommended by the 12th International Histocompatibility Workshop placed in St-Malo - Paris on 1996 was used. Subtype HLA-DRB1*1104 was the allele most strongly associated with susceptibility to JRA (Fisher's $p = 0.013$, Odds ratio (OR) =16.79, Etiologic Fraction (EF) =0.93, HLA-DRB1*1602 was also associated with susceptibility to a lesser degree (Fisher's $p= 0.016$, OR=8.98, EF= 0.88). HLA-DRB1 alleles participating in JRA protection were HLA-DRB1*1501 (Preventive Fraction (PF) =0.466, $p=0.005$) and HLA DRB1*1402 (PF=0.49, $p=0.009$). The relationship between some HLA-DRB1 alleles and clinical features was also compared. The presence of rheumatic factor was associated with the alleles HLA-DRB1*0407 ($p= 0.05$, OR= 11.2, EF=0.45) and HLA-DRB1*1302 ($p= 0.02$, OR= 22.8, EF=0.63). There was also an association between HLA-DRB1*0701($p= 0.001$, OR=58, EF=0.73) with expressing ANA +. We found that in oligoarticular subset the allele HLA-DRB1*1104,

($p=0.00034$, OR =41.53, EF= 0.97) was the ones expressed most commonly. In the poliarticular group, the alleles most frequently expressed were HLA-DRB1*0404 (Fisher $p =0.012$, OR=8.75, EF=0.88). In patients with Systemic JRA the HLA-DRB1*1602 allele ($p =0.005$, OR=21.33, EF=0.95) was most frequent. These results suggest that the MHC genes of mestizo children influence not only in the clinical expression of the disease, but also in the susceptibility to its development.

Key words: Juvenile Rheumatoid arthritis, HLA-DR genes, MHC polymorphism, HLA DRB1 Subtypes.

INTRODUCCIÓN

La Artritis Reumatoide Juvenil (ARJ) constituye la causa más común de artritis

crónica en niños y es la menos estudiada desde el punto de vista inmunogenético (1). Esta enfermedad corresponde a un grupo de cuadros clínicos heterogéneos con manifestaciones clínicas que varían en morbilidad, presentación y curso clínico (2,3) A diferencia de la Artritis Reumatoide del adulto (AR), ARJ se presenta clínicamente con tres subgrupos clínicos, lo cual la hace más interesante como modelo para estudiarla desde el punto de vista inmunogenético, al permitir asociar marcadores del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) con la enfermedad.

Por definición, el inicio de la enfermedad ocurre antes de los 16 años de edad y está clasificada en tres grupos clínicos: ARJ oligoarticular, ARJ poliarticular y ARJ sistémica (4-8). El grupo de ARJ oligoarticular es el más frecuente (50% de los casos) y en éste, es frecuente el compromiso ocular, cuya manifestación clínica es una uveítis, la cual generalmente es subclínica (6,9).

La literatura y los diferentes grupos en el mundo, están de acuerdo en que, desde el punto de vista inmunogenético, AR y ARJ son enfermedades diferentes (10 -12).

Numerosos estudios se han llevado a cabo con diferentes poblaciones, tratando de asociar los diferentes subgrupos clínicos de ARJ con el polimorfismo del MHC. En ellos se han encontrado variaciones según el grupo étnico estudiado, identificándose varias asociaciones HLA. También se ha establecido que determinados alelos pueden jugar un papel importante como factor de riesgo para el desarrollo de ciertas complicaciones de la enfermedad o estar asociado a un

gen protector. Estos hallazgos se han obtenido utilizando bien sea técnicas serológicas y/o tipificación a nivel del DNA (15-18). La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en europeos y norteamericanos, en especial caucásicos y anglosajones. Estas investigaciones, han mostrado datos polémicos debido al número restringido de pacientes estudiados(13,14). El subgrupo clínico más estudiado es la ARJ Oligoarticular. En éste se han encontrado asociaciones con HLA-DRB1*08, DRB1*11 y DRB1*13, (2, 15, 16, 17,18). El alelo DRB1*07 se ha encontrado disminuido en este grupo, sugiriendo un rol protector (17, 19,20). En los pacientes con las características clínicas de ARJ poliarticular que son FR (+), la asociación más significativa es con el alelo HLA- DRB1*0404. Este mismo alelo está implicado en AR, sugiriéndose que este subgrupo clínico pudiera ser el mismo de la AR en el adulto de instalación temprana (21, 2,22). En el subgrupo poliarticular con FR negativo se han asociado los alelos DRB1*01 y DRB1*08 (17, 22,23). El desarrollo de uveítis, la cual es más frecuente en pacientes con FR negativo y Anticuerpos Antinucleares positivo, ANA+ se ha informado asociación con los marcadores DRB1*11 y DRB1*13 (2, 15,22).

En este estudio, llevado a cabo en pacientes mestizos colombianos, encontramos al alelo HLA-DRB1*1104 asociado a susceptibilidad con ARJ y en especial al subgrupo clínico ARJ oligoarticular, asociación previamente descrita en caucásicos por otros autores. También encontramos una asociación entre la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad con el alelo: DRB1*1602 siendo esta mas frecuente en el fenotipo sistémico. Los alelos HLA-DRB1*1501 y DRB1*1402 se asociaron con

protección.

El desarrollo de este trabajo permitió estudiar las asociaciones entre marcadores biológicos con las características clínicas en la población colombiana más representativa (mestizos) y sugerir marcadores de protección y/o susceptibilidad.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes

La muestra de pacientes estuvo conformada por 65 niños con diagnóstico de ARJ, todos mestizos colombianos en edades comprendidas entre 2 y 16 años de edad. Treinta y tres de ellos provenientes de la consulta reumatológica institucional del hospital San Vicente de Paul de Medellín, y los 32 restantes de la Clínica del niño del Instituto de los Seguros Sociales así como de la clínica Colsubsidio de Bogotá. Los pacientes se diagnosticaron de acuerdo con los criterios y la clasificación del American College of Rheumatology (4,7). En todos ellos el inicio del cuadro clínico se dio antes de los 16 años. A todos se les practicaron marcadores serológicos de autoinmunidad. En todos ellos se investigó la presencia de anticuerpos antinucleares usando la técnica de inmunofluorescencia con células HEP-2 y factor reumatoide por prueba de Látex. Se sometieron a una valoración oftalmológica inicial y a controles periódicos (cada 4 - 6 meses) para detectar uveítis. Se conformaron subgrupos de 33 y 32 pacientes de cada ciudad respectivamente. Los niños previamente habían sido evaluados y monitorizados clínicamente por un período no inferior a 6 meses antes de su ingreso al protocolo de la investigación. Toda la recolección de la información fue primaria y fue

realizada por los investigadores clínicos. Esta se registró en un formato de protocolo previamente elaborado para ello.

Controles

Como grupo control se seleccionaron 65 niños clínicamente normales, del mismo grupo étnico de los pacientes con ARJ. Estos niños no estaban relacionados familiarmente, y presentaban igual distribución por sexo y edad. El área de procedencia era similar a la de los pacientes ARJ. Todos ellos tenían antecedentes de que sus padres y abuelos fueron nativos de esas áreas o ciudad asignada. Ninguno tenía un familiar cercano trabajando en consultorios clínicos o áreas de prestación de servicios de salud. Ninguno tenía antecedentes personales ni familiares de alergia, enfermedades autoinmunes, psoriasis o espóndilo artropatías.

Obtención del ADN

A cada paciente y control se le tomaron las muestras biológicas a partir de sangre venosa periférica para extraer el ADN por la metodología de "Extracción de sales" (*salting out*) (24).

Tipificación molecular de los alelos HLA-DRB1

Todas las muestras de los pacientes y controles fueron tipificados para identificar los alelos HLA-DRB1 utilizando la técnica de Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) con oligonucleotidos de secuencia específica (PCR-SSOP). El procedimiento usado fue el recomendado por el 12th International Histocompatibility Workshop Congress (25,26). Los iniciadores y las sondas utilizadas en dicho protocolo permitieron un tipaje de alta resolución.

Análisis Estadístico

Para el cálculo y la interpretación de la significancia estadística de las diferentes frecuencias alélicas y para el análisis de las asociaciones observadas, se utilizó el test de Chi cuadrado (X_2), basado en una tabla de 2 x 2 con corrección Mantel-Haenszel. En aquellos casos en el que la tabla de 2 x 2 contenía un valor menor de 5, se utilizó la prueba exacta de Fisher (PEF), con un intervalo de confianza del 95%. El OR se calculó para aquellos alelos que mostraron significancia estadística cuando fue comparado con el grupo control. La fracción etiológica y la fracción preventiva fueron calculadas para aquellos antígenos que mostraron asociación o estaban ausentes en la muestra de pacientes estudiada (27).

RESULTADOS

Características clínicas de la muestra estudiada

Las características clínicas de los pacientes que se involucraron en este estudio resultaron ser similares a aquellas descritas por otras series publicadas en la

literatura (2, 22, 23, 28, 29, 30, 31,32). El grupo etáreo en donde se encontró el mayor número de pacientes (38 pacientes), estuvo entre escolares de 5 a 10 años de edad (60.3%), seguido del grupo etareó de 2 a 5 años (22.2%). Los 11 pacientes restantes (17.5%), tenían entre 11 y 16 años de edad. La literatura no aporta conclusiones respecto de la asociación entre alelos HLA y la instalación temprana de ARJ. Sólo existen datos obtenidos de análisis serológicos que asocian el HLA-DR4 con poliartritis de instalación temprana (33,34). Aunque la entidad fue más prevalente entre mujeres (60%), este hallazgo no fue estadísticamente significativo. La distribución del número de pacientes con relación al subgrupo clínico en el momento de la instalación del cuadro clínico, mostró resultados iguales a los descritos por otros autores. De 65 pacientes, 26 se clasificaron como ARJ oligoarticular, 23 como ARJ poliarticular y los otros 16 pacientes tuvieron un cuadro clínico como ARJ de tipo sistémico. Del total de pacientes, sólo 6 de ellos (9.2%) tuvieron ANA positivos. El 10.8% de la muestra (7 del total de pacientes), tenían presencia de FR positivo. Se encontró desnutrición proteico calórica y retardo del crecimiento entre los subgrupos clínicos poliarticular y sistémico. La desnutrición grado II fue la más frecuentemente encontrada, siendo ARJ poliarticular el subgrupo clínico con más alta prevalencia (34.7%). (Figura 1).

No se encontró significación estadística cuando se buscó una asociación entre el curso clínico de esta enfermedad y la presencia de estos marcadores autoinmunes. Se destaca que de los 65 pacientes, sólo en uno (1) se diagnosticó

uveítis. Este pertenecía al subgrupo clínico poliarticular y su fenotipo fue tipificado como HLA-DRB1*1301 / *1601.

Tipificación molecular de los alelos HLA-DRB1

Los resultados del tipaje molecular para los alelos HLA-DRB1, tanto en los sujetos enfermos como en el grupo de control, se muestran en la Tabla 1. En ella sólo se presentan los alelos más frecuentemente expresados, resaltando los que están significativamente incrementados o disminuidos. Los alelos DRB1 más frecuentemente expresados en los pacientes con ARJ fueron el DRB1*1104 (PEF = 0.013, OR = 16.79, IC.95% = 0.84 - 280.64, FE = 0.93) y el alelo DRB1*1602 (PEF = 0.016, OR = 8.98, IC.95% = 0.73 - 150.3, FE = 0.88) asociándolos a susceptibilidad.

Al comparar el alelo DR15 tanto en los controles sanos como en los pacientes, se observó una alta expresión del mismo en el grupo control ($p=0.0078$, FP=0.26), siendo el subtipo DRB1*1501 el más significativo ($p= 0.0048$, IC.95%= 0.02 - 0.72, FP=0.466). Igual patrón estadístico se observó con el alelo DR14 ($p=0.015$, FP=0.51), siendo el subtipo DRB1*1402, el de más significancia ($p=0.0087$, IC.95%= 0 - 0.80, FP= 0.49). Los alelos DRB1*0405 y DRB1*0407 se expresaron de manera significativa en los pacientes con ARJ pero al compararlos con los sujetos sanos no mostraron significancia estadística.

Distribución de los alelos DRB1 en los diferentes subgrupos clínicos de ARJ

En el subgrupo oligoarticular, el alelo que más se expresó fue el DRB1*1104 (OR = 41.53, $p = 0.00034$). Este hallazgo es consistente con los informes previos de la literatura (35, 15,36). El HLA-DRB1* 0404 (OR = 8.750, $p = 0.012$) fue el que más se expresó en el subgrupo de pacientes con ARJ poliarticular. El subgrupo clínico de pacientes con manifestaciones de ARJ sistémica mostró una asociación con el incremento de la expresión del alelo DRB1* 1602. (OR = 21.33, $p = 0.0048$) (Tabla 2).

La presencia de ANA positivo se asoció al alelo DRB1* 0701 ($p = 0.001$, OR = 58, FE = 0.73). También se encontró un incremento significativo de los alelos DRB1* 0407 ($p = 0.05$, OR = 11.2, FE = 0.45) y DRB1* 1302 ($p = 0.02$, OR= 22.8, FE = 0.63) en aquellos pacientes que tuvieron factor reumatoide positivo.

DISCUSIÓN

En las enfermedades autoinmunes del humano se ha podido documentar una asociación entre el polimorfismo de los alelos HLA-Clase I y Clase II con susceptibilidad a desarrollar dichas enfermedades. De hecho se ha postulado que en las enfermedades hereditarias complejas y poligénicas, la respuesta inmune dirigida contra antígenos propios es crucial en la etiopatogenia de la enfermedad, y que ésta respuesta estaría condicionada por una particular expresión o rearreglo de los genes en un individuo. De esta forma, un alelo HLA específico podría favorecer la presentación antigénica de un péptido artritogénico a un repertorio de

TcR predeterminado genéticamente (37).

A diferencia de la Artritis Reumatoide del adulto, la Artritis Reumatoide Juvenil es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista clínico, con un curso variable, en la que se definen subgrupos clínicos claramente diferentes (38). El componente genético en la patogénesis de Artritis Reumatoide del adulto ha sido bastante investigado, a diferencia de la Artritis Reumatoide Juvenil, en el cual los estudios al respecto no son concluyentes, sin embargo, es claro que los genes y los mecanismos que condicionan la predisposición y/o protección en ARJ son diferentes (39).

ARJ es una enfermedad compleja, poligenica en la cual se han podido documentar asociaciones no solo con los genes asociados al MHC sino también con muchos otros marcadores tales como: Los genes promotores de IL-1,IL-6 e IL-10, TNF alfa/beta y el polimorfismo de la región variable 6.1 de TcR entre otros(40). Aunque las asociaciones más consistentes y reproducibles han sido las descritas con el polimorfismo de los genes MHC, los otros marcadores genéticos complican el análisis de las bases genéticas de esta enfermedad. Además es evidente que no existen razones para suponer que ARJ sea diferente de las otras enfermedades autoinmunes en las cuales se ha podido documentar varios sistemas genéticos esparcidos por diferentes cromosomas asociados a la susceptibilidad y expresión de la enfermedad (41).

A pesar de muchos estudios encaminados a asociar Antígenos de Leucocitos

Humanos y Artritis Reumatoide Juvenil (42), no está claro aún, cuáles de los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad están directamente involucrados en la patogénesis de esta enfermedad. Ella, por ser una enfermedad heterogénea, hace más compleja su asociación con los alelos HLA. Todos los estudios publicados han sido desarrollados en pacientes caucásicos y anglosajones más no en grupos étnicos mestizos. Hasta la fecha no había información de estudios inmunogenéticos en pacientes latinoamericanos, ni mucho menos en colombianos.

El subgrupo oligoarticular ha sido el más estudiado desde el punto de vista genético (43,28), y el alelo DRB1*1104 es el que más significado estadístico ha mostrado, en particular, en el subgrupo ARJ oligoarticular de instalación temprana que desarrolla uveítis. Otro alelo de asociación es DRB1*001/3 con ARJ poliarticular y FR negativo. En los pacientes con ARJ poliarticular y FR +, (manifestación clínica que más se asemeja con AR), la asociación más descrita es con HLA-DRB1*04 (10-12). Análisis de secuencia de los alelos DR4 revelan una frecuencia alta con DRB1*0401 y DRB1*0404 en caucasoides y con DRB1*0405 en pacientes japoneses (43), concepto que refuerza la relación estrecha entre AR y ARJ poliarticular con FR + (43,10).

En este estudio, describimos en nuestra población mestiza, al alelo HLA-DRB1*1104 (PEF = 0.011; OR = 14.34; FE = 0.93) como un marcador que se muestra asociado a un gen de susceptibilidad para ARJ. Este hallazgo es

significativo, ya que es el primer trabajo en población mestiza que reproduce a este marcador genético como un gen asociado a susceptibilidad en la población en general (9, 15,36). Igualmente, este mismo alelo fue el único marcador de susceptibilidad que mostró franca significación estadística en los pacientes del fenotipo oligoarticular (OR = 41.63; $p = 0.00035$; FE = 0.97). Nosotros también encontramos una asociación de susceptibilidad entre el alelo DRB1*1602 y el fenotipo sistémico ($p = 0.0048$; OR = 21.33; FE = 0.95). Este último hallazgo es diferente de los publicados por otros autores, quienes no encontraron asociación alguna de este alelo con este fenotipo (29). Este mismo alelo fue descrito por nosotros asociado a enfermedad de takayasu (44), en mestizos de nuestro país.

Los alelos HLA DRB1*0405 y DRB1*0407 se encontraron mayormente expresados en los pacientes (28 de 65); sin embargo, al compararlos con los sujetos controles no se encontró significado estadístico. Probablemente la explicación a este hallazgo sea el hecho que estos alelos son frecuentes en nuestra población mestiza (45).

La frecuencia de expresión del subtipo HLA-DRB1*0404 mostró una significancia estadística con el fenotipo ARJ poliarticular ($p=0.012$, OR=8.75, FE=0.88), lo que compagina con lo encontrado por otros autores al estudiar otros grupos étnicos (2,10-12, 17,31) comportándose también como un marcador de susceptibilidad.

Los alelos HLA-DRB1*1501 ($p = 0.0048$ OR = 0.14, FP = 0.46) y DRB1*1402 ($p =$

0.0087, OR = 0.1, FP = 0.49) se comportan como marcadores de protección.

Desde el punto de vista inmunogenético, nuestros resultados reproducen los encontrados previamente por nosotros y otros autores (46-48), en los cuales se muestra que nuestra carga genética es una mezcla de genes de amerindios, caucásicos y genes negros, representando la carga genética que se ha establecido en esta parte de América del sur en los últimos 6 siglos. Al asociar nuestros marcadores, alelos del HLA-DRB1, con el subgrupo sistémico, los datos no son estrictamente comparables con los encontrados por diferentes grupos de investigadores, debido probablemente a que los datos obtenidos por ellos provienen de diferentes grupos poblacionales (32).

A pesar del número relativamente pequeño de pacientes, en cada subgrupo clínico estudiado en nuestra serie, todas las asociaciones encontradas muestran un evidente valor estadístico. Nuestros resultados concuerdan con los datos publicados no solo en la literatura sino también con las conclusiones del componente de ARJ del 12Th Taller internacional de Inmunogenética y trasplante (49). A pesar que en nuestro trabajo, la relación entre casos y controles es 1:1 lo que plantea la posibilidad de error tipo 1, los valores de las fracciones etiológicas y de prevención muestran datos de demostrada asociación estadística.

Si estas asociaciones que nosotros estamos describiendo en este estudio, pudieran reproducirse en otros grupos étnicos mestizos, con similares

características demográficas, podría hipotetizarse que mecanismos de susceptibilidad ligados a el polimorfismo de ciertos genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) y la función de sus productos proteicos, los antígenos HLA, en el complejo trimolecular TcR- Péptido – MHC pudieran participar en la susceptibilidad y en la expresión clínica en esta enfermedad.

De hecho, los resultados de este trabajo permiten la descripción por primera vez, en la población colombiana más representativa (mestizos), de la asociación entre marcadores MHC, con las características clínicas de los tres subgrupos en ARJ y sugiere marcadores de protección y/o susceptibilidad.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros agradecimientos a todos los pacientes que participaron en este estudio y a la señora Ana Sofía Moreno Woo, por el soporte técnico que demandó el proyecto. Esta investigación fue financiada parcialmente con fondos del Instituto Colombiano de Ciencia y Tecnología, Colciencias. Ref.: 1215-04-28-96 y por fondos provenientes de la Universidad del Norte, Dirección de Investigaciones y Proyectos.

REFERENCIAS

1. Grom AA, Giannini EH, Glass DN. Current Comment: Juvenile Rheumatoid Arthritis and the trimolecular complex (HLA T cell receptor and antigen). Differences from rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1994; 37: 601-607.
2. Nepom B. The Immunogenetics of Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Rheum Dis Clin North America.* 1991; 17: 825-842.
3. Cassidy JT, Levinson JE, Brewer EJ. The development of classification criteria for children with juvenile rheumatoid arthritis. *Bull Rheum Dis.* 1989; 38:1-7.
4. Brewer EJ, Bass JC, Cassidy JT, et al. Criteria for the classification of Juvenile rheumatoid arthritis. *Bull Rheum Dis.* 1972; 23:712-719.
5. Cassidy JT. Rheumatic diseases of the childhood. In: Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB. *Textbook of Rheumatology.* Philadelphia: Saunders. eds.; 1993.p.1189-1208.
6. Pachman LM, Poznanski AK. Juvenile rheumatoid arthritis. In: McCarty D, Coopman W. eds. *Arthritis and Allied Conditions.* Philadelphia: Lea & Febiger; 1993.p.1021-1038.

7. Brewer EJ, Bass J, Baum J, Cassidy JT, Fink CW, Jacobs J, Hanson V, Levinson JE, Schaller J. Current proposed revision of JRA criteria. *Arthritis Rheum.* 1977; (Suppl. 20) 20:195-199.
8. Sakkas LI, Platsoucas CD. Immunopathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis: role of T cells and MHC. *Immunological Research.* 1995; 14(3): 218-236.
9. Malagon C, Van Kerckhove C, Giannini EH, Taylor J, Lovell DJ, Levinson JE, Passo MH, Ginsberg J, Burke MJ & Glass DN. The iridocyclitis of early onset pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis: Outcome in immunogenetically characterized patients. *J Rheumatol.* 1992; 19: 160-163.
10. Stastny P. Association of the B cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 1978; 298: 867-871.
11. Nepom GT, Byers P, Seyfried C, Healey LA, Wilske KR, Stage D, Nepom BS: HLA genes associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1989; 32: 15-21.
12. Wordsworth BP, Lanchbury JSS, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS, Bell JL. HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA Class II region. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86: 10049-10053.
13. Miller ML, Aaron S, Jackson J, Fraser P, Cairns L, Hoch S, Borel Y, Larson M,

Glass DN. HLA gene frequencies in children and adults with systemic onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1985; 28: 146-150.

14. Desaymard C, Kaplan C, Fournier C, Manigne P, Hayem F, Kahn MF. Major histocompatibility complex markers and disease heterogeneity in one hundred eight patients with systemic onset juvenile chronic arthritis. *Revue Du Rheumatism (English Edition)*. 1996; 63-69.

15. Melin-Aldana H, Giannini EH, Taylor J. et al. Human Leukocyte antigen DRB1*1104 in the chronic iridocyclitis of Early Onset Pauciarticular Juvenile Rheumatoid Arthritis. *J Pediatric*. 1992; 121: 56-60.

16. Brunner HI, Ivaskova E, Haas JP, Andreas A, Keller E, Hoza J, Havelka S, Scholz S, Sierp G & Albert ED. Class I associations and frequencies of class II HLA-DRB alleles by RFLP analysis in children with rheumatoid-factor-negative juvenile chronic arthritis. *Rheumatol Int.* 1993; 13(2): 83-88.

17. Ploski R, Vinjie O, Ronningen KS, Spurkland A, Sorskaar D, Vartdal F, Farre O. HLA Class II alleles and heterogeneity of Juvenil Chronic arthritis: DRB1*0101 may define anoud subset of the disease. *Arthritis Rheum.* 1993; 36: 465-472.

18. Scholz S, Albert ED. Immunogenetic aspects of juvenile chronic arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 1993; 11(Suppl.9): S37-41.

19. Fernandez-Vina M, Fink CW & Stastny P. HLA antigens in juvenile arthritis. Pauciarticular and polyarticular juvenile arthritis are immunogenetically distinct. *Arthritis Rheum.* 1990; 33: 1787-1794.

20. Ploski R. Immunogenetic polymorphism and disease mechanism in juvenile chronic arthritis. *Revue Du Rheumatism (English edition)*. 1997; (Suppl):4127S-130S.

21. Forre O, Dobloug J, Hoyerall H, Kass E, Thorsby E. HLA-antigens in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis: Increased frequency of the HLA-DRW4 antigen in only seropositive patient groups. In: *Advances in Inflammation Research*. New York: Raven Press; 1982; Vol 3: 195-201.

22. Fink CW, Fernandez-Vina M, Statsny P. Clinical and genetic evidence that Juvenile Chronic Arthritis is not a single disease. *Pediatrcl Clin North Am.* 1995; 42: 1155-69.

23. Fernandez-Viña M, Fink CW, Stastny P. HLA associations in juvenile arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 1994; 12: 205-14.

24. Miller SA, Dykes DD, Plosky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16: 1215.

25. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*. 1992; 39: 225-235.
26. Tiercy JM, Grundschober C, Jeannet M and Mach BA. Comprehensive HLA-DRB, DQB and DPB oligotyping procedure by hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes. In: K.M. Hui & J.L. Bidwell eds. *Handbook of HLA- typing technique*. Florida: CRC Press; 1993.p.117.
27. Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet*. 1956; 20: 309-311.
28. Donn R, Pepper L, Carthy D. HLA-DPB1*0201 and DRB1*1104 are reduced in Greek Pauciarticular-Juvenile Chronic Arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*. 1993; 11 (Suppl.9):S74.
29. Pratsidou-Gertsi P, Kanakoudi-Tsakalidou F, Spyropoulou M, Germenis A, Adam K, Taparkou A et al. Nationwide collaborative of study HLA class II associations with distinct types of juvenile chronic arthritis (JCA) in Greece. *Eur J Immunogenet*. 1999; 26(4): 299-310.

30. Alsaeid K, Haider MZ, Kamal H, Srivastva BS, Ayoub EM. Prevalence of human antigen (HLA) DRB1 alleles in Kuwaiti children with juvenile rheumatoid arthritis. *Eur J Immunogenet.* 2002; 29 (1): 1-5.
31. Morling N, Friis J, Fugger L, Georgsen J, Heilmann C, Pedersen FK et al. DNA polymorphism of HLA class II genes in pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens.* 1991; 38: 16-23.
32. Prieur AM, Stavropoulos-Giokas C, Germenis A, Syropoulou M, Pratsidou P, Kanakoudi F et al. Juvenile Chronic Arthritis (JCA):12th International Histocompatibility Workshop study. In: D.J. Charron eds. *HLA in Medicine: Genetic Diversity of HLA.* France: EDK Serves.1997; Vol. I .p. 398-407.
33. Murray KJ, Moroldo MB, Donnelly P, Prahalad S, Passo MH, Giannini EH et al. Age-specific effects of juvenile rheumatoid arthritis-associated HLA alleles. *Arthritis Rheum.* 1999; 42(9): 1843-1853.
34. Jaraquemada D, Ollier W, Awad J, Young A, Silman A, Roitt M et al. HLA and rheumatoid arthritis: a combined analysis of 440 British patients. *Ann Rheum Dis.* 1986; 45: 627-36.
35. Ollier W, Thomson W. Population genetics of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 1992; 18: 741-759.

36. Haas JP, Thuckenbrodt H, Paul C, Hoza J, Scholz S, Albert ED. Subtypes of HLA DRB1*03,*08,*11,*12,*13 and *14 in early onset pauciarticular juvenile chronic arthritis (EOPA) with and without iridocyclitis. Clin Expert Rheumatol. 1994; 12 (S10): S7-S14.
37. Heard R. HLA and autoimmune disease. In: Lechler R, editor. HLA and disease. London: academic Press; 1994.p.123-152.
38. Prieur AM, Petty RE. Definitions and classifications of chronic arthritis in children. En: Arthritis in children and adolescent. Clinical pediatrics. London: Bailleres Tindall. 1993; Vol. 63: 124-30.
39. Stastny P, Fink CW. Different HLA-D associations in adult and juvenile rheumatoid arthritis. J Clin Invest. 1979; 63:124-30.
40. Glass David N, Giannini Edward H. Juvenile Rheumatoid Arthritis as a complex genetic trait. Arthritis & Rheumatism. 1999; 42: 2261-2268.
41. Davies JL, Kawaguchi Y, Bennet SI, Copeman JB, Cordell HJ, pritchard LE, et al. A genome-wide search for human type I diabetes susceptibility genes. Nature 1994. 1994; 371: 130 -136.

42. Stastny P, Xiaojang G & Fernandez M. Immunogenetics of rheumatoid arthritis and juvenile arthritis. *Medicine*. 1991; 82-87.
43. Okubo H, Itou K, Tanka S, Watanabe N, Kashiwagi N, Obata F. Analysis of the HLA-DR gene frequencies in Japanese cases of Juvenile rheumatoid arthritis by oligonucleotide DNA typing. *Rheumatol Int*. 1993; 13: 65-69.
44. Salazar M, Varela A, Ramírez LA, Uribe O, Vásquez E, Egea E et al. Association for HLA-DRB1*1602 and DRB1*1001 with Takayasu arteritis in Colombian Mestizos as markers of amerindian ancestry. *Int J Cardiol* 2000; 75:S113-S116.
45. Petz -Erler ML, Gorodezky C, Layrisse Z, Klitz W, Egea E, Garavito G et al. Anthropology report for Region Latin-America: Amerindian and admixed populations. Anthropology report for Region Latin-America. In: Charron D (ed). *Genetic diversity of HLA: functional and medical implication*. Paris: EDK; Medical and Scientific International publishers. 1997; 337-345.
46. Trachtenberg EA, Erlich HA, Hollenbach J, Keyeux G, Bernal J, Klitz W. HLA class II variation and linkage disequilibrium in nine Amerindian and three American populations from Colombia. Results of Expedición Humana. In: Charron Dominique ed. *HLA Genetic diversity of HLA functional and Medical Implication*. Paris: EDK; 1997; Vol. 2 .p.200-202.

47. Silvera-Redondo C, Gomez-Casado E, Martinez-Laso J, Egea E, Garavito G, Varela P et al. A new HLA-Cw allele (CW*0808) found in a Colombian Mestizo individual possibly generated by an intralocus/interloci gene conversion. *Immunogenetics*. 2000; 51:1053-1057.
48. Yunis JJ, Yunis EJ, Yunis E, Genetic relationship of the Guambino, Paez, and Ingano Amerindians of southwest Colombia using major histocompatibility complex class II haplotypes and blood groups. *Hum Immunol*. 2001; 62(9):970-978.
49. Prieur AM, Stavropoulos-Giokas C, Germenis A, Spyropoulou M, Pratsidou P, Kanakoudi F et al. Juvenile Chronic Arthritis (JCA):12th International Histocompatibility Workshop study. In: D.J. Charron eds. *HLA in Medicine: Genetic Diversity of HLA*. France: EDK Serves;1997. (1): .p.398-407.

TABLA 1 ALELOS HLA-DRB1 EN MESTIZOS COLOMBIANOS CON ARJ

ALELOS DR	CASOS CON ARJ		CONTROLES		ANALISIS ESTADISTICO				
	N= 65	FA	N=65	FA	OR	X ²	p	FE	FP
DR1	17	13.0%	17	13.0%	1.0	0.0	0.58	NS	NS
DR15	3	2.3%	13	10.0%	4.70	5.77	0.01	NS	0.26
DRB1*1501	2	1.5%	12	9.2%	0.14	7.94	0.0048	NS	0.466
DRB1*1502	0	0%	1	0.8%	0	PEF	1.0	NS	NS
DRB1*1503	1	0.8%	0	0%	2.02	PEF	1.0	NS	NS
DRB1*1602	8	6.1%	1	0.8%	8.98	PEF	0.016	0.88	NS
DRB1*0301	9	6.9%	7	5.3%	1.32	0.071	0.4	NS	NS
DRB1*04	28	21.5%	25	19.2%	1.21	0.28	0.59	NS	NS
DRB1*0405	8	6.1%	5	3.8%	1.68	0.76	0.38	NS	NS
DRB1*0407	10	7.6%	6	4.6%	1.79	1.13	0.28	NS	NS
DRB1*0404	7	5.3%	2	1.5%	3.80	2.96	0.085	NS	NS
DR11	13	10.0%	9	6.9%	1.56	0.87	0.35	NS	NS
DRB1*1101	3	2.3%	4	3.1%	0.74	PEF	0.5	NS	NS
DRB1*1102	2	1.5%	4	3.1%	0.48	PEF	0.68	NS	NS
DRB1*1104	7	5.3%	0	0%	16.79	PEF	0.013	0.93	NS
DRB1*1107	1	0.8%	0	0%	3.02	PEF	1.0	NS	NS
DR12	2	1.5%	3	2.3%	0.66	PEF	0.5	NS	NS
DRB1*06	3	2.3%	0	0%	7.3	PEF	0.12	NS	NS
DR13	16	12.3%	13	10.0%	1.31	0.40	0.52	NS	NS
DRB1*1301	9	6.9%	5	3.8%	1.93	1.27	0.26	NS	NS
DRB1*1302	3	2.3%	5	3.8%	0.581	PEF	0.72	NS	NS
DRB1*1303	3	2.3%	3	2.3%	1.0	PEF	1.0	NS	NS
DRB1*1305	1	0.8%	0	0%	3.02	PEF	1.0	NS	NS
DR14	5	3.8%	15	11.5%	0.28	5.86	0.015	NS	0.51
DRB1*1401	4	3.1%	6	4.6%	0.645	0.43	0.51	NS	NS
DRB1*1402	1	0.8%	9	6.9%	0.1	6.88	0.0087	NS	0.49
DRB1*0701	18	13.8%	14	10.8%	1.4	0.66	0.41	NS	NS
DRB1*0802	8	6.1%	9	6.9%	0.87	0.07	0.79	NS	NS
DRB1*1001	0	0%	1	0.8%	0	PEF	1.00	NS	NS

N = Número de sujetos estudiados

FA = Frecuencia alélica

OR = Razón de disparidad

PEF = Se aplica prueba exacta de Fisher

p = Probabilidad

FE = Fracción etiológica

FP = Fracción Preventiva

NS= no-significancia

TABLA 2

FRECUCENCIA ALÉLICA DE LOS ALELOS HLA-DRB1 MAS FRECUENTEMENTE EXPRESADOS EN DIFERENTES SUBGRUPOS CLINICOS DE MESTIZOS COLOMBIANOS CON ARJ					
ALELOS	CONTROL ES N=65	ARJ Oligoarticular N= 26			
DRB1*11 04	F* = 0	F (6) 23.07 %	OR 41.53	p 0.00034	FE 0.97
DRB1*04 04	F* (2) 3.0 %	ARJ Poliarticular N= 23			
		F (5)21.73 %	OR 8.750	p 0.012	FE 0.88
DRB1*16 02	F* (1)1.5 %	ARJ Sistémico N= 16			
		F (4)25 %	OR 21.33	p 0.0048	FE 0.95

N = Número de sujetos

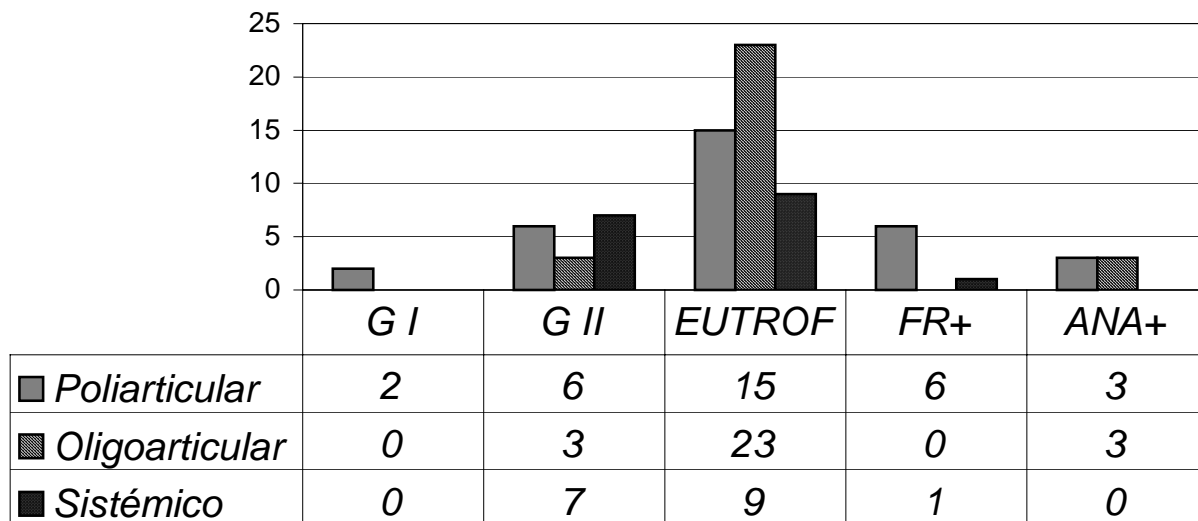
FE = Fracción Etiológica

F = Frecuencia Alélica

p = Probabilidad

OR = Razón de disparidad

FIGURA 1 CARACTERISTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA



G I = Desnutrición Grado I

G II = Desnutrición Grado II

EUTROF = Eutróficos

FR = Factor Reumatoide

ANA = Anticuerpos antinucleares

**10. P39.12 (H9) ABSENCE OF EO-JRA IN A NORTH COLOMBIAN
AFROCARIBBEAN SUBPOPULATION -ASSOCIATED HLA-CLASS I DNA
POLYMORPHISM ⁶**

G Garavito, D Middleton, A Iglesias, EE Egea, CV Caballero, E Egea

Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia, Universidad Nacional de Colombia,
American Red Cross, Belfast, UK

Several MHC-class I antigens have been associated with protection and susceptibility to early onset-Juvenile Rheumatoid Arthritis (EO-JRA) in Caucasian and Caucasoid population. In contrast there are few studies done in afrocaribbean population suffering from this autoimmune disease. The purpose of our study was to investigate a possible association or influence of the HLA-Class I DNA polymorphism on the occurrence or absence of EO-JRA in an afrocolombian subpopulation living up to the north coast in Colombia. To do this we set up a clinical follow-up monitoring search in order to diagnose EO-JRA in a local health clinic serving a rural afrocaribbean Colombian subpopulation inhabitants of Baru, an island located in front of Cartagena de Indias, a city in the Caribbean coast of Colombia. In this period no case of JRA was diagnosed in 4000 children-age ranged between 7 to 18 years. Each child had an average of 1.8 clinical exams through out the time this study was performed. Further a HLA class I molecular characterization of the MHC genes was done in 70 random selected DNA samples from unrelated native individuals, in whom their relatives were living in the island during at least three generations. To oligotype HLA-A * and HLA-CW* we used PCR-SSOP technique. Thirty one HLA-A * alleles and eighteen HLA- CW* alleles were typed.

¹⁰ Abstract presentado en el XIII international Congress of Histocompatibility and Immunology, 18 mayo-2003 en Seattle (USA) y publicado su resumen en el volumen 59 suplemento 2 pagina 138.

Our results showed that A*0214 is the allele with the highest gene frequency (0.03175). Other relevant A*02 subtypes found were: A*0201(0.0247) A*0203(0.00522) A*0205(0.00542). At the HLA-CW* locus the most significant alleles expressed were: CW*07(0.0645) CW*15 (0.0594) CW*0.4(0.0444). It is important to note that the allele C*0302(0.01912) had the highest gene frequency found in this unique afrocolombian subpopulation. These results are different from data published for others Colombian investigators, who have done research on other afrocolombian groups. The explanation for this is a different ancestor of our afrocaribbeans, making reference to the African region from they originally descended. Our results also could mean that the admixture between genes coming from Iberian conquest and west and central African population may protect against the development of JRA in afrocaribbean children. More studies should be done in different afrocaribbean community to prove this hypothesis.

11. HLA-DRB1 ALLELES AND HLA-DRB1 SHARED EPITOPES ARE MARKERS FOR JRA SUBGROUPS IN COLOMBIAN MESTIZOS ⁷

Gloria Garavito ^{1,2,8} M.D., Edmond J Yunis^{3,4,8} M.D., Eduardo Egea^{1,8} M.D., Luis A. Ramirez⁵ M.D., Clara Malagón⁶ M.D., Antonio Iglesias ⁷, M.D., Oscar F. De La Cruz⁵ M.D., Oscar Uribe⁵ M.D., Edgar Navarro¹ M.D., Paz Martinez² PhD., Dolores Jaraquemada² PhD.

¹ Immunology and Molecular Biology Laboratory, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia.

² Instituto de Biología fundamental. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, Spain.

³ Department of Cancer Immunology and AIDS, Dana-Farber Cancer Institute

⁴ Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, MA

⁵ Rheumatology Department, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

⁶ Rheumatology Outpatient Clinic, Clínica del Niño, Bogotá, Colombia.

⁷ Rheumatology Department, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

⁸ These three authors contributed equally to this study.

Correspondence :
Prof. Gloria Garavito M.D.
División Ciencias de la Salud
Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular
Universidad del Norte
Km 5 Vía Pto. Colombia
Barranquilla, Colombia, Sur América
Phone Number: 57 5 3509486 Fax: 57 5 3598852
E-mail: ggaravit@uninorte.edu.co

¹¹Artículo enviado para ser publicado en la Revista Human Immunology el 21 de agosto del presente año.

ABSTRACT

We studied the association of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 allele and haplotypes with Juvenile Rheumatoid Arthritis (JRA) in 65 patients and 65 controls, from Colombia. The JRA subsets were distinguished based on criteria established by the American College of Rheumatology. (Formerly ARA) The classification of haplotypes was determined on the basis of known frequencies of Caucasians, Asians, Africans and Amerindians. Two haplotypes were associated with protection, HLA-DRB1*1501, DQB1*0602 (p=. 002) and HLA-DRB1*1402, DQB1*0301(p= .01). The polyarticular subset showed association with the aminoacid sequence ⁷⁰QRRAA⁷⁴ which includes HLA-DRB1*04, 01 and *1402. Two new findings of interest were in the association of a Caucasian haplotype (DRB1*1104, DQB1* 0301 p= .0002) with pauciarticular- JRA and a new finding of the Amerindian haplotype (DRB1*1602, DQB1*0602 p= .0000002) association with the systemic - JRA. The DRB1 alleles of these two haplotypes, share the epitope ⁷⁰DRRAA⁷⁴ and were associated with both the pauciarticular and the systemic subset of JRA. Our results suggest that studies of disease susceptibility in populations of admixed genetic background, should take into account the contribution of the ethnic groups or nationalities in the control and disease populations studied in order to rule out stratification factors.

Key Words: JRA (Juvenile Rheumatoid Arthritis), HLA association, HLA-DRB1 - DQB1 alleles, MHC-Class II Haplotypes.

Abbreviations

HLA	Human Leukocyte Antigen
JRA	Juvenile Rheumatoid Arthritis
OR	Odds ratio
PCR	Polymerase Chain Reaction
SSO	Sequence Specific Oligonucleotide
SSP	Sequence Specific Primers
MHC	Major Histocompatibility Complex
ACR	American College of Rheumatology

INTRODUCTION

Juvenile Rheumatoid Arthritis is defined as a chronic arthritis of unknown etiology appearing in patients of less than 16 years of age. It is the most frequent rheumatic disease found in children (1). This disease is a heterogeneous chronic disease with a broad variability of its clinical presentation (2). Juvenile rheumatoid arthritis (JRA), also known as juvenile idiopathic arthritis can be distinguished on the basis of clinical parameters at the onset of diseases. JRA is classified on the basis of presentation during the first six months from its appearance (Onset) into pauciarticular onset or oligo-articular when the number of joints involved at the moment of its onset are less than five joints, polyarticular arthritis affecting five or more joints (Rheumatoid Factor Negative- Rheumatoid Factor Positive) and systemic Arthritis, which have extraarticular manifestations. Oligoarticular-onset JRA has a relatively benign clinical course, whereas polyarticular an systemic onset types often are nonremitting and disabling requiring aggressive treatment (3-6).

In humans, MHC is one of the most polymorphic genetic systems. To date numerous studies have been performed to study the HLA polymorphism in different

populations and ethnic groups (7-9). Reliable estimates of phenotypes, gene and haplotype frequencies of HLA antigens, alleles and group of alleles in well-defined ethnic populations, are of theoretical and practical importance. Practical applications of such frequencies include clinical transplantation and HLA disease association (7).

The relationship between alleles of MHC gene complex with JRA has been the subject of numerous investigations displaying high significance associations with alleles or groups of alleles in the HLA antigen systems (10- 12). There are several studies which have reported association of JRA with different human HLA class II alleles using either serological or DNA typing techniques, but the majority of these findings come from studies done in European and Caucasians ethnic groups (13-16). For the pauci or oligoarticular onset, which is the most common and most extensively studied subgroup, the alleles HLA -DRB1*08, DRB1*11, DRB1*13, DQB1*0402 (18-19) show the strongest association with susceptibility, and for the polyarticular JRA the alleles HLA-DB1*0401, DRB1*01 and DRB1*08 has been found associated to susceptibility (17-22).

The reported associations did not report linkage disequilibrium studies between alleles of closely linked loci (23-26). However, the association between the pauciarticular JRA subtype with certain HLA class II antigens provides strong evidence in favor of T cell involvement through an HLA peptide-T cell receptor complex. This could be a relevant pathophysiological mechanism in the development of JRA (3-6).

Our main aim was to perform high resolution typing at the allele level in 65 pediatric Colombian Mestizo patients suffering from JRA in order to investigate the association of three different subgroups of JRA with HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles and HLA DRB1 - DQB1 haplotypes. The Mestizos were born in Medellín and Bogotá, both cities located in the country's hinterland where we could demonstrate that their four grandparents were also born in the same geographical areas without evidence of recent European origin. In this regard, Colombia is a country with a large population with a genetic admixture although with a significant Caucasian and Amerindian component (27,28).

MATERIALS AND METHODS

Patients

Sixty-five pediatric Colombian Mestizo patients from two different outpatient units of Rheumatology of two Colombian cities (Medellín and Bogotá) were recruited. All of them were diagnosed as JRA by the clinicians involved in this study, based on the criteria of classification of ACR Formerly American Rheumatism Association(5). All children were followed up for at least six months after they were diagnosed. All clinical and laboratory data of each patient was recorded on a modified patient identification form, provided by *the* 12th International Histocompatibility Workshop and Conference (29), by clinicians including disease presentation and markers as rheumatoid factors (RF), antinuclear antibodies (ANA), and presence / absence of uveitis.

Controls

As a control group, 65 Colombian Mestizo children consisting of healthy, unrelated individuals were enrolled. All of them were clinically normal and were randomly selected from a pull of individuals enrolled in public health programs coming from each city. Controls were selected by means of systematic random sampling with a fraction of 1:5. They were typed for all detected HLA-DRB1 and DQB1 alleles. This group was ethnically homogeneous, and the normal controls as well as the patients were born in two Colombian cities. From the genetics point of view, they were the result of an admixture of Amerindian, Hispanic and Black genes representing a genetic pool that has been established in this part of South America for the last six centuries (30).

HLA-DNA typing for DRB1 and DQB1 alleles

DNA was obtained from EDTA peripheral blood by a salting-out method (31) with minor modifications. The DRB1 and DQB1 alleles were determined on patients and controls using conventional PCR-SSP and PCR-SSO methods (32,33).

Statistical analysis

Allele and haplotypes frequencies were calculated. Comparisons of allele frequencies were accomplished by simple chi square analysis. Statistical significance for the various associations in patients versus controls were calculated using the χ^2 test, based on a 2 x 2 table with Yates correction. The p-values, corresponding to the χ^2 were corrected by multiplying by the number of comparisons performed. In cases where the 2 x 2 table contained a value of less than 5, Fisher's exact test was performed. When an allele or a haplotype was found that had increased significantly in the patients, the odd ratio (OR) was calculated to assess the strength of the association. DRB1, DQB1 haplotypes were unequivocally determined by homozygosity or deduced from established linkage disequilibrium information (7). Haplotype frequencies were determined by direct counting based on known frequencies of the haplotype of several ethnic groups.

RESULTS

HLA haplotypes are markers of racial admixture of Juvenile Rheumatoid Arthritis patients and controls of Colombian Mestizos

We used known HLA-DRB1, DQB1 frequencies as markers of racial admixture (7, 8), Data are summarized in Table 1. It shows that patients and controls have Caucasian and Asian-Amerindian or Asian admixture. For example, DRB1*1602, DQB1*0301; DRB1*0802, DQB1*0402 and DRB1*0407, DQB1*, 0302 are Asian-

Amerindian. Also, DRB1*1501, DQB1*0602; DRB1*1104, DQB*0301 and DRB1*1301, DQB1*0603 are Caucasian haplotypes. The remaining haplotypes (33 and 48) that were expressed in patients and controls respectively, are not shown in this table because they are not significant from the statically points of view even also as genetics markers.

HLA haplotypes associations with JRA of Colombian Mestizos

Table 2 shows a summary of the significant associations for either protection or susceptibility to develop JRA. One Caucasian (DRB1*1501, DQB1*0602) and one Amerindian-Asian (DRB1*1402, DQB*0301) haplotype was found associated with protection. By contrast, one Caucasian haplotype (DRB1*1104, DQB*0301) was found associated with susceptibility for the pauciarticular subset of JRA and one Asian-Amerindian haplotype (DRB1*1602, DQB1*0301) was associated with the systemic subset of JRA.

Aminoacid sequence (Shared epitopes) association with JRA in Colombian Mestizos

Table 3 shows a set of aminoacid sequences DRRAA, QARAA, QRRRA expressed in several alleles of the DRB1 chain that were found to be associated either with protection or susceptibility. The epitopes ⁷⁰QARAA⁷⁴ together with ⁷⁰QRRRA⁷⁴ that were shared in both group of alleles HLA-DRB1*1501, *1502, *1503 and HLA-DRB1*0404, *0405, *0408, *0101, *0102, *1402 were strongly associated with protection to development pauciarticular JRA (OR = 1.9, p=.009). The shared

epitope ⁷⁰DRRAA⁷⁴ that are shared for the alleles HLA-DRB1*1601, *1602, DRB1*1101, *1104 was shown as a marker of susceptibility for both pauciarticular and systemic JRA subsets (OR=12.4, p= .000002). Although not a single HLA allele was associated with the polyarticular JRA subset, a comparison of the shared peptide, ⁷⁰QRRAA⁷⁴ shared by HLA-DRB1*0101, *0102, *0404, *0405, *0408 and *0410 alleles was significant (OR = 3.0 and p=.005). This peptide is significantly associated even when counting the *1402, *0101 and *0102 that are over-represented in control group p=.02 and OR=1.9.

DISCUSSION

Many studies of HLA associations of Juvenile Rheumatoid Arthritis reported conflicting results, which were probably related to ethnic or nationality differences or the possibility that the disease includes several disease entities (14, 15). For example, the polyarticular form includes patients with rheumatoid factor (RF), which suggests that this subtype is similar to the adult form of the disease with younger age when it manifests itself (34). Another source of concern has been the possibility that recruitment of controls and patient care should be taken into account to make sure that the populations are not stratified by ethnicity or nationalities. This is particularly important when studies are performed in populations of known genetic admixture such as Mestizos of Colombia or Mexico. In this respect, ideally genetic markers such as short tandem repeats and blood groups would determine the degree of admixture of the individuals recruited (7, 28, 35). Furthermore, HLA markers can also be informative and consistent with the

genetic nature of Mestizos (28, 35). Also, based on published frequencies of large databases, ethnic-specific DRB1, DQB1 haplotypes have been reported (7, 8). We reported high resolution typing of such haplotypes in a Mestizo population of controls and patients with Juvenile Rheumatoid Arthritis and found evidence of comparable genetic admixture of Caucasian and Asian-Amerindian in patients and controls.

In this work we were able to show that susceptibility to the Polyarticular subset of patients is conferred by some HLA-DRB*04 which share the conserved sequence ⁷⁰QRRAA⁷⁴. The ⁷⁰QRRAA⁷⁴ of DRB1*0404, *0405, *0408 and *0410 was significantly associated with susceptibility, 15 of 46 vs 18 of 130 controls, $p > .005$, OR=3.0. This sequence is also shared by HLA-DRB1*1402, DRB1*0101 and *0102. The overall frequency in patients was 16 of 46 and in controls 29 of 130, $p = .02$, OR=1.86. Analysis of the genotypes of individuals carrying two copies, and one copy versus those with alleles negative for the shared sequence showed 4, 11 and 8 versus 1, 23 and 41 respectively.

Comparisons of individuals carrying one or two copies showed a $p = .02$ and OR=3.2. Taken together these findings are similar to those of susceptibility to adult rheumatoid arthritis. Of interest, two alleles HLA-DRB1*1501, 12/130 vs 1/130 ($p = .002$, OR= 13.1) and DRB1*1402, 9/130 vs.1/130 ($p = .01$, OR= 9.6) are protective for JRA. However, the shared epitope ⁷⁰QRRAA⁷⁴ together with the ⁷⁰QARAA⁷⁴ alleles are only significantly associated with protection to develop the pauciarticular

subtype 41/130 vs.8/52, $p=.009$, $OR=1.9$. Furthermore, two HLA alleles were markers for susceptibility to develop pauciarticular JRA, HLA-DRB1*1104 (9/52 versus 2/130 $p=.0002$, $OR=13.6$) confirming previous reports in Caucasians and HLA-DRB1*1602 (10/32 versus 1/130 $p=.0000002$, $OR= 58.64$) to develop systemic JRA, a marker for systemic JRA. This allele had been found associated with Takayasu arteritis in Colombian Mestizos (36). Also, the ⁷⁰DRRAA⁷⁴ which is shared by HLA-DRB1*1101, *1104, 1601 and 1602 was associated with disease susceptibility in both the pauciarticular and the systemic forms of JRA, (19/84 vs 3/130 $p=.000002$ $OR=12.37$).

In sum, our results demonstrated that the use of high resolution typing for HLA-DRB1 and DQB1 alleles are informative for detecting haplotypes of known ancestral origin useful for studies of HLA and disease associations in populations of known genetic admixture ,for example Colombian Mestizos and to suggest that subtypes of JRA may constitute distinct clinical entities based on disease presentation and genetic markers.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank all staff of the Immunology and Molecular Biology Laboratory for technical support. We also thank Ana Sofia Woo for her assistance, and all patients for their cooperation.

This work was supported by a Grant from Colciencias #1215-04-28-96 to Eduardo

Egea and by Universidad del Norte´s. And funds from Grant # 096-001. Edmond J Yunis by NIH grants AL 29583 and HL59838.

REFERENCES

1. Grom AA, Giannini EH, Glass DN. Current Comment: Juvenile Rheumatoid Arthritis and the trimolecular complex. (HLA: T cell receptor and antigen). Differences from Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 37: 601, 1994.
2. Fink CW, Fernandez-Vina M, Statsny P. Clinical and genetic evidence that Juvenile Chronic Arthritis is not a single disease. *Pediatr Clin North Am* 42: 1155, 1995.
3. Petty R E, Southwood TR, Baum J, Bhattay E, Glass DN, Manners P et al. Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997. *J rheumatology* V25:1991-4, 1998.
4. Malleson P. Proposal for classification criteria for idiopathic arthritides of childhood [letter]. *J Rheumatol* 1996; 23: 942. Miller JJ. [comment]. *J Rheumatol* 23: 943, 1996.
5. Brewer EJ Jr, Bass JC, Baum J, Cassidy JT, Fink C, Jacobs J, Hanson V, Levinson JE, Schaller J, Stigma JS: Current proposed revision of JRA criteria. JRA Criteria Subcommittee of the Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Section of The Arthritis Foundation. *Arthritis Rheum* 20 (2S):195, 1977.

6. Cassidy J T, Petty RE. Juvenile Rheumatoid Arthritis. In: Cassidy JT, Petty RE.: Textbook of Pediatric rheumatology 4th ed. Philadelphia : WB Saunders; 218, 2002.

7. Yunis EJ, Larsen CE, Fernandez-Viña M, Romero T, Hansen JA and Alper CA.. Inheritable variable sizes of DNA stretches in the human MHC: conserved extended haplotypes and their fragments or blocks. In Press: Tissue Antigens.

8. Gjertson DW and Lee S. HLA-A/B and DRB1/DQB1 Allele-level haplotype frequencies. In: Terasaki (eds). HLA 1998. Lenexa: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics; p. 424, 1998.

9. Clayton J, Lonjou C. Allele and haplotype frequencies for HLA loci in various ethnic groups. In: Whittle D. (ed): Genetic Diversity of HLA. Functional and medical implications. Paris: EDK; (1): p.665, 1996.

10. Stastny P, Xiaojang G, Fernandez M. Immunogenetics of Rheumatoid Arthritis and Juvenile Arthritis. Medicine 82, 1991.

11. Glass & Giannini . Juvenile Rheumatoid Arthritis as a complex genetic trait. Arthritis and Rheumatism 42: 2261, 1999.

12. McCurdy, D. Genetic Susceptibility to the connective tissue diseases current

opinions in Rheumatology. 11:399, 1999.

13. Pratsidou-Gertsi P, Kanakoudi-Tsakalidou F, Spyropoulou M, Germeis A, Adam K, Taparkou A, Siamopolou A, Drakou C, Konstantinidis T, Prieur AM, Stavropoulos-Giokas C. Nationwide collaborative study of HLA class II associations with distinct types of Juvenile Chronic arthritis (JCA) in Greece. Eur J Immunogenet 26:299, 1999.

14. Fernandez Viña M, Fink CH and Stasny P. HLA antigens in Juvenile Arthritis. Pauciarticular and polyarticular Juvenile Arthritis are immunogenetically distinct. Arthritis and Rheumatism. 33:1787, 1990.

15. Fernandez Viña M, Fink CH and Stasny P. HLA associations in Juvenile Arthritis. Clin Exp Rheumatol 12:205, 1994.

16. Reveilli JD, Spencer CH, Rivas-Chacon R, Myones B. HLA-DRB1, DQA1, DQB1 and DPB1 alleles in children with Juvenile Arthritis From three Ethnic groups. Arthritis Rheum 40(9):S241,1997.

17. Melin-Aldana H, Giannini EH, Taylor J, Lovell DJ, Levinson JE, Passo MH, Ginsberg J, Burke MJ, Glass DN. Human Leukocyte antigen DRB1*1104 in the chronic Iridocyclitis of Pauciarticular Juvenile Rheumatoid Arthritis. J Pediatrics 121(1):56, 1992.

18. Ploski P, Vinje O, Ronningen KS, Spurkland A, Sorskaar D, Vartdal F, Forre O. HLA Class II alleles and heterogeneity of Juvenile Rheumatoid Arthritis: DRB1*0101 may define a novel subset of the disease. *Arthritis Rheum* 36:465, 1993.
19. Haas J.P, Truckenbrodt H, Paul C, Honza J, Scholz S, Albert E.D. Subtypes of HLA-DRB1*03, *08, *11, *12, *13 and *14 in early onset pauciarticular juvenile chronic arthritis (EOPA) with and without iridocyclitis. *Clin Exp Rheumatol* 12(S10): S7-S14, 1994.
20. Nepom B. The Immunogenetics of Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Rheum Dis Clin North America* 17:825, 1991.
21. Brunner HI, Ivaskova E, Haas JP, Andreas A, Keller E, Hoza J, Havelka S, Scholz S, Sierp G, Albert ED. Class I associations and frequencies of class II HLA-DRB alleles by RFLP analysis in children with rheumatoid-factor-negative Juvenile Chronic Arthritis. *Rheumatol Int* 13(2): 83, 1993.
22. Scholz S, Albert ED. Immunogenetics aspects of Juvenile Chronic Arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 11(S9): S37-S41. 1993.
23. Paul C, Schoenwald U, Truckenbrodt H. HLA-DP/DR interaction in early onset

Pauciarticular Juvenile Chronic Arthritis. *Immunogenetics* 37:442, 1993.

24. Paul C, Hass JP, Truckenbrodt H. HLA class I/class II interaction in EOPA Juvenile Chronic Arthritis. *Immunogenetics* 39:61, 1993.

25. Van Kerckhove C, Luyrink L, Elma MS, Maksymowyth WP, Levinson JE, Larson MG et al. HLA-DP/DR interaction in children with Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Immunogenetics* 32: 364, 1990.

26. Paul C, Yao Z, Nevinny-Stickel C, Keller E, Schoenwald U, Truckenbrodt H, Hoza J, Suschke HJ, Albert ED. Immunogenetics of Juvenile Chronic Arthritis. I. HLA interaction between A2, DR5/8-DR/DQ, and DPB1*0201 is a general feature of all subsets of early onset pauciarticular juvenile chronic arthritis II. DPB1 polymorphism plays a role in systemic juvenile chronic arthritis. *Tissue Antigens* 45(4):280, 1995.

27. Petzl-Erlor ML, Gorodezky C, Layrisse Z, Klitz W, Faimboim L, Vullo C, Bodmer J, Egea E, Navarrete C, Infante E, Alaez C, Olivo A, Debaz H, Bautista N, de la Rosa G, Vasquez MN, Navarro JL, Pujol MJ, Duran C, Schafhausser C, faucz FR, Janzan M, Maciag P, Boldt ABW, Souza PSA, Probst CM, De Silva GF, Makhatadze N, Dominguez E, Montagnani S, Matos M, Martinez A, Herrera F, Hollembach J, Thomson G, Pando M Satz L, Larriba J, Fernandez G, Pessoa SA, Borosky A, Garavito G, Angel L, Brown J, Llop E. Anthropology report for Region

Latin-America: Amerindian and admixed populations. In: Charron D (ed). Genetic diversity of HLA: functional and medical implication. Paris: EDK Medical and Scientific International publishers; p. 337, 1997.

28. Yunis JJ, Yunis EJ, Yunis E. Genetic relationship of the Guambino, Paez, and Ingano Amerindians of southwest Colombia using major histocompatibility complex class II haplotypes and blood groups. *Hum Immunol.* 62(9):970, 2001.

29. Prieur AM, Stavropoulos-Giokas C, Germenis A, Spyropoulou M, Pratsidou P, Kanakoudi F. Juvenile Chronic Arthritis (JCA):12th International Histocompatibility Workshop study. In: D.J. Charron eds. *HLA in Medicine: Genetic Diversity of HLA.* France: EDK Serves. (1): .p.398, 1997.

30. Arango R. Sanchez E. Los pueblos indígenas de Colombia (Guía etnográfica de Colombia para actividades de planeación). Programa NUD y DNP, Bogotá. 1988.

31. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215, 1988.

32. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor recipient matching in cadaveric transplantation.

Tissue Antigens 39:225, 1992.

33. Tiercy JM, Grundschober C, Jeannet M and Mach BA. Comprehensive HLA-DRB, DQB and DPB oligotyping procedure by hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes. In: K.M. Hui & J.L. Bidwell. Handbook of HLA- typing techniques. Florida: CRC Press; 1993.

34. Harney S and Wordsworth BP. Genetic epidemiology of Rheumatoid Arthritis. Tissue Antigens . 60(6):465, 2002.

35. Gorodezky C, Alaez C, Vazquez-Garcia MN, De la Rosa G, Infante E, Balladares S, Toribio R, Pérez-Luque E, Muñoz L. The genetic structure of mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood groups systems, and microsatellites. Hum Immunol 62(9): 979, 2001.

36. Salazar M, Varela A, Ramírez LA, Uribe O, Vásquez E, Egea E, Yunis EJ, Iglesias-Gamarra A. Association for HLA-DRB1*1602 and DRB1*1001 with Takayasu arteritis in Colombian Mestizos as markers of Amerindian ancestry. Int J Cardiol 75:S113, 2000.

Table 1. SELECTED HLA-DRB1,DQB1 haplotypes expressed in Colombian JRA patients and unrelated controls

Haplotypes	Control N	JRA N	Ethnic ancestry
HLA-DRB1*0101, DQB1*0501	11	9	Caucasian
HLA-DRB1*0102, DQB1*0501	1	3	Caucasian

HLA-DRB1*1501, DQB1*0602	11	1	Caucasian
HLA-DRB1*1602, DQB1*0301	1	10	Asian-Amerindian
HLA-DRB1*0301, DQB1*0201	7	8	Caucasian
HLA-DRB1*0404, DQB1*0302	2	3	Caucasian
HLA-DRB1*0404, DQB1*0402	4	0	Caucasian
HLA-DRB1*0407, DQB1*0302	13	2	Asian-Amerindian
HLA-DRB1*1101, DQB1*0301	5	3	Caucasian
HLA-DRB1*1102, DQB1*0301	4	2	Asian
HLA-DRB1*1104, DQB1*0301	1	8	Caucasian
HLA-DRB1*1301, DQB1*0603	4	8	Caucasian
HLA-DRB1*1302, DQB1*0604	5	1	Caucasian
HLA-DRB1*1303, DQB1*0301	2	3	African-African American
HLA-DRB1*1401, DQB1*0301	4	0	Caucasian
HLA-DRB1*1401, DQB1*0503	3	3	Caucasian-Asian
HLA-DRB1*1402, DQB1*0301	9	1	Asian-Amerindian
HLA-DRB1*0701, DQB1*0202	9	12	Caucasian
HLA-DRB1*0701, DQB1*0303	0	1	Caucasian
HLA-DRB1*0802, DQB1*0402	1	4	Asian-Hispanic

N = Number of haplotypes found in the total number of JRA-patients and controls. The ethnic ancestry was based on published results summarized In ref. 7,8.

Table 2. HLA-DRB1, DQB1 haplotypes and alleles associated to protection and susceptibility in Colombian Mestizos

Haplotypes / Alleles	Controls	JRA	OR	p	Associations
HLA-DRB1*1501, DQB1*0602	11/130 (.08)	1/130 (.007)	11.9	.003	JRA - Protection
HLA-DRB1*1501	12/130 (.09)	1/130 (.007)	13.1	.002	JRA - Protection
HLA-DQB1*0602	16/130 (.12)	3/130 (.02)	5.9	.002	JRA - Protection
HLA-DRB1*1402, DQB1*0301	9/130 (.07)	1/130 (.007)	9.6	.01	JRA - Protection
HLA-DRB1*1402	11/130 (0.8)	2/130 (.01)	5.9	.01	JRA - Protection
HLA-DRB1*1602, DQB1*0301	1/130 (.007)	10/32 (.31)	58.64	.0000002	Systemic - JRA
HLA-DRB1*1602	1/130 (.007)	10/32 (.31)	58.64	.0000002	Systemic - JRA
HLA-DRB1*1104, DQB1*0301	1/130 (.007)	8/52 (.15)	23.4	.0002	Pauciarticular-JRA
HLA-DRB1*1104	2/130 (.01)	9/52 (.17)	13.6	.0002	Pauciarticular-JRA

Table 3. Aminoacid sequence at residue 70-74 of DRB1 chain (Shared Epitopes) associations of JRA in Colombian Mestizos

SE (Shared Epitope)	Associations	Controls	JRA	OR	p
⁷⁰ QARAA ^{74***} and ⁷⁰ QRRAA ^{74**}	Pauciarticular JRA (P)	41/130 (.31)	8/52 (.15)	2.5	.002
⁷⁰ DRRAA ⁷⁴	Pauciarticular and Systemic JRA (S)	3/130 (.02)	19/84 (.22)	12.4	.000002
⁷⁰ QRRAA ^{74**}	Polyarticular JRA (S)	29/130(.22)	16/46 (.34)	1.9	.02
⁷⁰ QRRAA ^{74*}	Polyarticular JRA (S)	18/130 (.13)	15/46 (.32)	3.0	.005

P : Protection

S : Susceptibility

⁷⁰DRRAA⁷⁴ (HLA-DRB1*1601, *1602, DRB1*1101, *1104)

⁷⁰QRRAA^{74*} (HLA-DRB1*0404, *0405, *0408, *0101, *0102)

⁷⁰QRRAA^{74**} (HLA-DRB1*0404, *0405, *0408, *0101, *0102, *1402)

⁷⁰QARAA^{74***} (HLA-DRB1*1501, *1502, *1503)

CONCLUSIONES

12. CONCLUSIONES

En la actualidad esta aceptada la asociación de genes del sistema MHC y de sus productos proteicos de los antígenos HLA con un significativo grupo de enfermedades. Algunos de estos alelos y /o haplotipos se encuentran en desequilibrio de enlace. En otro grupo de entidades estos genes y/o alelos HLA parecen estar comprometidos con el desarrollo de estas enfermedades y por consiguiente en la fisiopatología de las mismas.

En el caso de selectas enfermedades autoinmunes (Ej. : AR del adulto y espondilitis anquilosante) , se ha demostrado, que personas en donde se expresan ciertos alelos HLA tienen un riesgo relativo mayor al compararlas con individuos que no lo expresan. La naturaleza de la asociación ha sido documentada solidamente con el advenimiento de las técnicas moleculares, aunque los mecanismos moleculares no se han dilucidado en su totalidad. El enfoque actual ha permitido sustentar que en el Complejo trimolecular: TcR-peptido-MHC la presentación de un peptido endogeno u exógeno actuaría como un factor patogénico desencadenante y/o responsable del desarrollo de la enfermedad. Esto está claro en estudios de asociación de HLA y enfermedad cuando los individuos estudiados han sido de grupos étnicos homogéneos.

En el caso de la asociación de HLA y Artritis reumatoide Juvenil son muchos los trabajos de investigación que sustentan la hipótesis de que es una enfermedad

resultante de una alteración en los mecanismos moleculares asociados al papel y la función del complejo TcR-péptido-MHC en individuos con susceptibilidad genética. No existían hasta la fecha estudios de esta índole en grupos étnicos caracterizados por amplia carga génica mixta, en especial en pacientes y/o controles de mestizos Latinoamericanos.

Adicionalmente a las aplicaciones que tiene el estudio del sistema HLA arriba descritas están aquellas desarrolladas en el inmunodiagnóstico y en especial en el trasplante de órganos. En la actualidad no existe una técnica de alta eficacia y sensibilidad para aplicar al monitoreo y evaluación temprana de la viabilidad del trasplante. Se ha postulado que el estudio del microquimerismo genético, pudiera ayudar a estandarizar el uso de técnicas de detección de este microquimerismo en la evaluación de la viabilidad del trasplante. Esto fundamentó las actividades y el desarrollo experimental de la técnica formulada y estandarizada por el candidato de esta tesis.

12.1 El estudio del polimorfismo genético del sistema HLA que se desprende de los trabajos adelantados en el marco de esta tesis, realizado en grupos étnicos representativos del acervo genético Colombiana, nos permite decir en el área de HLA y Antropología que:

- La población mestiza de Colombia, expresa un componente genético MHC producto de la mezcla de los tres grupos asociados a su origen con un

predominio del componente amerindio.

- Nuevos alelos HLA clase I (C*0808), se han generado en las poblaciones Americanas, como producto del mestizaje Amerindio, caucasoide y negroide. Estos alelos probablemente están asociados a eventos de conversión génica.
- Haplotipos extendidos de origen caucasoide, amerindios y africanos, están presentes en los grupos Mestizos Colombianos y Afrocolombianos, lo que demuestra un efecto fundador en estas poblaciones expresando estos haplotipos ancestrales.

12.2 Otros resultados relacionados con el desarrollo de esta tesis permitieron trabajar en los campos de la aplicación clínica del HLA

- Pudimos describir por vez primera un método aplicado a la detección del microquimerismo a un nivel genómico. La identificación de microquimerismo, es esencial para confirmar la viabilidad y el éxito de un trasplante de órganos en especial el trasplante de medula ósea. La identificación del DNA de las células provenientes del donante en asociación con la carga genética del trasplantado en los tejidos trasplantados permiten asegurar la construcción de la quimera, que de manera indirecta, evalúa el éxito del procedimiento. Basados en lo anterior nosotros formulamos, diseñamos y estandarizamos un método para evidenciar el

microquimerismo fundamentado en la haploididad de los alelos HLA del donante y receptor. Para ellos se utilizó la metodología PCR-SSP en Tiempo Real. Demostramos con este protocolo que se puede detectar microquimerismo hasta un nivel de 0.1%. Este método es simple rápido y pudiera aplicarse en la detección de la distribución o formación de microquimerismos así como también en el monitoreo del trasplante en paciente que reciben un alotrasplante o trasplantes celulares.

12.3 La Artritis Reumatoide Juvenil es la enfermedad más común en la práctica reumatológica pediátrica y la menos estudiada inmunogenéticamente. A diferencia de la Artritis Reumatoide del adulto, la ARJ tiene ciertas variantes clínicas, lo que la hace más interesante desde el punto de vista genético (fenotipos). En Colombia y en Sur América, son escasos, sino ausentes, los trabajos realizados en el análisis inmunogenético de esta entidad.

En su etiopatogenia, se han identificado varios factores que en su conjunto explicarían el inicio y la perpetuación de la respuesta inflamatoria que afecta las articulaciones y tejidos vecinos, y que de no ser controlados llegan a destruirlos. Este proceso inflamatorio puede originar trastornos tisulares. Tal como sucede en otras enfermedades autoinmunes, la patogénesis de la enfermedad puede determinarse por alteraciones a nivel de complejo trimolecular, constituido por: un antígeno putativo, el receptor de linfocitos T y el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH).

- En estos estudios de asociación se utilizó la metodología PCR SSP y PCR SSOP para tipificar los alelos HLA Clase II: DRB1 y DQB1 con técnicas de alta resolución. Igualmente se utilizaron las mismas técnicas para la tipificación alélica de los HLA clase I.
- Los estudios llevado a cabo en el desarrollo de la tesis, permitieron adicionalmente estudiar la asociación de ARJ con los antígenos HLA clase I en pacientes afrocolombianos. Los resultados preliminares obtenidos, en resumen, muestran la ausencia de la enfermedad en este grupo poblacional. Se han encontrado muchas asociaciones con los antígenos HLA clase I del MHC con protección y susceptibilidad en artritis reumatoide juvenil de instalación temprana en caucásicos. No se habían desarrollados estos estudios en Afrocolombianos. Se describe la ausencia de la enfermedad en una muestra de niños colombianos representativas de una subpoblación de Afrocolombianos de Norte del País. Se hipotetiza una asociación entre el polimorfismo de MHC clase I con la carga génica de este grupo, con la ausencia de la enfermedad.
- Se evaluó la asociación de estos marcadores con los diferentes subgrupos clínicos de la Artritis reumatoide juvenil (ARJ). Los resultados descritos en los artículos que se presentan en esta tesis, describen la asociación de varios alelos y haplotipos HLA con susceptibilidad o protección a diferentes subtipos clínicos de ARJ. Se destaca el hecho de que estos estudios, en

niños que padecen de ARJ comparados con controles sanos, son los primeros en llevarse a cabo en una población mestiza Latinoamericana.

- Los resultados de la genotipificación son un aporte original para la comunidad científica que trabaja en Inmunogenética y en especial en la asociación HLA y ARJ.
- Se confirmaron hallazgos previos descritos en la literatura y se describen nuevas asociaciones. En resumen, los alelos HLADRB1*1104 y DRB1*1602 se evidencian como marcadores de susceptibilidad y los alelos HLA-DRB1*1501 y HLA DRB1*1402 se comportaron como alelos asociados con protección.
- Al comparar las asociaciones entre alelos y los diferentes subgrupos clínicos se encontró asociación entre ARJ oligoarticular con HLA-DRB1* 1104, ARJ poliarticular se asoció con el alelo HLA-DRB1* 0404 y en el grupo sistémico, el alelo más expresado fue el HLA-DRB1*1602. La presencia de Factor Reumatoide estuvo asociado con los alelos HLA-DRB1*0407 y HLA-DRB1*1302. En el grupo de pacientes con ANA+ solo hubo significancia estadística para el alelo HLA-DRB1* 0701.
- El subgrupo poliarticular mostró asociación con la secuencia aminoacídica ⁷⁰ QRRAA ⁷⁴ el cual incluye los alelos HLA DRB1*04, 01 y 1402.

- Con relación a la asociación haplotipos y subgrupos clínicos, se destacan dos nuevos hallazgos de interés: ARJ pauciarticular se asoció con el haplotipo cacausoide DRB1*1104, DQB1*0301, y el haplotipo Amerindio DRB1*1602, DQB1*0602, con AR sistémico. Es de resaltar que los alelos DRB1 de estos dos haplotipos comparten el epítipo ⁷⁰ DRRAA⁷⁴. Nuestros resultados sugieren que los estudios de asociación y susceptibilidad con enfermedades llevados a cabo en poblaciones mestizas, deben considerar la carga genética mixta de estos grupos, étnicos con el objeto de evitar factores de estratificación genética.
- Nuestros estudios muestran que los genes MHC y sus alelos HLA participan no solo en la susceptibilidad a desarrollar ARJ en este de grupos de mestizos Latinos sino también a la expresión clínica en la enfermedad.