



11281

52

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

T E S I S

**“POLIMORFISMO DE LOS GENES DE CLASE III DEL
COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y SU
DESEQUILIBRIO GENÉTICO CON ALELOS DE CLASE I Y CLASE
II EN PACIENTES MEXICANOS CON LUPUS ERITEMATOSO
GENERALIZADO”.**

**PARA PBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
P R E S E N T A:
JOAQUÍN ALEJANDRO ZÚÑIGA RAMOS**

**TUTOR:
DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A Carmen y Rodolfo, MIS PADRES, los seres más importantes en mi vida. Gracias por todo su amor, cariño y comprensión, los amo.

A mi tutor y amigo, Julio, gracias por su apoyo sincero.

México D.F., Noviembre 2002.

ÍNDICE

Sección	pag.
Introducción	4
Lupus eritematoso generalizado (LEG).....	4
Criterio diagnósticos de LEG.....	5
Genes candidatos de susceptibilidad en LEG.....	7
El complejo principal de histocompatibilidad.....	8
Estructura genética del complejo principal de histocompatibilidad.....	12
Estructura y nomenclatura de los genes HLA.....	13
Expresión y regulación de los genes HLA.....	14
Estructura de las moléculas HLA.....	16
Polimorfismo genético.....	18
Región captadora del péptido en las moléculas HLA.....	20
Genes HLA y susceptibilidad a LEG.....	22
Planteamiento del problema y Justificación	38
Hipótesis	40
Objetivo General	41
Objetivos específicos	41
Materiales y Métodos	42
Diseño del estudio	42
Población de estudio.....	42
Pacientes.....	42
Controles.....	42
Criterios de Selección de la muestra.....	43

Sección	pag.
Análisis estadístico.....	44
Consideraciones éticas.....	45
Procedimiento.....	46
Tipificación HLA.....	45
Polimorfismo de HSP70-2.....	47
Polimorfismo TNF- α	48
Resultados.....	49
Discusión.....	72
Conclusiones.....	80
Referencias.....	81
Anexo 1: Metodologías.....	91
Anexo 2: Formulas estadísticas.....	111
Anexo 3: Carta de Consentimiento.....	114
Anexo 4: Artículos Publicados.....	115

INTRODUCCIÓN

Lupus eritematoso generalizado (LEG).

El LEG es una enfermedad crónica autoinmune causada por la producción de autoanticuerpos patogénicos dirigidos contra antígenos nucleares. En los humanos el LEG presenta diversos síntomas clínicos que involucran múltiples órganos y sistemas. Esta heterogeneidad clínica es el reflejo del daño tisular mediado por autoanticuerpos así como la inflamación en la pared de vasos sanguíneos (llamada vasculitis), lo que origina el depósito de complejos inmunes. El LEG es particularmente frecuente en mujeres jóvenes en etapa fértil y se caracteriza por la aparición de fatiga intermitente, dolor en articulaciones e inflamación, erupciones en piel, disminución de glóbulos blancos, dolor torácico como resultado de pleuritis (Tabla 1) [1, 2]. Aproximadamente la mitad de los pacientes con LEG tienen manifestaciones graves de la enfermedad, entre ellas nefritis, vasculitis del sistema nervioso central, hipertensión pulmonar y enfermedad intersticial pulmonar. Existen formas clínicas de lupus que afectan solo la piel (lupus cutáneo) e incluso otras en forma generalizada inducidas por medicamentos. El diagnóstico de LEG generalmente es complicado debido a la enorme variabilidad de los síntomas clínicos. Por lo que para el diagnóstico, los pacientes deben mostrar al menos cuatro de once criterios para LEG [3]. La detección de anticuerpos antinucleares (ANA) es muy sensible para el diagnóstico de la enfermedad aunque algunos estudios han descrito la presencia de anticuerpos antinucleares en aproximadamente el 2 % de la población femenina sana mayor de 40 años.

Tabla 1.- Criterios para el diagnóstico de LEG.

Categoría	Síntoma
Criterios en Piel y Mucosas	<ul style="list-style-type: none">-Eritema malar “en alas de mariposa”-Eritema discoide,-Fotosesibilidad-Ulceras orales.
Criterios Generalizados	<ul style="list-style-type: none">-Artritis-Pleuritis o pericarditis-Proteinuria-ConvulsionesPsicosis sin otra etiología probable.
Criterios de Laboratorio	<ul style="list-style-type: none">-Anemia hemolítica-Leucopenia-Linfopenia-Trombocitopenia-Anticuerpos anti-DNA, anti-Sm-VDRL falso positivo-Anticoagulante lúpico-Anticuerpos antifosfolípido-Anticuerpos antinucleares.

La presencia de autoanticuerpos anti-DNA de doble cadena y anti-Sm es casi exclusiva de LEG, siendo su detección determinante para el diagnóstico. La enfermedad en su forma activa se acompaña de aumento en la velocidad de sedimentación globular (VSG) niveles elevados de reactantes de fase aguda en suero y niveles bajos de las proteínas del complemento C3 y C4. Los tratamientos actuales para LEG incluyen el uso de anti-malaricos como la hidroxicloroquina, esteroides y medicamentos citotóxicos como metotexate y ciclofosfamida. Aunque el abordaje terapéutico del LEG con este tipo de fármacos permite el manejo de la gravedad de la enfermedad, se ha observado que existen efectos colaterales deletéreos que junto con la enfermedad disminuyen de manera significativa la calidad de vida de los pacientes con LEG.[4]

En EUA se calcula que la incidencia anual de LEG es de 7.6 casos por cada 100,000, la tasa de prevalencia se calcula que es de 1 en 2,000 con una relación de 9:1 entre mujeres y varones, respectivamente [5], además se ha observado que la incidencia es 2 a 4 veces mayor de LEG en poblaciones no Caucásicas con relación a grupos Caucásicos [6]. Aproximadamente existen unas 364,000 mujeres con diagnóstico de LEG en los Estados Unidos un número similar que solamente cumplen con dos o tres de los 11 criterios para LEG. Además, la incidencia de la enfermedad parece ir en aumento.

Aunque se sabe poco de los factores responsables de la aparición de LEG, se ha establecido de manera fehaciente que la predisposición genética es un elemento clave en la susceptibilidad y desarrollo de LEG. Algunos factores como la agregación familiar sugieren que los descendientes de pacientes con LEG tienen un riesgo mayor de padecer la enfermedad con relación a la población general [7, 8]. La naturaleza multigenética de la susceptibilidad a LEG se ha estudiado sobre la base de modelos de concordancia de la

enfermedad en pares de gemelos monocigóticos en los que se ha observado hasta un 34 % de concordancia comparado con gemelos dicigóticos de solo 3 % [9, 10].

La complejidad clínica del LEG se relaciona directamente con la heterogeneidad genética, en la cual el mismo fenotipo es el resultado del efecto combinado de diferentes genes y/o de sus alelos. Por ejemplo, la misma manifestación clínica de LEG en diferentes pacientes y en diferentes modelos murinos podría estar determinada por un grupo diferente de genes contribuyentes. El estudio de las bases genéticas de lupus se ha hecho más complicada por el hecho que los alelos que predisponen a la enfermedad autoinmune son particularmente frecuentes en la población general.

Genes Candidatos de susceptibilidad a LEG.

Debido a las evidencias de la relevancia genética en la susceptibilidad a LEG se han publicado cientos de estudios donde se intenta localizar genes determinantes en la susceptibilidad y su contribución en el curso clínico [11]. La mayoría de estos estudios se han realizado con un diseño de casos y controles. Aunque los estudios de asociación son estadísticamente poderosos, generalmente están sujetos a los problemas en la estructura genética de la población, la deriva genética donde las diferencias en la frecuencia de alelos entre pacientes y sanos parecen ser resultado de diferencias históricas más que de asociación real alelo-enfermedad [12]. Básicamente la mezcla genética y los estudios realizados con muestras pequeñas han influido de manera negativa en la asignación correcta de los genes primarios en la susceptibilidad a LEG. Sin embargo debido al polimorfismo característico de ciertos sistemas genéticos como los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), existen evidencias claras de la relevancia en la predisposición a LEG en diversas poblaciones [13].

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC).

Organización Genética.

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) está formado por un grupo de genes, algunos de ellos relacionados entre sí funcional y estructuralmente. En el humano el MHC se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 específicamente en la banda 6p21.3. Este complejo ocupa aproximadamente 4 megabases (Mb) de DNA (1 megabase contiene 1 millón de pares de bases). El MHC está dividido de manera arbitraria en tres regiones designadas como clase I, II y III mismas que en conjunto contienen aproximadamente 120 loci. La región de clase I se encuentra en el extremo más telomérico del MHC, ocupa aproximadamente 2 Mb y hasta ahora se conocen 25 loci, aunque se calcula que podría contener más de 50. La región de clase II es la más centromérica del MHC, tiene una extensión de aproximadamente 0.8 Mb y contiene unos 34 loci. La región de clase III está distribuida entre los genes de clase I y de clase II, ocupa unas 2.2 Mb y contiene 63 loci. Se calcula que aproximadamente el 10 % de la secuencia de DNA del MHC codifica para proteínas funcionales, pero la función del 90 % restante se desconoce [14], **Figura 1.**

Las regiones del MHC contienen a los genes HLA, término que proviene del inglés (*Human Leukocyte Antigens*), los cuales codifican para proteínas que se expresan en la superficie celular que presentan péptidos procesados al receptor de las células T (TCR). Algunos de esos genes parecen haber perdido esa función ya que la estructura de la proteína sugiere que en algún momento tuvieron la capacidad de presentar péptidos. La estructura de las proteínas codificadas por esos genes es muy distinta a la estructura de las proteínas codificadas por los genes HLA clásicos (HLA-A, B, C). Lo anterior sugiere que entre estos genes no hay necesariamente una conexión evolutiva directa pero como las proteínas tienen funciones inmunológicas precisas, algunos profesionales los consideran como genes

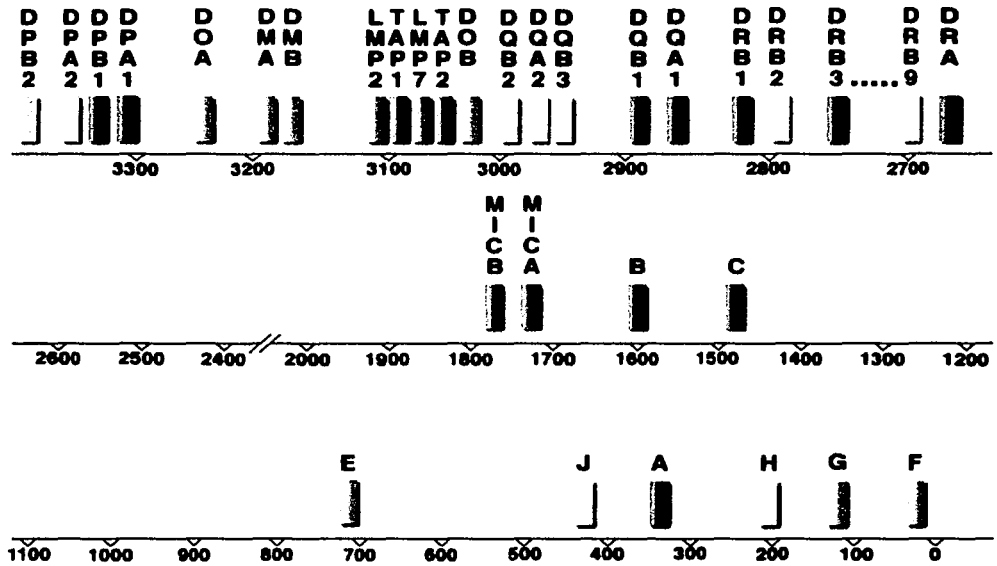
funcionalmente relacionados [15]. Algunos mamíferos placentarios tienen una organización de los genes del MHC similar al humano, otros difieren considerablemente del prototipo humano, aún entre individuos de la misma especie (esto incluye a los humanos) pueden diferir en el número y arreglo de los genes del MHC que portan. Está claro que algunas asociaciones son las mismas que las observadas en el humano, sin embargo en los pájaros o en animales marinos vertebrados, los genes del MHC están entremezclados con otros genes que no forman parte del MHC e incluso están distribuidos por todo el genoma [16].

En la región de clase I, los loci HLA están entremezclados con otros loci no relacionados y cuya función inmunológica se desconoce, algunos ejemplos de ellos son el locus que codifica para la cadena β tubulina, la proteína GTP-binding, el factor de transcripción octamer-binding entre otros. De los loci HLA de clase I, se sabe perfectamente que ocho de ellos están ocupados por genes funcionales (HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, MICA y MICB), cuatro por pseudo genes (HLA-H, -J, -K y L), cuatro por pseudogenes truncados (HLA-75, -16, -80 y -90) y tres por fragmentos de genes (HLA-17, -21 y -30) [17]. Los genes HLA de clase I se dividen en dos categorías: clase Ia y clase Ib, los de clase Ia (genes clásicos; HLA-A y -B) unen péptidos y los presentan al receptor de los linfocitos T, estas proteínas se expresan en la superficie de las células somáticas pero en mayor cantidad en células linfoides y en poblaciones humanas tienen un alto grado de polimorfismo. Las proteínas codificadas en los genes de clase Ib (genes no clásicos; HLA-E, -F, -G) presentan péptidos a un subgrupo de células T, el patrón de expresión en los tejidos es distinto al de las moléculas Ia y presentan un número reducido de variantes o alelos (bajo polimorfismo) [18]. El locus HLA-C parece estar en medio de esta clasificación ya que la proteína presenta péptidos bajo condiciones fisiológicas que aún no están muy claras, además que su expresión es baja y el número de alelos es menor con relación con los loci HLA-A y HLA-

B. Los loci HLA-E, -F, -G parecen tener aún restos de funcionalidad o bien se han especializado en presentar ciertos péptidos y con otros ligandos (en el ratón algunas moléculas clase Ib aparentemente se han especializado en presentar péptidos codificados en genes del DNA mitocondrial. Al final de la lista están pseudogenes recientemente inactivados y pseudogenes truncados (fragmentos de genes) [19]. La región de clase II contiene una gran cantidad de genes tales como los LMP2 y LMP7 que codifican para subunidades de proteasomas y los genes TAP1 y TAP2 que codifican para proteínas transportadoras de péptidos, también se encuentra el pseudogen HLA-Z1 y los genes HLA de clase II que están clasificados en cinco familias: HLA-DP, -DN, -DM, -DO, -DQ y -DR. En cada una de estas regiones existen genes, A y B que codifican las cadenas polipeptídicas alfa y beta respectivamente. Las moléculas HLA de clase II son heterodímeros formados por una cadena alfa y otra beta, las dos cadenas provienen de la misma familia; así por ejemplo la cadena DP alfa se asocia con una cadena DP beta y DM alfa con DM beta. Con respecto a la familia DR, todos los humanos tienen un locus DRA (DR alfa) pero difieren en el número de loci DRB por cromosoma pueden ser de 2 a 5. Se conocen nueve loci DRB: HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5 que son funcionales y por otro lado el HLA-DRB2, -DRB6, -DRB7, -DRB8 que son pseudogenes y HLA-DRB9 que es un fragmento de gen. Los diferentes números y combinaciones de los genes DRB define varios haplotipos HLA-DR [20]. La región de clase III contiene genes que están principalmente involucrados en la inmunidad natural. En primer lugar encontramos genes que codifican a los componentes iniciales de la cascada del complemento como el C4, el C2 y el factor B, así como los genes del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la linfotoxina. Además

existen otros genes como los de las proteínas de choque térmico, la 21-hidroxilasa, la sintetasa valil-tRNA entre otros [21, 22].

Figura 1.- Estructura del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en el brazo corto de cromosoma 6.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Estructura y nomenclatura de los genes HLA.

En el sistema HLA los genes se designan por letras capitales y series de números. La primer letra (D) identifica el gen (locus), la segunda letra especifica a la familia de donde proviene (M, N/O, P, Q y R) y la tercer letra indica el tipo de gen (A para alfa y B para beta). El primer número que sigue de esas tres letras especifica el locus y el resto de los números denotan el alelo. La designación del locus (letras) y el alelo (números) están separados por un asterisco (*). La nomenclatura de las moléculas de clase I sigue reglas semejantes, lo que difiere es el número de locus, por ejemplo HLA-A*0201 la cual es el alelo 1 del locus A2 [23]. Tanto los genes de clase I como de clase II están divididos en exones e intrones; el gen completo excepto su región reguladora es transcrito en RNA pero los intrones son removidos durante el procesamiento del transcrito primario [24]. La organización de los exones e intrones de los genes HLA de clase I es muy similar al de otras especies de vertebrados. Cada gen de clase I consiste de 6 o 7 exones, el exón 1 abarca la región 5' no traducida (5'UT) y un pequeño espacio de DNA que codifica el péptido señal (líder). La región 5'UT es transcrita a RNA que forma parte de la secuencia de mRNA pero no es traducida a proteína. El péptido líder es el responsable del paso de la proteína a través de la membrana durante la síntesis en el retículo endoplásmico, después de esto el péptido líder es eliminado ya que no aparece en la proteína madura. Los exones 2, 3 y 4 codifican para tres dominios denominados $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ respectivamente. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ contienen los sitios que unen a los péptidos producidos durante el procesamiento de otras proteínas; estos sitios se les llama dominios fijadores del péptido. El dominio $\alpha 3$ tiene una estructura característica que también existe en las moléculas de inmunoglobulina de ahí su nombre como "dominio semejante a inmunoglobulina". El exón 5 codifica para la

región transmembranal de la molécula. Los exones 6 y 7 codifican para la región citoplásmica (cola). En cuanto a los genes de clase II hay alguna variación en su organización genética entre los vertebrados, pero generalmente en los mamíferos los genes A consisten de 5 exones y los genes B de seis. En ambos genes el exón 1 contiene a la región 5'UT y la secuencia que codifica al péptido señal, el exón 2 codifica el dominio $\alpha 1$ (genes A) o el $\beta 1$ (genes B), estos dominios contribuyen a la región captadora del péptido de la molécula de clase II; el exón 3 codifica para los dominios ($\alpha 2$ y $\beta 2$); los exones restantes codifican para el péptido de conexión, la región transmembranal e intracitoplásmica [25], (**Figura 2**). Los genes HLA se heredan en bloque en forma de haplotipos (término que proviene de células haploides), por lo que cada individuo tiene una combinación de genes que segregaron del padre y otro haplotipo materno, **Figura 3**.

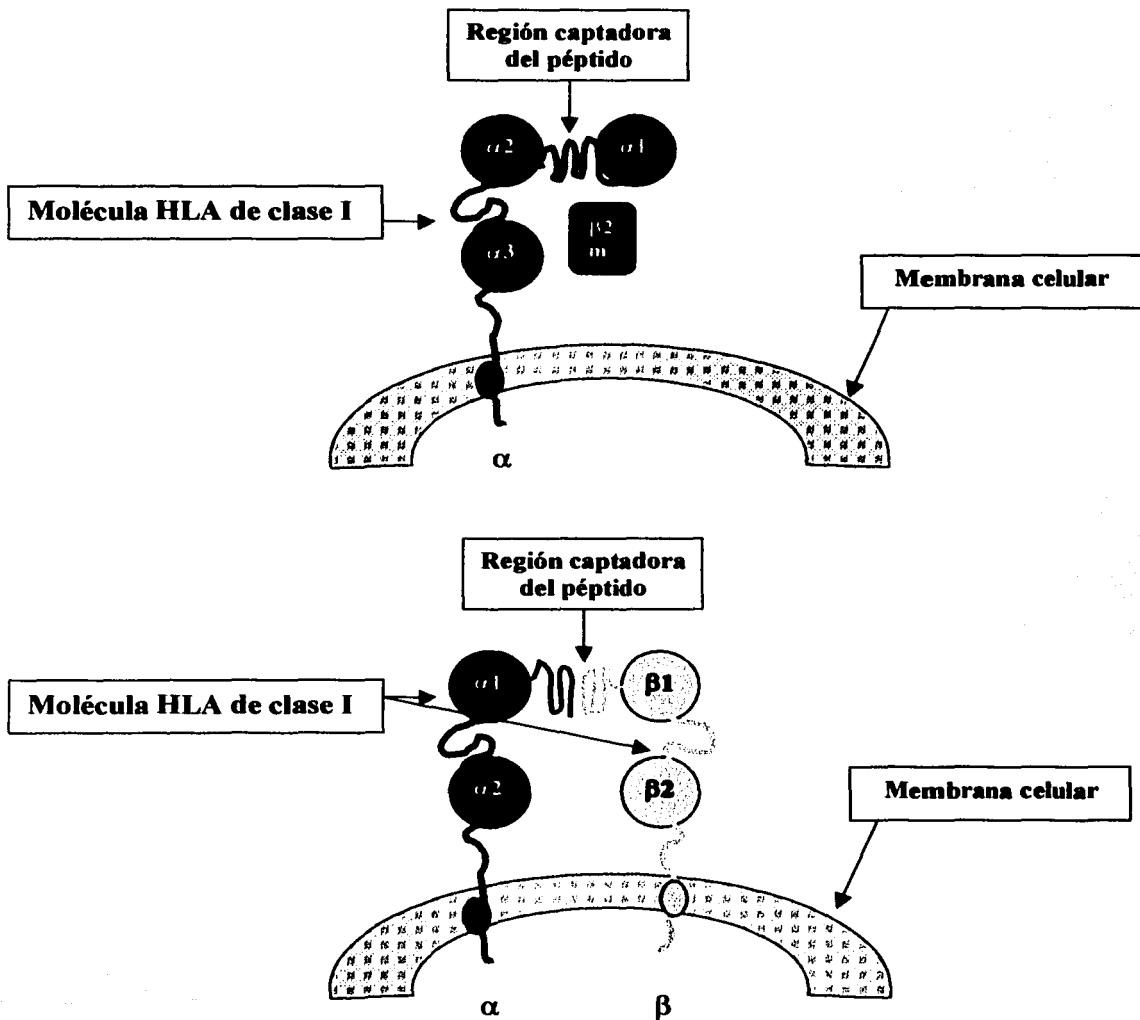
Expresión y Regulación de los genes HLA.

Los genes clase Ia se expresan en la mayoría de las células somáticas adultas. Sin embargo hay algunas excepciones que incluyen a las neuronas, células del páncreas exócrino, células del miocardio, espermatozoides en ciertas etapas de desarrollo y ciertas células de la placenta. Las moléculas de clase I no se expresan en la superficie de huevos no fertilizados y en células de embriones recién formados. Entre todas las células somáticas adultas, los linfocitos T y B expresan niveles altos de moléculas clase Ia con relación a otras células que generalmente expresan niveles bajos. La expresión puede aumentar o disminuir por el estímulo de factores como las infecciones virales y citocinas por ejemplo los interferones.

La expresión de los genes clase Ia está regulada por secuencias "corriente arriba" de la región codificante. Las secuencias cortas se denominan "motifs" o cajas. Estas secuencias son sitios que se unen a las proteínas encargadas de iniciar la transcripción del DNA en

RNA. Las proteínas generalmente denominadas factores de transcripción o factores nucleares porque se encuentran en el núcleo de la célula y pueden acelerar o frenar el proceso de la transcripción [26].

Figura 2.- Estructura de las moléculas HLA de clase I y de clase II.

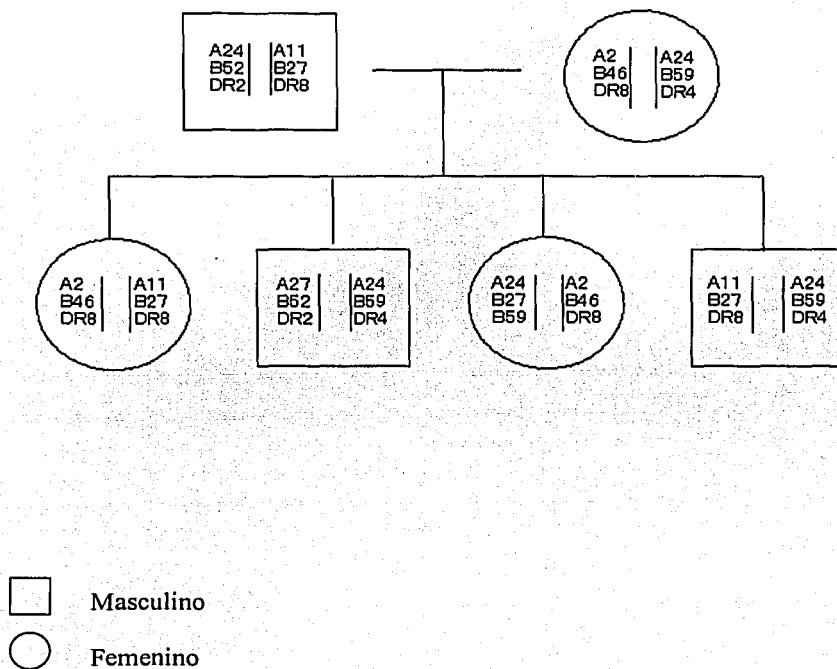


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Algunos factores son específicos para ciertos genes o específicos para células, mientras que otros actúan sobre diferentes genes o diferentes tipos de células. La región que regula la transcripción se encuentra “corriente arriba” del sitio donde inicia la transcripción, aunque algunos motifs reguladores pueden estar localizados en otras partes del gen, por ejemplo en los intrones. La región reguladora corriente arriba puede dividirse en dos partes, los promotores y la aumentadora (enhancer) [27]. El promotor actúa a una corta distancia (en mamíferos, el promotor está a unas 35 pares de bases del sitio de inicio de transcripción), el promotor siempre está en el extremo 5' y opera solamente en la orientación correcta. Este contiene dos motifs que también se observan con frecuencia en otros genes, la caja TATA y la caja CCAAT. Las secuencias aumentadoras operan a distancias de varias kilobases, independientemente de la orientación y localización de los extremos 5' o 3' del gen. Estas regulan la actividad del promotor, la misma secuencia “motif” puede actuar en diferentes genes y en diferentes tipos de células. Los elementos reguladores que controlan la expresión de genes de clase II están bien caracterizados, estos se ubican en el segmento corriente arriba del sitio de inicio de transcripción y en el primer intrón del gen DRA [28]. La región reguladora puede dividirse en dos partes, la proximal y la distal (relativa al sitio de inicio de transcripción). La región proximal es necesaria pero no suficiente para la expresión constitutiva de los genes de clase II en los linfocitos B y en el aumento en la expresión basal por la acción de IFN-gamma [29]. La región proximal (que se refiere a la región promotora) contiene además de las cajas TATA y CCAAT una serie de secuencias motif designadas por varias letras del alfabeto (O, Y, X, X2, P, Z y V). La caja TATA está presente en todos los genes de clase II pero no tiene mucha relevancia en la expresión de estos genes. Por otro lado la caja CCAAT está presente en algunos genes de clase II. Cerca de la caja TATA “corriente arriba” se encuentra la secuencia octámero (O), la cual consiste

de ocho nucleótidos, esta secuencia se ha encontrado en otros genes incluyendo los de las inmunoglobulinas.

Figura 3.- Segregación de los genes HLA en un árbol genealógico.



La caja Y tiene la secuencia 5'-CTGATTGGCC-3'. La caja X consiste en dos motifs parcialmente sobrepuestos, X y X2 los cuales se unen a distintos factores de transcripción, aunque X2 se encuentra en unos cuantos genes de clase II. La caja Z varía en su secuencia y designación en distintos genes. Esta contiene al menos 2 secuencias motifs, el primero de ellos denominado Z o SRV2 (GGACCC) y Z2 o SRV1 (GGACAC). Los elementos distales no están aún bien caracterizados. Estos son los responsables de la expresión constitutiva de los genes clase II en los linfocitos pero su función parece estar regulada por los elementos proximales [29].

Polimorfismo Genético.

El polimorfismo del MHC tiene 2 aspectos notables: el primero que es extenso y en segundo lugar es un polimorfismo natural. Una situación que se repite en algunos genes polimórficos es que uno o dos alelos se encuentran con mayor frecuencia y los alelos adicionales se encuentran con poca frecuencia [30] Sin embargo, el polimorfismo de los loci del MHC se caracteriza por la enorme cantidad de alelos de cada locus y porque muchos de estos alelos se encuentran con frecuencias similares. Según el último reporte de nomenclatura de genes de HLA se conocen 209 alelos de HLA-A, 414 alelos de HLA-B, 101 alelos del locus HLA-C, 273 alelos de HLA-DRB1, 45 alelos de HLA-DQB1 y 93 de HLA-DPB1, entre otros [31], **Tabla A.**

Tabla A.- Alelos de los loci del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).

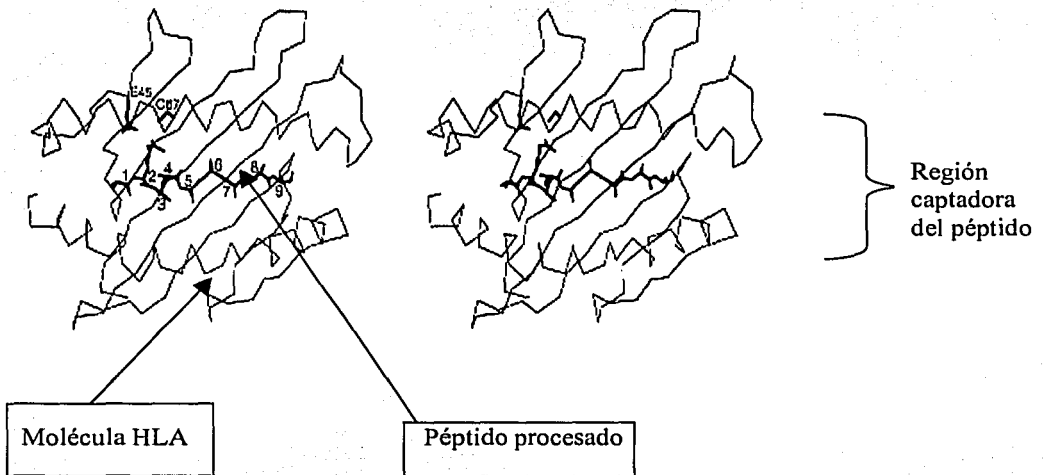
Numbers of alleles with official names at each locus by 31 December 2000

<u>Locus</u>	<u>Number of alleles</u>	<u>Locus</u>	<u>Number of alleles</u>
HLA-A	209	HLA-DRB8	1
HLA-B	414	HLA-DRB9	1
HLA-C	101	HLA-DQA1	21
HLA-E	6	HLA-DQB1	45
HLA-F	1	HLA-DPA1	19
HLA-G	15	HLA-DPB1	93
HLA-DRA	2	HLA-DOA	8
HLA-DRB1	273	HLA-DOB	8
HLA-DRB2	1	HLA-DMA	4
HLA-DRB3	30	HLA-DMB	6
HLA-DRB4	10	TAP1	6
HLA-DRB5	15	TAP2	4
HLA-DRB6	3	MICA	51
HLA-DRB7	2		

Tomado de Marsh SGE, Tissue Antigens 2001; 57:236-283.

La variabilidad de los loci de HLA de clase II se localiza principalmente en el exón 2, mientras que en los genes de clase I el polimorfismo radica en los exones 2 y 3. **Figura 4.**

Figura 4.- Región captadora del péptido de las moléculas HLA.



Además, dentro de esos exones la variabilidad se concentra solo en ciertos sitios, mientras que el resto de la secuencia permanece constante. Aunque se piensa que la variabilidad tiene un significado funcional es importante evaluar cuanto de la variabilidad de los nucleótidos se traduce en diferencias en la proteína [32].

Todos los alelos HLA presentes ahora en la población humana provienen de un solo gen a partir del cual en la progenie gradualmente se acumularon sustituciones y éstas divergieron en linajes a través de las líneas de descendencia. La evolución de los linajes alélicos trascendió a la evolución de las especies. Este modo de evolución trans-específico es el responsable del polimorfismo característico de los genes dentro del MHC, el cual en los diferentes loci del MHC aparentemente se generó en momentos históricos diferentes; así por ejemplo, los linajes en el locus HLA-DRB1 se generaron hace 2030 millones de años aproximadamente; los del HLA-A hace unos 510 millones de años y el HLA-C después de la aparición del *Homo sapiens* (menos de 1 millón de años) [33]. El destino final de una nueva mutación en un gen determinado, puede ser su extinción o su fijación. Una mutación neutral no persiste como un polimorfismo más allá de 4 generaciones. Los alelos del MHC han persistido mucho más que cuatro generaciones obviamente éstas no son mutaciones neutrales. Existen evidencias de que la evolución de los alelos MHC tiene una importante influencia de la selección natural [34].

Los cambios sinónimos no alteran la secuencia de aminoácidos de una proteína y por lo tanto no son afectados por la selección, Sin embargo los cambios no sinónimos son deletéreos porque al afectar la secuencia de aminoácidos usualmente reduce u oblitera totalmente la funcionalidad de la proteína y por ende, estos genes son eliminados por selección negativa o selección purificadora en un gen en el que esos dos tipos de cambios ocurren la proporción de sustituciones sinónimas es mayor que la proporción de

substituciones no sinónimas ($dS > dN$). Muchos genes que se han analizado muestran este patrón de preponderancia de substituciones sinónimas sobre las no-sinónimas. Sin embargo en ciertas partes de los genes del MHC se observa lo contrario, es decir que en la región que codifica para la región captadora del péptido las substituciones no sinónimas son más frecuentes ($dN > dS$). Esta acumulación preferencial de substituciones no-sinónimas puede ser resultado de selección positiva la cual favorece la diversificación de la región captadora del péptido [35].

Genes HLA y la susceptibilidad a lupus eritematoso generalizado (LEG).

La premisa de que los factores genéticos están involucrados en el lupus eritematoso generalizado (LEG) se basó originalmente en las observaciones de una mayor frecuencia de LEG entre gemelos monocigóticos [10, 36] y entre familiares en primer grado [37], además de una mayor frecuencia de anomalías inmunológicas en familiares de pacientes con LEG. [38, 39]. Sin embargo, ahora sabemos que la susceptibilidad a LEG no está determinada por un solo gen, de hecho con base en modelos matemáticos, se ha propuesto la participación de al menos cuatro genes en la susceptibilidad a LEG [40].

Después del descubrimiento de la influencia de los factores genéticos en un buen número de enfermedades autoinmunes, parecía lógico estudiar a los genes en los pacientes con LEG. Como resultado de ello se han realizado un gran número de estudios donde se analiza la frecuencia de genes asociados con los componentes clásicos del sistema inmune (genes MHC, complemento, receptor de células T e inmunoglobulinas).

Las asociaciones entre el LEG con varios loci del MHC y sus respectivos alelos en diferentes países se resumen en la Tabla 2. El haplotipo HLA-B8-DR3 se asocia con LEG en la población caucásica, particularmente en: Australia, Canadá, Inglaterra,

Checoslovaquia, Francia, Alemania, Hungría, Italia y Suiza. Los haplotipos que contienen HLA-DR2 y HLA-DR3 se han asociado con LEG en Bulgaria, Rusia y Estados Unidos. En la población de Grecia el lupus se asocia con HLA-DR2 con el HLA-DQ6 en Franco-Canadienses, con el DR4 en Indígenas, en la población española se asocia con el haplotipo HLA-B18-DR3. En los Afro-Americanos el LEG está asociado con DR2 y DR3. Es necesario resaltar que prácticamente no se observa LEG en África Central y del Este [41]. Por otro lado, en países orientales como China el LEG está asociado con el DR2 y DR3 y solamente con DR2 en Japón, Corea y Singapur, en estos últimos países se ha observado una fuerte asociación del LEG con los haplotipos extendidos (DRB1-DRB5-DQA1-DQB1) que contienen el alelo DRB1*1501, lo anterior en mayor proporción que cuando se analizan los alelos por separado. El estudio de las proporciones de homocigocidad ha revelado que el LEG no está asociado a la homocigocidad de los loci o haplotipos HLA de clase II en pacientes de Europa Central [42].

Por otro lado, las deficiencias de los componentes del complemento también se han asociado con LEG. El estado heterocigoto para la deficiencia del cuarto componente del complemento C4A se observa con cierta frecuencia en pacientes Australianos, Anglo-Canadienses, Ingleses, Alemanes, y también se han reportado algunos estudios en Chinos, Franceses, Japoneses y Norteamericanos. En pacientes de Taiwán, España y Canadá no se observó un incremento en la frecuencia de las deleciones de C4. La frecuencia de LEG en pacientes homocigotos para la deficiencia de los componentes iniciales del complemento (C1q, C4 y C2) es al menos del 50 % [43, 44], rara vez el LEG se ha asociado con las deficiencias de los componentes de la activación final de la cascada del complemento [43, 44].

En la Tabla 3, se muestran las asociaciones de anticuerpos con genes MHC en pacientes con LEG. En resumen, los anticuerpos anti-DNA se asocian con DR2, DR3 y DR7; anticuerpos anti-Sm con DR2, DR4, DR7 y DQ6; anticuerpos anti-RNP con DR4, DQ3, DQ5 y DQ8; anticuerpos anti-Ro con DR2 y DR4; anticuerpos anti-La con DR3 y DR8; y los anticuerpos anti-fosfolípido con DR4, DR7, DQ6 y DQ7.

Todos los estudios citados sugieren que el LEG tiene un patrón de herencia muy complejo. Los estudio de concordancia de la enfermedad en gemelos sugieren que al menos cuatro genes están involucrados en la susceptibilidad a LEG. Además, los estudios en modelos murinos como el ratón de Nueva Zelanda, sugieren un patrón poligénico de la herencia donde están involucrados al menos 8 loci [45]. Hasta ahora el hallazgo de los genes responsables de esa susceptibilidad ha sido difícil, en primer lugar existe la necesidad de uniformar los criterios para LEG. Estos criterios fueron revisados por el American College of Rheumatology (ACR) [46]. Es importante recordar que la frecuencia de las manifestaciones clínicas de LEG varía en cada grupo étnico [47]. Con lo anterior se puede especular que el lupus es un grupo de síndromes relacionados entre sí que se expresan de manera distinta en diferentes razas/étnias/países cada uno de ellos con un fondo genético característico. No obstante el uso de los criterios de la ARA se ha podido demostrar el efecto de la étnicidad en las asociaciones genéticas con el LEG. Dichos estudios han demostrado diferencias en la genética de LEG entre Ingleses y Franco-Canadienses de Ottawa [48] y entre Ingleses/irlandeses e Irlandeses de Boston [49]

En estos estudios de asociación se ha puesto particular interés en los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Esas asociaciones pueden ser resultado del desequilibrio genético entre algunos de los genes del MHC y los genes de susceptibilidad. Se han propuesto varias hipótesis con respecto a la fisiopatología del lupus y los genes del

MHC: 1) dada la relevancia de los genes del MHC en la inmunoregulación, las proteínas producto de los genes del MHC podrían influir los procesos de selección negativa o selección positiva de clonas de tipo Th1 o Th2; 2) y/o que ciertos alelos MHC en particular tengan la capacidad de presentar péptidos patogénicos al receptor de las células T. Es interesante que los individuos HLA-DR2 y/o DR3 positivos tienden a generar un patrón de respuesta inmune que difiere a las presentes en individuos con otros alelos DR, desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo. En la población caucásica el haplotipo extendido A1-B8-SC01-DR3-DQw2 está presente en un número importante de los pacientes con LEG, esta asociación es más fuerte con relación al análisis de cada uno de los alelos. Esta fuerte asociación con haplotipos más que con alelos individuales tiene implicaciones importantes: 1) el mapeo de esta región podría revelar la ausencia de locus con riesgo relativo elevado para LEG; 2) bien podría considerarse un nuevo papel biológico de un haplotipo extendido con relación a cada uno de los loci que lo componen; 3) también se puede considerar el efecto biológico de varios componentes de dicho haplotipo del MHC incluyendo al HLA y la respuesta inmunológica incluyendo a las clonas Th1 y Th2; el procesamiento de antígenos asociado con las proteínas TAP y LMP; complemento e inflamación; inflamación mediada por choque térmico y las HSP70; TNF e inflamación; 21-hidroxilasa y metabolismo de esteroides.

En una enfermedad tan compleja como el LEG podría considerarse una penetrancia incompleta de algunos genes; es posible que algunos genes necesiten un umbral determinado para ser efectivos o que algunos genes solamente podrían representar genes de susceptibilidad que pudieran generar un efecto deletéreo en presencia de genes adicionales [50]. Cuando un gen de susceptibilidad es muy frecuente en una población se hace difícil la interpretación de la influencia de ese gen en los pacientes [50]. Lo anterior es importante en

las poblaciones donde los alelos DR2 o DR3 son frecuentes pero su frecuencia es mayor en pacientes con LEG.

Esos genes DR pueden representar uno de muchos grupos de genes que tengan influencia en el desarrollo de LEG, sin embargo la demostración de dicho efecto es difícil.

Para abordar el estudio de los genes asociados con LEG, se han estudiado características inmunológicas de la enfermedad con relación a los patrones de autoanticuerpos y se ha logrado demostrar algunas diferencias en las asociaciones entre autoanticuerpos y genes del MHC [51]. Esta diversidad puede ser un reflejo de las diferencias genéticas de los grupos étnicos en los que se realizaron los estudios pero también pueden ser el resultado del uso de distintas metodologías lo cual podría deberse a diferencias en la especificidad de los autoanticuerpos. Dichas diferencias en las especificidades obviamente están determinadas por formas variables de control genético. A este respecto encontramos que el LEG y el lupus neonatal están asociados con el DR3 y con los anticuerpos anti-Ro y el DR4 está asociado con el lupus inducido por hidralazina [52]. En el lupus murino, la esplenomegalia, la enfermedad renal, anticuerpos anti-cromatina y la mortalidad están asociadas con genes específicos en los ratones de Nueva Zelanda [45], mientras que el gen fas está asociado con linfadenopatía en los ratones MRL/lpr [53]. La cepa (NZB/NZW)F1 desarrolla anticuerpos anti-DNA y nefritis pero no se observa la aparición de anticuerpos anti-Sm, mientras que los ratones MRL desarrolla linfadenopatía y anticuerpos anti-Sm [54].

Hasta ahora se tiene un concepto incompleto del papel de los factores genéticos involucrados en la susceptibilidad de las enfermedades autoinmunes, por esto con los avances en el conocimiento de la complejidad del sistema inmune, muchos investigadores han comenzado a estudiar a otros factores tales como las citocinas, moléculas de adhesión,

inductores de apoptosis, hormonas, reguladores de la tolerancia celular, la selección positiva y negativa, mecanismos reparadores de daño inmunológico [55].

Con esa perspectiva se han encontrado genes que afectan la producción de citocinas, apoptosis y la señalización celular relacionados con la fisiopatogenia de LEG.

Otra herramienta que utiliza las asociaciones gen-enfermedad es el análisis de ligamiento de marcadores de microsatélites [55]. Tanto en cepas de ratones como en estudios en familias con más de un caso de LEG. Una vez que se detecta el ligamiento de los microsatélites en alguna región cromosómica con la enfermedad o con algún aspecto de la misma, es posible comenzar un análisis de mapeo en esa región para detectar los genes putativos que pudieran ser relevantes. Esta metodología ha permitido la identificación de genes candidatos cercanos a los microsatélites que están asociados con distintos aspectos de la respuesta inmunológica en particular en los modelos de lupus murino, estos marcadores sugieren la existencia de múltiples regiones de susceptibilidad como el MHC, TNF, MBFR (factor de maduración de respuesta de células B), proteína-quinasa de linfocitos, IFN-alfa y beta, receptor de TNF, IL5, y su receptor, TFG, bcl, CD28, proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos, IL-10, factor H del complemento, selectinas, ligando de fas, IL4, p53 [55].

Muchos otros genes entre ellos los del TNF, HSP70, receptor de células T, IL-10, TAP y prolactina se han estudiado con relación al LEG [56, 57, 58, 59]. Sin embargo, el papel de dichos genes en la fisiopatogenia de LEG no está claro. Se han propuesto varias hipótesis, actualmente una de las más aceptadas es la del desequilibrio genético de genes de susceptibilidad. Las asociaciones genéticas con LEG varían de acuerdo al grupo étnico, lo cual sugiere que la etnicidad es un factor importante en la predisposición a LEG.

La población mestiza mexicana se ha definido como aquellos individuos descendientes de una mezcla de habitantes autóctonos con individuos procedentes de otros grupos étnicos, principalmente los españoles y los negros. En estudios realizados anteriormente donde se utilizaron marcadores genéticos de varios cromosomas se reportó que la población mestiza mexicana esta conformada por una proporción de 56 % de genes de origen Indígena, 40 % de genes caucasoides y un 4 % de genes negros [60, 61, 62].

Recientemente se han descrito varios polimorfismos en la región promotora del TNF- α . El primero de ellos está localizado en la posición -238 relativa al sitio de inicio de transcripción, en el cuál la presencia de adenina (A) define al alelo TNFA⁻²³⁸; mientras que la presencia de guanina (G) define a la "variante silvestre" y a la más común TNFG⁻²³⁸. Por otro lado el segundo polimorfismo está localizado en la posición -308; la presencia de G define al alelo TNF1⁻³⁰⁸ y la presencia de A determina el alelo TNF2⁻³⁰⁸ [63, 64].

Se ha demostrado que esas diferentes formas alélicas tienen implicaciones funcionales. Así, el alelo TNF2⁻³⁰⁸ se ha asociado con una tasa de transcripción dos veces mayor que la del alelo TNF1⁻³⁰⁸ en modelos experimentales con "genes reporteros". También se ha observado que el polimorfismo -308 G/A está asociado con alteraciones en la expresión del gen de TNF- α con el haplotipo extendido HLA-A1, B8, DR3 en individuos caucásicos [65].

Diversos polimorfismos en la región promotora del gen TNF- α se han asociado con la patogénesis de LEG, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante en varias poblaciones como la negra o la caucásica. En la población caucásica el TNF2 -308 se ha asociado con susceptibilidad a LEG [66, 67]. Por otro lado en la población Afro-Americana se ha sugerido que el TNF2 contribuye de manera independiente a la susceptibilidad determinada

por los alelos HLA-DR y además no se observan patrones de distribución específicos entre genotipos HLA y el TNF2 [56]. En los caucásicos el TNF2 está en desequilibrio genético con el HLA-DR3 [68, 69].

El gen de la proteína de choque térmico (HSP70-2) codifica una proteína altamente inducible importante para la reparación ensamblaje y transporte de proteínas a nivel intracelular [70]. Los genes estructurales están contenidos en el MHC entre el gen de C2 y los genes del TNF [71]. En varios estudios se ha propuesto la importancia de estos genes en la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades autoinmunes. En los estudios de los genes HSP70 en pacientes con LEG, algunos estudios sugieren que el alelo HSP70-2B tiene un efecto totalmente independiente en la susceptibilidad a LEG en individuos de origen Afro-Americano [72]. Sin embargo en otros estudios básicamente la asociación se debió al desequilibrio genético entre los genes de HSP70-2 y el HLA-DR3 o la delección C4AQ0 [73].

Tabla 2.- Asociaciones de MHC con LEG.

<i>País</i>	<i>Grupo Étnico</i>	<i>Asociación</i>
Austria	Caucásico	DR3
Australia	Caucásico	Haplotipo B8-DR3; B8/B27; B15/B35
	Caucásico	DR3
	Caucásico	C4AQ0
Brasil	Caucásico	DR2
Bulgaria	Caucásico	A11, B7, B35, DR2, DR3
Canadá	Caucásico	B8, DR3
	Caucásico	DR2
	Caucásico	DQ6
	Caucásico	B8, DR3, C4AQ0
	Negro	DR2
China	Oriental	DR2, C4AQ0
	Oriental	A33, B57, DR3
Checoslovaquia		B8
Dinamarca		DR3, DRw6 RFLP
		TNF RFLP (ligado a B8)
Inglaterra	Caucásico	C4AQ0
		C4AQ0, C4B0
		Haplotipo B8-DR3-C4B1-BfS-C2C-C4AQ0
		DR2, C4AQ0 DPB1*0301 y 1401

Tabla 2.-	Cont.	
<i>País</i>	<i>Grupo Étnico</i>	<i>Asociación</i>
Finlandia	Caucásico	DR3, DQA1*0501, C4AQ0 B8, DR3, TNF2 B8, DR3, C4AQ0, C4B0
Francia	Caucásico	DR3, C4B0, Cw4, C4AQ0
Alemania	Caucásico	A1, B8, , B13, DR2, DR3, C4AQ0 Haplotipo: B7-C4A3-C4B1-DR2 B8, C4AQ0, C4B1, DR3 Haplotipo: A1, Cw7-B8-TNFB1-SC01-DR3-DQw2 DPB*0101 (parte del haplotipo D8-DR3) DRB1*03-QAP4.1-DQA1*0501-DQB1*0201 DRB1*02-QAP1.2-DQA1*0102-DQB1*0602
Grecia		DR2
India		DR4
Italia	Caucásico	DR3, DQw2, DPB1*0301 y *1401
Japón	Oriental	DRB1*1501, B5*0101, DQB1*0602 B39, DRB1*1501, DRB5*0101, DQB1*0602 Haplotipo: DRB1*1501-DRB5*0101-DQA1*0102-DQB1*0602
Corea		Haplotipo: DRB1*1501-DRB5*0101 Deleciones de C4A, DR9

Tabla 2.-	Cont.	
País	Gpo. Étnico	Asociación
Kuwait		A3, DR2
México	Mestizo	C4A0, DR3
Rusia		A11, B7, B35, DR2, DR3,
Escandinavia	Caucásico	DRB1*03, DRB3*0101, DQA1*0501, DQB1*0201
Singapur	Oriental	DR2
Eslovaquia		DR3
Sud-África	Color	DR2
España	Caucásico	B18, DR3, DQ2 B8, DR3, DRw52, DQ2 C4A0, C4B0
Suecia		C4A0, C4B0
Suiza		DR3
Estados Unidos	Negro	C4A0
Alabama	Caucásico	DR3, DQw2, C4A0
Baltimore	Caucásico	DR2 DR2, DRw52, DQ1 DR2, DR3, C4A0
	Negro	C4A0
Boston	Caucásico	Deficiencia de C2 Haplotipo: B8-DR3-SC01

Tabla 2.-	Cont..	
<i>País</i>	<i>Gpo. Étnico</i>	<i>Asociación</i>
Chicago	Negro	DR2, DR3
Cincinnati	Caucásico	B8, DR3, SC01, GL02 Haplotipo: A1-B8-SC01-DR3-DQw2
Georgia	Caucásico	B8, DR3, C4A0
N Orleans	Negro	DR7
San Luis M.	Caucásico	C4A0, B8, DR3
San Fco.		DR2, DQw1
	Caucásico	DR2, DQB1
Texas	Negro	C4A0, B44, DR2, DR3 DR2, DQB1*0602
	Caucásico	DR3
	Mex-Amer	C4A0, DRB1*0301
Washington	Negro	DR3

Tabla 3.- Asociaciones de los genes del MHC con autoanticuerpos.

<i>Autoanticuerpo</i>	<i>Grupo Étnico</i>	<i>Gen MHC</i>
DNA	Japón	DR2
	Estados Unidos	DQB1*0201, *0602, *0302
	Baltimore-Negra	DR2
	Baltimore-Blanca	DR2
	Boston-Blanca	DR7
	Minnesota-Blanca	DR3
	Texas	DR3, DQw2.1, (DQA1*0102, DQB1*0602)
Sm	Japón	B61
	Estados Unidos	DQw6
	Boston-Blanca	DR7
	Texas-Negra	DR2, DQw6 (DQA1*0102, DQB1*0602)
RNP	Inglaterra	DQB
	Japón	DQ3
	España	Efecto protector de DR6
	Estados Unidos	DQw5, DQw8
	Alabama	DQw8
	Alabama-Negra	Efecto protector de DRw52b
	Baltimore	DR4
	Missouri	DR4, DR2

Tabla 3.- Continuación.

<i>Autoanticuerpo</i>	<i>Grupo Étnico</i>	<i>Gen MHC</i>
Sm/RNP	Texas-Blanca	DQw8/DQB1*0302
	Texas-Mex-Am	DQB1*0302
	Italia	DQw2, DR4 DPB*0301, *1401
	España	DR3
	Estados Unidos	DR4
Ro	Canadá	DRw3
	China	DR2
	Inglaterra	D2/DR3 (DQA1*0102/DQB1*0201)
	Alemania	B8 Haplotipo: B8-C4A0-DR3-DQ2
	España	DR2 DQ2/DQ6
	Estados Unidos	Deficiencia de C2
	Alabama-Negra	DR3, DQw2.3
	Baltimore	DR2
	Baltimore-Blanca	DR3
	N Orleans-Negra	DR7
	Oklahoma	DQB1*0201 y DQA1*0101
	Texas-Mex-Am	DRB1*0301, C4A0

Tabla 3.- Continuación.

<i>Autoanticuerpo</i>	<i>Grupo Étnico</i>	<i>Gen MHC</i>	
Anti-La	Alemania	DR3	
	Japón	DRw12, DR8	
	Estados Unidos		
	Alabama-Negra	DR3, DQw2.3	
Anti-Ro/La	Inglaterra	DR3, DQA1*0501, C4A0 DR3, DQA1*0501	
	Alemania	Haplotipo: B8, C4A0, DR3, DQ2 DR3	
	Italia	DR3, DQw2	
	España	B8, DR3	
	Estados Unidos	DQA1*0501, *0101; DQB1*0201, *0602	
	Anti-fosfolípido	Estados Unidos	DQw7, Dqw8, Dqw9
		Canadá	DR7
España		DQ6	
Anti-Cardio-Lipina	Inglaterra	DR4	
	Alemania	DR4, DR7, DRw53	
	Italia	DR7 DPB1*0301, *1401	
	España	Efecto protector de DRw52	

Tabla 3.- Continuación.

<i>Autoanticuerpo</i>	<i>Grupo Étnico</i>	<i>Gen MHC</i>
Anti-Cardio- Lipina	Estados Unidos	DQ7
	N Orleans-Negra	Alelos nulos de C4
	México-Mestizo	DR7

Planteamiento del problema y justificación.

El lupus eritematoso generalizado es una enfermedad crónica autoinmune, caracterizada por la producción de niveles elevados de autoanticuerpos en contra de una gran variedad de estructuras celulares. La etiología del LEG no se conoce aún con claridad aunque se han descrito factores genéticos relevantes en este proceso. Los genes del MHC son importantes en la regulación de la respuesta inmune, la frecuencia de estos genes varía de acuerdo al grupo étnico estudiado, actualmente algunos estudios describen asociaciones entre algunos alelos de HLA de clase II como el HLA-DR3 y el HLA-DR2 con el lupus en poblaciones caucásicas y orientales, respectivamente. Sin embargo es importante recordar que la genética poblacional de los grupos étnicos caucásicos, orientales y el mestizo mexicano, muestran diferencias sustanciales. En algunos estudios previos se ha demostrado que la estructura genética de la población mexicana está conformada de aproximadamente un 56 % de genes autóctonos (Indígenas), 40 % de genes caucásicos y de un 4 a 12 % de genes de origen negroide. Debido a esto consideramos necesario desarrollar estudios de la genética de los pacientes con LEG en la población mexicana mestiza. Además es importante resaltar que el LEG es una enfermedad que se presenta con mayor frecuencia en población mexicana con respecto a la población caucásica y además se observa en condiciones clínicas de mayor gravedad. Se sabe poco acerca de la relevancia de los polimorfismos de los genes clase III del MHC en los pacientes con LEG y existe muchas discrepancias a este respecto ya que en otros grupos étnicos se han descrito polimorfismos de los genes de las proteínas de choque térmico y de los genes de TNF asociados con la susceptibilidad a LEG. Por todo lo anterior en este trabajo se pretende hacer un análisis de los polimorfismos de genes HLA y de los polimorfismos de otros genes como TNF- α y HSP70-2 localizados en

la región clase II del MHC en pacientes con LEG para definir la importancia de estos en la susceptibilidad a LEG y tratar de establecer los patrones de desequilibrio genético de estos genes en los pacientes mexicanos con LEG.

Problema.

¿Existe asociación de los polimorfismos del promotor de TNF- α y alelos de HSP70-2 (región de clase III del complejo principal de histocompatibilidad) con el desarrollo de LEG en la población mestiza mexicana y si existe cual es el patrón de desequilibrio genético de estos genes con los alelos de HLA?

Hipótesis.

Existe asociación de los polimorfismos del promotor de TNF- α y los alelos de HSP70-2 con la susceptibilidad al LEG en la población mexicana. De la misma manera, saber si los patrones de desequilibrio genético entre los alelos de TNF- α y HSP70-2 con los genes HLA son característicos de los pacientes con LEG y saber si difiere de los observados en la población general.

Objetivo General.

Determinar si hay asociación de los alelos de los genes de clase III del MHC (TNF- α y HSP70-2) con el LEG en la población mestiza mexicana. Analizar los patrones de desequilibrio genético entre alelos HLA y los polimorfismos en el promotor de TNF- α y en los genes estructurales de HSP70-2.

Objetivos específicos.

1. Determinar si los alelos de los genes del TNF y de las proteínas de choque térmico están asociados con la susceptibilidad a LEG en la población mestiza mexicana y si esta asociación es independiente de los alelos HLA.
2. Determinar el patrón de desequilibrio genético entre los alelos de TNF y HSP70-2 con los genes HLA en pacientes mexicanos con LEG.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio: Descriptivo, Transversal de Casos y Controles.

Población de estudio:

Pacientes. Se estudiaron 81 pacientes mestizos mexicanos con diagnóstico de lupus eritematoso generalizado (LEG) basado en los criterios para LEG (al menos 4) del Colegio Americano de Reumatología (ACR). El diagnóstico se llevó a cabo por reumatólogos certificados por la Sociedad Mexicana de Reumatología, adscritos al Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán.

Controles.

Mestizos. Se estudiaron 99 individuos mestizos mexicanos. Todos los individuos se analizaron desde los puntos de vista clínico, serológico, psicológico, nutricional para establecer la historia de padecimientos autoinmunes o infecciosos. Mediante cuestionario directo se obtuvieron datos para establecer historia familiar de enfermedades autoinmunes de tejido conjuntivo. Desde el punto de vista etnológico se consideraron mestizos mexicanos aquellos con dos o más generaciones nacidas en México. Este grupo se comparó genéticamente con los individuos representativos de México estudiados anteriormente, en los cuales se ha obtenido un patrón de mestizaje de 56 % de genes Indígenas, 40 % de genes Caucásicos y 4 % de genes Negroides [60, 61, 62].

Indígenas. Se incluyeron en el estudio 96 individuos sanos no relacionados pertenecientes al grupo étnico Mazateco, ubicados en Huautla de Jimenez y San Mateo Yolochochitl. Ambas localidades ubicadas en la sierra norte del estado de Oaxaca. Los Mazatecos están

lingüísticamente clasificados dentro del grupo Olmeca-Otomangue, en el subgrupo Mixteco y en la familia Popoloca. Los Mazatecos provienen de grupos culturales de la parte central y probablemente están relacionados con la cultura Olmeca según algunos hallazgos arqueológicos recientes [74].

Criterios de selección de la muestra.

Criterios de inclusión de casos.

- 1.- Masculino o femenino.
- 2.- Tener más de 16 años al momento del diagnóstico de LEG.
- 3.- Diagnóstico de LEG establecido en el INCMNSZ.
- 4.- Mestizos mexicanos con dos o más generaciones nacidas en México.
- 5.- Firma de consentimiento informado.

Criterios de exclusión de casos.

- 1.- Tener 16 años o menos al momento del diagnóstico de LEG.
- 2.- Diagnóstico de LEG no establecido en el INCMNSZ.
- 3.- Antecedentes heredo-familiares extranjeros en las dos previas generaciones.

Criterios de inclusión de controles.

- 1.- Masculino o femenino.
- 2.- Sin datos de enfermedades autoinmunes o infecciosas confirmados por laboratorio y clínica.
- 3.- Individuos mestizos mexicanos.
- 4.- Firma de consentimiento informado.

Criterios de exclusión de controles.

- 1.- Datos sugerentes de enfermedad autoinmune o infecciosa.
- 2.- Antecedentes heredo-familiares extranjeros en las dos previas generaciones.

Análisis estadístico.

Las diferencias entre los grupos se analizaron por medio de tablas de contingencia de 2 x 2 y la prueba de Chi-cuadrada. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos valores de p menores a 0.05 con la corrección de Yates y la prueba exacta de Fisher en caso de que uno de los valores de alguna casilla de la tabla de contingencia de 2x2, fuera menor a 5. Estos cálculos se realizaron con el programa estadístico EPINFO v. 5.0. El valor de La p se corrigió por el método de bonferroni, multiplicándolo por el número de comparaciones de cada locus. La fuerza de la asociación se calculó mediante la razón de momios con un intervalo de confianza de 95 %, (ANEXO 2). El desequilibrio de ligamiento (D = valor de desequilibrio; D' = valor de desequilibrio normalizado) se calculó por medio del programa estadístico ARLEQUÍN v 1.1. [75] .

Consideraciones éticas.

Durante la entrevista se explicaron con detenimiento todos los aspectos del estudio así como los riesgos de una toma de muestra sanguínea de 20 ml. No se ejerció ninguna presión sobre el paciente y solamente se incluyeron en el estudio tras la firma y autorización de una carta de consentimiento. Por otro lado cuando se detectó un probable control se procedió de la misma forma que con los pacientes. El formato de cartas de consentimiento para pacientes con LEG y controles se muestran en el ANEXO 3.

Procedimiento.

Para conocer la asociación de los genes de clase III del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) con la susceptibilidad a LEG y los patrones de desequilibrio genético en los pacientes, se realizó un estudio transversal de casos y controles.

Todos los individuos incluidos en el estudio firmaron una carta de consentimiento donde se informó con detalle la finalidad del estudio, así como los riesgos de una veno-punción. Se tomaron 20 ml de sangre periférica y se anticoagularon con EDTA. Posteriormente se procedió a la extracción del DNA genómico por el método de Salting-out, obteniendo una cantidad considerable de DNA la cual se congeló a -70°C hasta su análisis.

Tipificación de genes HLA.

Se realizó la tipificación genérica de HLA-DRB1 se realizó por el método de reacción en cadena de la polimerasa e hibridación con sondas específicas de secuencia (PCR-SSO), mediante el equipo de Dynal PCR-SSO (Hoffman La-Roche). La amplificación se realizó por el método de la reacción en cadena de la polimerasa con 0.125 U/ul de *Taq* DNA polimerasa (Promega, Madison, WI).

Se realizó la tipificación de alta resolución por el método de hibridación con sondas específicas de secuencia (PCR-SSOP). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación fueron DRBAMP-B para la region 3' del exón 2 en todos los casos, y DRBAMP-1, DRBAMP-2, DRBAMP-3, DRBAMP-4, DRBAMP-B5 y DRBAMP-52 para la región 5' del exón 2 para cada grupo específico de amplificación. Los oligonucleótidos DQAAMP-A, DQAAMP-B, DQBAMP-A y DQBAMP-B fueron usados para la amplificación del gen DQ.

Cada membrana donde se depositó la alícuota de DNA amplificado, se hibridó con sondas específicas para los distintos alelos de los loci HLA-DR, DQA y DQB. En el caso del locus HLA-DR se usaron un total de 120 sondas y para el locus HLA-DQA se utilizaron 70 sondas y un número similar para el locus DQB. La información de los oligonucleótidos y de las sondas utilizadas fue tomada de las especificidades para DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1 y DQB1 publicadas en el 12o. Taller Internacional de Histocompatibilidad, realizado en la ciudad de Paris, Francia en el mes de Octubre de 1999.

Detección del polimorfismo del gen de HSP70-2.

Se caracterizó el polimorfismo en la posición 1267 del gen de la proteína de choque térmico (HSP70-2) mediante amplificación y corte con la endonucleasa *Pst* I. Para la amplificación de la región que contiene al sitio 1267 de este gen se utilizaron los siguientes oligonucleótidos; sentido (nucleótidos 1083-1102 dentro de la región codificante) 5'-CATCGACTTCTACACGTCCA-3' y antisentido (nucleótidos 2180-2199 dentro de la región 3' no traducida para evitar la homología con HSP70-1) 5'-CAAAGTCCTTGAGTCCCAAC-3'. El DNA genómico fue amplificado en una reacción de 25 μ l de volumen final. La reacción de PCR fue realizada en 35 ciclos con una desnaturalización de 94 °C durante 1 min., alineamiento a 56 °C durante 1 min., y extensión a 72 °C durante 2 min. Los productos de la PCR fueron cortados por la endonucleasa de restricción *Pst* I (Pharmacia, Uppsala, Sweden) y posteriormente los fragmentos o patrón de restricción fue analizado en una electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio al 2 %.

Detección del polimorfismo del promotor de TNF- α .

La genotipificación del polimorfismo de la región promotora del TNF- α se realizó mediante la metodología de reacción en cadena de la polimerasa y corte con las endonucleasas de restricción *Nco* I para la posición -308 y *EcoR* I para la posición -238. Para lograr la amplificación del fragmento -308 se utilizaron los oligonucleótidos: sentido 5'-GAGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT y antisentido 5'-GGGACACACAAGCATCAAG. El oligonucleótido sentido tiene un nucleótido no complementario a la secuencia (subrayado), el cual genera un sitio de restricción para *Nco* I para la detección del polimorfismo en -308. El proceso de digestión se realizó con la endonucleasa *Nco* I y una incubación a 37° C durante toda la noche. El patrón de restricción se reveló por electroforesis en gel de agarosa 2 % teñido con bromuro de etidio. Después de realizar los procedimientos moleculares para la determinación de los alelos del MHC en los pacientes con LEG, individuos sanos e indígenas, se procedió al análisis estadístico de los datos. En primer lugar se realizaron los cálculos de las frecuencias génicas por conteo directo y se procedió a la realización de los cálculos estadísticos mediante las fórmulas ya mencionadas.

RESULTADOS

En la **Tabla 4** se muestran las frecuencias génicas y genotípicas de los alelos de HSP70-2 en los Mestizos Mexicanos comparados con las poblaciones Indígenas Mazatecos y Nahuas. En los dos grupos Indígenas la frecuencia de este gen se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg, mientras que en el grupo Mestizo no se encontró en equilibrio (Chi-cuadrada= 8.27, $p < 0.05$). Las frecuencias de los genotipos AA y AB fueron similares en los Mazatecos (AA=39.1% y AB=43.4) y en los Nahuas (AA=48.8 y AB=43.7). En el grupo de Mestizos el genotipo AB fue más frecuente (AB= 72.2%). De manera interesante en el grupo Mazateca se encontró una frecuencia mayor del genotipo homocigoto BB (17.3%) con una diferencia significativa al compararse con los Mestizos (5%) ($p=0.01$). La distribución del alelo A fue similar en las tres poblaciones, sin embargo se observó un aumento en la frecuencia del alelo B en los Mestizos con una frecuencia génica de 0.411, es importante mencionar que este incremento no fue estadísticamente significativo. Con la finalidad de mostrar las diferencias étnicas, la frecuencia de estos alelos se comparó con los reportes previos de otras poblaciones como caucásicos del Reino Unido, Españoles y Afro-Americanos. Se observó una baja frecuencia del genotipo BB en los Mestizos Mexicanos al compararse con los Afro americanos y los Españoles (5% en Mestizos Mexicanos vs. 17.1% y 38.1 % en Españoles y Afro-Americanos respectivamente).

En la **Tabla 5** se muestran las frecuencias genotípicas y génicas de HSP70-2 en los pacientes con LEG e individuos sanos. En ambos grupos, el genotipo más común fue el heterocigoto AB (83.1 % en pacientes con LEG y 72.2 % en controles). Por otro lado el alelo más común fue el HSP70-2A (58 % en pacientes y 58.9 en controles). Los individuos homocigotos BB solamente se encontraron en el grupo control ($p < 0.05$). No se

observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los alelos. El análisis de desequilibrio genético entre alelos HLA-DR y HSP70-2 mostró los siguientes haplotipos en desequilibrio genético: HLA-DR3-HSP70-2A ($D=0.03$, $D'=0.67$, $p < 0.01$); HLA-DR1-HSP70-2A ($D=0.03$, $D'=0.86$, $p<0.01$) y HLA-DR8-HSP70-2B ($D=0.02$, $D'=0.46$, $p=0.02$). Como resultado de esto, se observó una frecuencia mayor del genotipo AB en pacientes DR3 negativos ($p < 0.05$) (**Tabla 6**).

En la **tabla 7**, se muestran las frecuencias génicas de los alelos genéricos de HLA-DR en pacientes con LEG y en controles y se observa aumento significativo en la frecuencia del HLA-DR3 ($p=0.03$; $RM= 2.26$; $IC\ 95\%=0.98-5.25$) y una disminución en la frecuencia del HLA-DR8 ($p=0.03$; $RM=0.51$; $IC\ 95\%=0.25-1.01$) con relación al grupo control. En el análisis de alta resolución se encontró incremento en la frecuencia de los subtipos DRB1*0301 ($p=0.02$, $RM=4.46$, $IC\ 95\ \%=1.20-19.55$) y DRB1*1501 en el grupo de pacientes (**Tabla 8**). Al comparar las frecuencias de los subtipos de HLA-DRB1 entre pacientes con LEG e indígenas Mazatecos se observó también un aumento en la frecuencia de DRB1*0301 en los pacientes ($p=0.00001$; $RM= 25.29$; $95\% CI= 3.53-512.99$). Por otro lado la frecuencia del DRB1*0802 y *1602 fue mayor en el grupo Indígena, este último alelo con valor de $p= 0.02$; $RM= 0.44$; $IC\ 95\ \%= 0.05-0.84$ (**Tabla 9**).

En cuanto a los alelos DQA1, el 53% de los indígenas Mazatecos fue DQA1*0301 comparado con solamente el 32 y 25 % de los pacientes con LEG y controles, respectivamente. Además se observó aumento de la frecuencia de DQA1*0101 en LEG, este alelo no se observó en los Indígenas ($p= 0.0002$) (**Tabla 10**).

Con respecto a los alelos DQB1 observamos que el alelo más común fue el DQB1*0302 en todos los grupos, a diferencia de los individuos Caucásicos en quienes el alelo DQB1*0501 es el más común. El alelo DQB1*0201 no se observó en los indígenas mientras que en los

controles fue el tercer alelo más común, con una frecuencia génica de 0.163 y en pacientes con LEG con una frecuencia de 0.127 (**Tabla 11**).

El análisis por haplotipos mostró una gran heterogeneidad genética en los pacientes con LEG y en los controles, con relación a los Indígenas Mazatecos en quienes únicamente encontramos cinco haplotipos troncales. Los cinco haplotipos más comunes en pacientes con LEG, controles y Mazatecos se muestran en la **tabla 12**; se observó aumento en la frecuencia del haplotipo DRB1*1601-DQA1*0501-DQB1*0301 en los Mazatecos y de manera interesante este haplotipo prácticamente no se encontró en los pacientes con LEG ($p=0.004$) ni en controles ($p=0.001$).

En la **tabla 13**, se muestra un incremento significativo del haplotipo HLA-DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201, $p=0.017$, $RM=2.97$ en los pacientes así como una disminución en la frecuencia del haplotipo DRB1*0802-DQA1*0401-DQB1*0402 $p=0.034$, $RM=0.45$). En el grupo control los haplotipos más frecuentes fueron DRB1*0802-DQA1*0401-DQB1*0402, DRB1*0407-DQA1*03-DQB1*0302 y DRB1*0701-DQA1*0201-DQB1*0201. Lo anterior se muestra gráficamente donde se pueden apreciar claramente las diferencias antes mencionadas, **Gráfico 1**.

Se observaron diferentes combinaciones de haplotipos en los cromosomas homólogos entre pacientes y controles. Por ejemplo, en los pacientes con LEG, el haplotipo HLA-DRB1*0407-DQA1*03-DQB1*0302 se combinó con diez diferentes haplotipos en el cromosoma homólogo en un total de 14 pacientes, mientras que en los individuos sanos este haplotipo se combinó solamente con cuatro haplotipos en cinco individuos. ($p<0.05$) Los otros 15 controles con este haplotipo mostraron otras combinaciones. Por otro lado, el haplotipo DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 se combinó con siete diferentes haplotipos en siete pacientes, en controles se combinó con dos haplotipos ($p<0.05$) los

otros siete controles con este haplotipo tuvieron otras combinaciones. Otros haplotipos como el HLA-DRB1*0301-DQA1-0501-DQB1*0201 y DRB1*0101-DQA1*0101-DQB1*0501 presentaron las mismas características, sin embargo la baja frecuencia de esos haplotipos en los controles no permitieron realizar un análisis más profundo. Es importante mencionar que en el grupo control se observó una mayor frecuencia de homocigocia para el haplotipo HLA-DRB1*0802-DQA1*0401-DQB1*0402.

El análisis de la distribución de los polimorfismos del promotor de TNF- α en pacientes con LEG y controles se muestra en la **tabla 14**. En ambos grupos los genotipos más comunes fueron el TNF-308 1/1 y el TNF-238 G/G. Los alelos más comunes fueron el TNF1 y TNFG. El análisis de la distribución de los genotipos mostró aumento en la frecuencia del genotipo heterocigoto TNF -238 G/A en los pacientes con LEG ($p=0.03$; RM=4.77; IC 95 %=1.12-23.23. como resultado de lo anterior se observó aumento en la frecuencia de TNFA -238 ($p=0.02$; RM= 3.62; IC 95 %= 1.17-11.92 (**Tabla 14**). Mediante el cálculo de delta (D) se detectaron ciertos patrones de desequilibrio genético entre alelos del promotor de TNF- α y alelos HLA-DR en el grupo de pacientes: TNFA-DRB1*1401 (D=0.84; D'= 1.0; $p=0.015$); TNFA-DRB1*0301 (D=1.38; D'= 0.41; $p=0.042$); TNF2- DRB1*1106 (D=0.9; D'= 1.0; $p=0.0006$); TNF2-DRB1*1104 (D=0.83; D'= 0.45; $p=0.02$); TNF2- DRB1*1406 (D=0.83; D'= 0.45; $p=0.02$). TNF2-DRB1*0301 (D=1.3; D'=0.4; $p=0.042$). Por otro lado, en el grupo control se observó desequilibrio genético entre TNF2-DRB1*0802 (D=1.4; D'=0.61; $p=0.004$); TNF2- DRB1*1302 (D=0.81; D'=0.30, $p=0.005$) y TNFA-DRB1*0404 (D=0.7; D'=0.29; $p=0.03$) (**Tabla 15**).

En la **tabla 16** se muestran los desequilibrios genéticos entre TNF -238, TNF -308 y HLA-DRB1, DQA1, DQB1. Se observó un ligero incremento de la frecuencia del haplotipo [TNFG-TNF1-DRB1*0101-DQA1*0101-DQB1*0501] en los pacientes con LEG.

El haplotipo más común en el grupo control fue [TNFG-TNF1-DRB1*0802-DQA1*0401-DQB1*0402] ($p=0.02$; OR= 0.33; 95 % CI= 0.10-1.01).

Finalmente, las asociaciones entre haplotipos de TNFA y TNF2 con los haplotipos HLA-DRB1-DQA1-DQB1 fueron más heterogéneas en los pacientes con LEG que en los controles (**Tabla 17**). De manera interesante el alelo TNF2 se encontró con mayor frecuencia en individuos que portan el haplotipo autóctono DRB1*0802-DQA1*0401-DQB1*0402.

Tabla 4.- Frecuencias Génicas y Genotípicas de HSP70-2 en tres poblaciones Mexicanas.

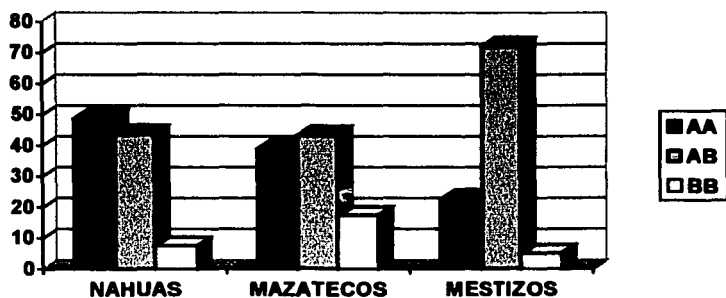
Genotipo	Nahua	Mazatecos	Mestizos*
	N=80	N=46	N=158
	n (%)	n (%)	n (%)
AA	39 (48.8)	18 (39.1)	36 (22.8)
AB	35 (43.7)	20 (43.4)	114 (72.2)
BB	6 (7.5)	8 (17.3)	8 (5)**
Alelos			
A	113 (0.706)	56 (0.608)	186 (0.589)
B	47 (0.293)	36 (0.391)	130 (0.411)

***Valor de Hardy-Weinberg $\chi^2= 8.27$, $p < 0.05$**

**** Disminución significativa en la frecuencia de homocigotos BB ($p=0.01$)**

N= Número de cromosomas.

Gráfico 1.- Frecuencias de los genotipos de HSP70-2 en tres poblaciones Mexicanas.



Mestizos: Equilibrio de Hardy-Weinberg: Chi-cuadrada=8.27, $p < 0.05$.

Disminución significativa de homocigotos BB, $p = 0.01$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 5.- Frecuencias Génicas y Genotípicas de HSP70-2 en LEG y en individuos sanos.

Genotipos	LEG	Controles	Valor de p
	(N=107)	(N=158)	
	n (%)	n (%)	
AA	18 (16.8)	36 (22.8)	
AB	89 (83.1)	114 (72.2)	
BB	0 (0.0)	8 (5.0)	<0.05
Alclos			
A	125 (58.4)	186 (58.9)	
B	89 (41.5)	130 (41.1)	

Tabla 6.- Distribución de los genotipos de HSP70-2 en pacientes con LEG y controles, considerando la presencia del alelo HLA-DR3.

Genotipo	DR3 (-)		DR3 (+)	
	LEG (N=87)	Controles (n=72)	LEG (N=20)	Controles (n=6)
AA	16 (18.3)	27 (37.5)	2 (10.0)	2 (33.3)
AB	71 (81.6)	45 (62.5)	18 (90.0)	4 (66.6)
Alelos				
A	103 (59.1)	99 (68.7)	22 (55.0)	8 (66.6)
B	71 (40.8)	45 (31.2)	18 (45.0)	4 (33.3)

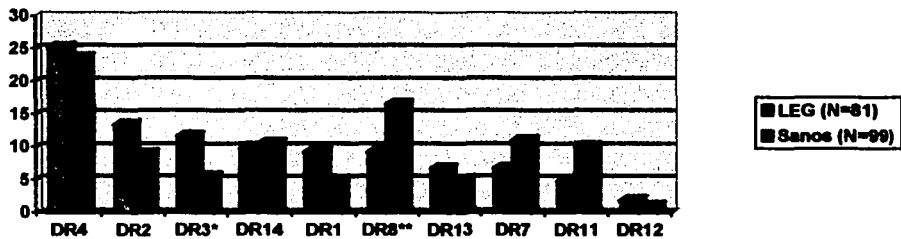
* Para esta tabla solo se utilizaron 78 individuos del grupo control.

Tabla 7.- Frecuencias génicas de los alelos genéricos de HLA-DR en Mestizos Mexicanos con LEG y en controles sanos.

HLA-DR	Pacientes LEG (N=162)		Controles (N=198)		RM (IC 95 %)	
	n	f.g.	n	f.g.	p	
DR4	41	0.253	47	0.237		
DR2	22	0.135	18	0.090		
DR3	19	0.117	11	0.055	0.03	2.26 (0.98-5.25)
DR14	16	0.099	21	0.106		
DR1	15	0.093	10	0.050		
DR8	15	0.093	33	0.166	0.03	0.51 (0.25-1.01)
DR13	11	0.068	10	0.050		
DR7	11	0.068	22	0.111		
DR11	8	0.049	20	0.101		
DR12	3	0.019	2	0.010		

N=Número de cromosomas.

Gráfico 2.- Frecuencia (%) de los alelos HLA-DR en pacientes mexicanos con LEG y controles sanos.



* Incremento significativo en la frecuencia de DR3 en los pacientes con LEG en relación a los controles, $p=0.03$, $RM=2.26$; $IC\ 95\ \%= 0.98-5.25$.

** Aumento significativo en la frecuencia de DR8 en los controles, $p=0.03$, $RM=0.51$, $IC\ 95\ \%= 0.25-1.01$.

Tabla 8 .- frecuencias génicas de HLA-DRB1 en pacientes mestizos mexicanos con LEG y controles sanos.

DRB1	LEG		CONTROLES		Pcorr	RM (IC 95%)
	(N= 162)		(N=198)			
	n	f.g.	n	f.g.		
0407	19	0.117	21	0.106	NS	
0301	18	0.111	9	0.045	0.03	2.63 (0.98-5.25)
1501	16	0.099	9	0.045	NS	
0101	14	0.086	7	0.035	NS	
0802	12	0.074	30	0.150	0.03	0.45 (0.21-0.95)
0701	11	0.067	22	0.111	NS	
1406	10	0.062	3	0.015	NS	
1301	9	0.055	4	0.020	NS	
0401	5	0.031	1	0.005	NS	
0411	5	0.031	2	0.010	NS	
1602	3	0.019	3	0.015	NS	
1407	3	0.019	3	0.015	NS	
0404	3	0.019	9	0.045	NS	
1502	2	0.012	3	0.015	NS	
1101	2	0.012	12	0.060	0.03	0.19 (0.03-0.93)
1302	2	0.012	4	0.020	NS	
1402	1	0.006	6	0.054	NS	
0403		NE	5	0.045	NS	

NE=No encontrado

NS= No significativo

N= Número de cromosomas

Tabla 9.- Frecuencias génicas de HLA-DRB1 en pacientes mestizos mexicanos con LEG, controles sanos e Indígenas Mazatecos.

DRB1	LEG		CONTROLES		MAZATECOS	
	(N= 162)		(N=198)		(N=192)	
	n	f.g.	n	f.g.	n	f.g.
0407	19	0.117	21	0.106	27	0.293
0301	18	0.111 ^{&}	9	0.045		NE
1501	16	0.099	9	0.045		NE
0101	14	0.086	7	0.035		NE
0802	12	0.074	30	0.150	15	0.136
0701	11	0.067	22	0.111		NE
1406	10	0.062	3	0.015	7	0.076
1301	9	0.055	4	0.020		NE
0401	5	0.031	1	0.005		NE
0411	5	0.031	2	0.010	5	0.054
1602	3	0.019	3	0.015	15	0.163*
1407	3	0.019	3	0.015		NE
0404	3	0.019	9	0.045	11	0.119
1502	2	0.012	3	0.015	5	0.054
1101	2	0.012	12	0.060	1	0.010
1302	2	0.012	4	0.020		NE
1402	1	0.006	6	0.054	3	0.032
0403		NE	5	0.045		NE

[&] (pacientes LEG vs Indígenas Mazatecos; $p=0.00001$; RM= 25.29; IC 95%= 3.53-512.99); ^{*} (pacientes LEG vs Indígenas Mazatecos; $p=0.02$; RM=0.22; IC 95%=0.05-0.84).

N= Número de cromosomas

Tabla 10.- Frecuencias génicas de HLA-DQA1 en pacientes mestizos mexicanos con LEG, en controles sanos e Indígenas Mazatecos.

	LEG		CONTROLES		MAZATECOS	
	(N=162)		(N=198)		(N=192)	
DQA1	n	f.g.	n	f.g.	n	f.g.
0301	41	0.253	51	0.257	49	0.532
0501	43	0.253	45	0.227	26	0.282
0101	22	0.135*	20	0.101	1	0.010
0102	19	0.117	17	0.085	2	0.021
0401	15	0.092	33	0.166	17	0.184
0201	11	0.067	22	0.111		NE
0103	11	0.067	5	0.025	4	0.043

* (Pacientes LEG vs Indígenas Mazatecos) $p=0.0002$; $RM=19.49$; $IC\ 95\%= 2.66-400.12$.

NE= No encontrado.

N=Número de cromosomas

Tabla 11.- Tabla F.- Frecuencias génicas de HLA-DQB1 en pacientes mestizos mexicanos con LEG, en controles sanos e Indígenas Mazatecos.

DQB1	LEG (N=162)		CONTROLES (N=198)		MAZATECOS (N=192)	
	n	f.g.	n	f.g.	n	f.g.
0501	18	0.176	6	0.054	1	0.010
0301	17	0.166	23	0.209	29	0.315
0201	13	0.127 ^{&}	18	0.163 [#]		NE
0402	8	0.078	16	0.145	16	0.173
0602	5	0.049	9	0.081	1	0.010
0603	5	0.049	2	0.018		NE
0604	4	0.039	3	0.027		NE
0601	1	0.009		NE	4	0.043
0502	1	0.009	2	0.018		NE

& (Pacientes LEG vs Indígenas Mazatecos) p=0.0004; RM= 18.01; IC 95 %= 2.45-371.25.

(Indígenas Mazatecos vs Controles) p=0.0000001; RM=0.03; IC 95 %= 0.0-0.18.

NE= No encontrado.

N= Número de cromosomas

Tabla 12.- Haplotipos DRB1-DQA1-DQB1 más frecuentes en pacientes con LEG, controles sanos e Indígenas Mazatecos.

LEG (N=162)		CONTROLES (N=198)		MAZATECOS (N=192)	
DRB1-DQA1-DQB1	f.h.	DRB1-DQA1-DQB1	f.h.	DRB1-DQA1-DQB1	f.h.
0407-0301-0302	0.117	0802-0401-0402	0.151	0407-0301-0302	0.293
0301-0501-0201	0.111	0701-0201-0201	0.106	0802-0401-0402	0.163
0101-0101-0501	0.080	0407-0301-0302	0.106	1602-0501-0301	0.163
0802-0401-0402	0.074	1101-0501-0301	0.072	0404-0301-0302	0.119
0701-0201-0201	0.068	1501-0102-0602	0.045	1406-0501-0301	0.076
1406-0501-0301	0.049	0404-0301-0302	0.045	0411-0301-0302	0.054
1501-0102-0602	0.043	0301-0501-0201	0.040	1502-0103-0601	0.043

N= Número de cromosomas.

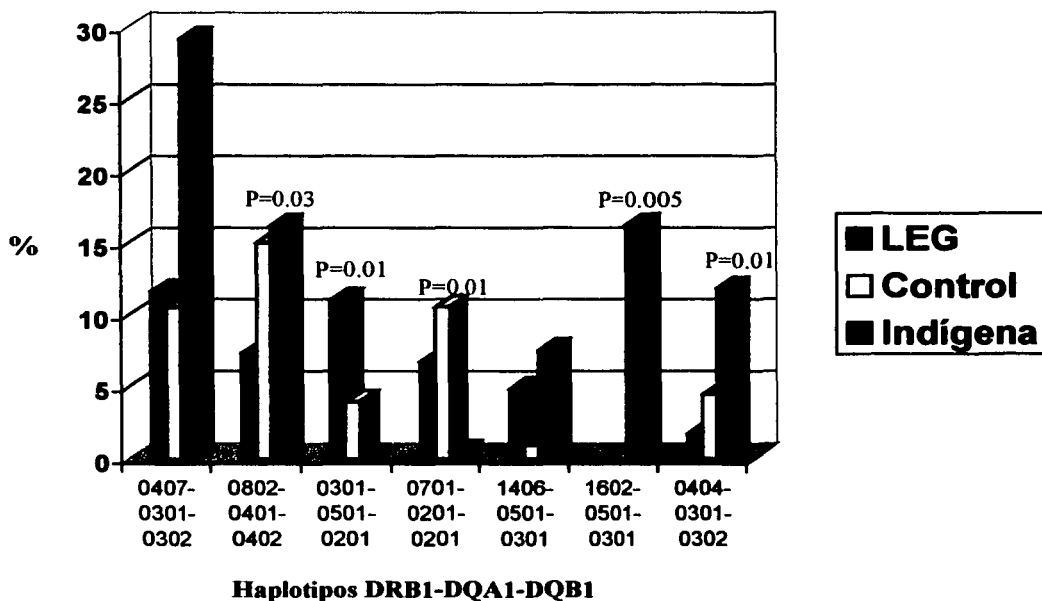
Tabla 13.- Haplotipos HLA-DRB1-DQA1-DQB1 más frecuentes en pacientes con LEG y controles.

DRB1-DQA1-DQB1	LEG		CONTROLES		p	RM
	N=162		N=198			
	n	f.h.	n	f.h.		
0407-03-0302	19	0.117	21	0.106	NS	
0301-0501-0201	18	0.111	8	0.040	0.017	2.97
0101-0101-0501	13	0.080	6	0.030	NS	
0802-0401-0402	12	0.074	30	0.151	0.034	0.45
0701-0201-0201	11	0.068	21	0.106	NS	
1406-0501-0301	8	0.049	2	0.010	NS	
1501-0102-0602	7	0.043	9	0.045	NS	
0411-03-0302	5	0.030	3	0.015	NS	
0401-03-0302	5	0.030	1	0.005	NS	
1301-0103-0603	3	0.018	2	0.010	NS	
0404-03-0302	3	0.018	9	0.045	NS	

NS= No significativo.

N= Número de cromosomas.

Grafico 3.- Frecuencia haplotípica (%) de HLA-DRB1-DQA1-DQB1 en pacientes con LEG, en controles sanos e Indígenas Mazatecos.



TESTS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 14.- Frecuencias génicas y genotípicas de los polimorfismos del promotor de TNF- α in Pacientes Mexicanos Mestizos con LEG y en controles sanos.

	LEG (N=51/102)		Controles (n= 55/110)		P	OR	CI 95%
	n	(%)	n	(%)			
Genotipos							
Polimorfismo -308							
TNF 1/1	44	(86.2)	52	(94.5)		NS	
TNF 1 / 2	6	(11.7)	3	(5.4)		NS	
TNF 2/2	1	(2.0)	0	(0)		NS	
Polimorfismo -238							
TNF G/G	38	(74.5)	51	(92.7)		NS	
TNF G/A	11	(21.0)	3	(5.4)	0.03	4.77	(1.12-23.23)
TNF A/A	2	(3.9)	1	(1.9)		NS	
Alelos							
Polimorfismo -308							
TNF1	94	0.921	107	0.972		NS	
TNF2	8	0.078	3	0.027		NS	
Polimorfismo -238							
TNFG	87	0.853	105	0.954		NS	
TNFA	15	0.147	5	0.045	0.02	3.62	(1.17-11.92)

Gráfico 4.- Frecuencias genotípicas de los polimorfismos del promotor de TNF- α en pacientes Mexicanos con LEG y controles sanos.

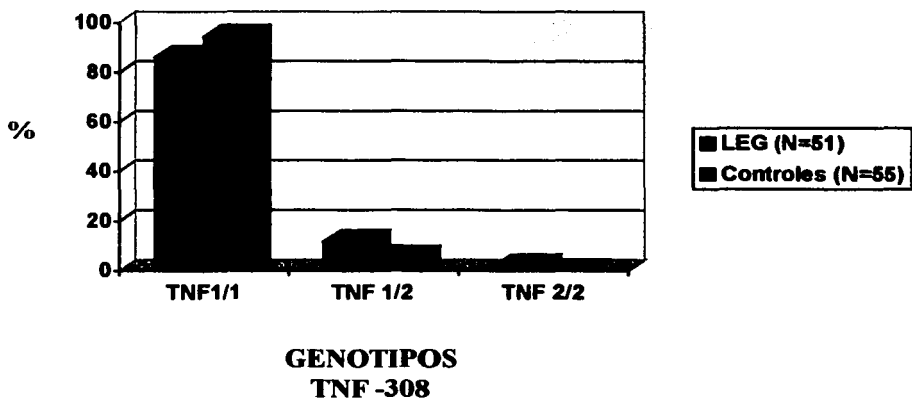
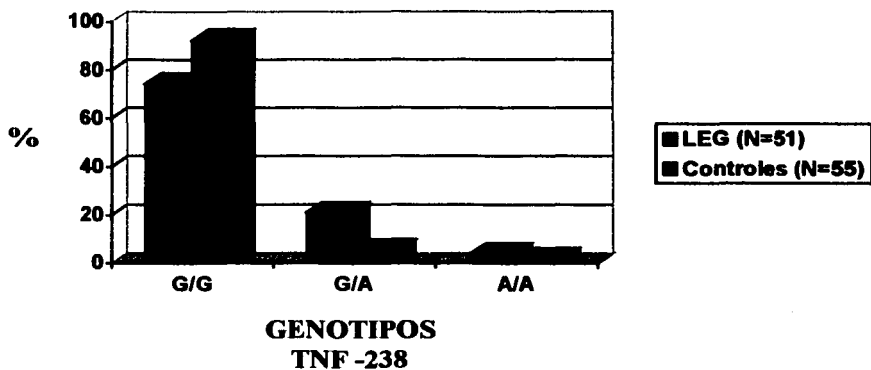


Tabla 15.- Valores esperados (E) y observados (O) de delta (D) entre alelos HLA-DR y TNF- α en los pacientes con LEG.

HLA-DRB1	TNF -238				TNF -308			
	TNFA		TNFG.		TNF1		TNF2	
	O	E	O	E	O	E	O	E
1401	0.84*	0.15	-0.84	0.85	0.08	0.92	-0.08	0.08
0101	-0.75	1.76	0.75	10.24	-0.06	11.06	0.06	0.94
0407	1.18	2.79	-1.18	16.21	-0.5	17.51	0.5	1.49
1501	1.50	1.47	-1.50	8.53	-0.21	9.22	0.21	0.78
1106	-0.14	0.15	0.74	0.85	-0.9	0.92	0.9 ^o	0.08
0802	-0.72	0.74	0.72	4.26	0.38	4.61	-0.38	0.39
1301	-0.87	0.88	0.87	5.12	-0.5	5.53	0.5	0.47
1104	-0.29	0.29	0.29	1.71	-0.83	1.84	0.83 ^φ	0.16
1101	0.69	0.29	-0.69	1.71	0.15	1.84	-0.15	0.16
0301	1.38 ^ψ	0.59	-1.38	3.41	0.31	3.69	-0.31	0.31
1302	-0.29	0.29	0.29	1.71	0.15	1.84	-0.15	0.16
1602	-0.43	0.44	0.43	2.56	0.23	2.76	-0.23	0.24
0801	-0.29	0.29	0.29	1.71	0.15	1.84	-0.15	0.16
0401	0.26	0.74	-0.26	4.26	0.38	4.61	-0.38	0.39
0411	-0.58	0.59	0.58	3.41	0.31	3.69	-0.31	0.31
0701	-0.17	1.18	0.17	6.82	0.62	7.37	-0.62	0.63
1406	-0.29	0.29	0.29	0.29	-0.83	1.84	0.83 ^λ	0.16

*Chi-cuadrada= 5.85; p= 0.01, ψ Chi-cuadrada= 4.13; p= 0.04, ω Chi-cuadrada= 11.86; p= 0.0006, ϕ Chi-cuadrada= 5.01; p= 0.02, λ Chi-cuadrada= 5.01; p= 0.02

Tabla 16.- Frecuencias haplotípicas [TNF -238, TNF-308, HLA-DRB, DQA y DQB] en pacientes con LEG y en controles sanos.

Haplotipo TNF -238, TNF-308	Haplotipo DRB1, DQA1, DQB1	LEG (N=102)		CONTROLES (N=110)		P	RM (IC 95%)
		n	f.h.	n	f.h.		
		G-1	0101-0101-0501	10	0.088		
	0407-03-0302	14	0.137	9	0.081		
	0701-0201-0201	5	0.049	13	0.118		
	1501-0102-0602	5	0.049	5	0.045		
	0301-0501-0201	3	0.029	4	0.036		
	0802-0401-0402	5	0.049	15	0.136	0.02	0.33 (0.10-1.01)
	1301-0103-0603	2	0.019	---	----		
	0401-03-0302	2	0.019	---	----		
A-1	0407-03-0302	3	0.029	1	0.009		
	0701-0201-0201	2	0.019	1	0.009		
G-2	0407-03-0302	2	0.019	---	----		
	Otros	49	< 0.019	58	0.009		

Tabla 17.- Haplotipos HLA-DRB1-DQA1-DQB1 asociados con TNFA -238 y TNF2 -308 en pacientes con LEG y controles.

<i>TNFA -238</i>	LEG (n=15/51)	Controles (n=5/55)
0407, 03, 0302	4	1
0301, 0501, 0201	3	--
0701, 0201, 0201	2	2
1501, 0501, 0601	1	--
1401, 0501, 0301	1	--
1302, 0102, 0604	1	--
0101, 0101, 0501	1	1
0401, 03, 0302	1	--
0404, 03, 0302	1	1
Total	15	5

<i>TNF2 -308</i>	(n=9/51)	(n=4/55)
0407, 03, 0302	2	--
1106, 0501, 0301	1	--
0101, 0101, 0501	1	--
1501, 0101, 0501	1	--
1406, 0501, 0301	1	--
1301, 0103, 0301	1	--
0407, 03, 0302	1	--
1104, 0501, 0301	1	--
0802, 0401, 0402	---	4
Total	9	4

DISCUSIÓN

El lupus es una enfermedad autoinmune con un amplio espectro de manifestaciones clínicas con gran variedad de características inmunológicas. En los pacientes Mestizos Mexicanos con LEG se han detectado algunos marcadores de susceptibilidad y la enfermedad se ha relacionado principalmente con el alelo HLA-DR3. Sin embargo poco se ha explorado acerca de la presencia de otros loci de susceptibilidad que bien pueden estar dentro o fuera de la región de HLA de clase II. El mapeo cromosómico de otros marcadores principalmente dentro de la región de clase III del MHC como los genes de las proteínas de choque térmico HSP-70 y el TNF- α , su importancia en la regulación inmunológica y su posible desequilibrio genético con genes HLA ha permitido explorar la relevancia de estos genes en la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes.

En este trabajo se determinaron los polimorfismos de los genes HLA mediante técnicas de alta resolución a nivel de DNA, así como los polimorfismos de los loci del TNF- α y HSP70-2 en pacientes Mestizos Mexicanos con LEG, en individuos sanos y en Indígenas representativos de México.

Estudios anteriores han demostrado de manera sustancial que el LEG está asociado con ciertos alelos de los genes del complejo principal de histocompatibilidad [76, 77, 78]. Sin embargo esos estudios no han sido contundentes para determinar específicamente que genes del MHC son los responsables de la susceptibilidad a LEG. Lo anterior se ha dificultado debido principalmente a dos causas, la primera el gran desequilibrio genético que existe entre los genes del MHC y en segundo lugar al elevado grado de polimorfismo de estos genes. Es importante recordar que el MHC se caracteriza por ser el sistema genético más polimórfico del genoma humano. En la población caucásica el LEG se ha

asociado con el haplotipo extendido A1;B8;SC01;DR3. Esta asociación no es tan clara en otras poblaciones como la Afro-Americana y la Oriental en quienes los alelos determinantes parecen ser una delección en el gen de cuarto componente de la vía clásica del complemento (C4) al que se le da el nombre de "alelo nulo" (C4AQ0) así como el HLA-DR2. Estas diferencias sugieren que la étnicidad tiene un papel determinante en el desarrollo de LEG. Para determinar estas asociaciones es importante contar con poblaciones genéticamente bien caracterizadas. Uno de estos grupos es el Mestizo Mexicano. Trabajos previos han definido que la población Mestiza Mexicana tiene una proporción de mezcla genética de un 56 % de genes Indígenas, un 40% de genes Caucásicos y un 4 a 12 % de genes Negroides y patrones de desequilibrio genético que difieren a los de otras poblaciones. En estudios previos realizados por métodos serológicos por Granados y cols. [79] se ha observado que el LEG está fuertemente asociado con el haplotipo extendido B8;SC01;DR3 En este estudio se pudo demostrar dicha asociación únicamente que para este fin se utilizaron métodos moleculares que nos permitieron conocer con más detalle este fenómeno definiendo al HLA-DRB1*0301 como un alelo relevante en la susceptibilidad a LEG. La baja frecuencia del alelo DRB1*0301 en las poblaciones Mestiza e Indígena sugiere que este alelo se obtuvo por mestizaje con poblaciones caucásicas. Debido a que a este alelo DRB1*0301 es el marcador más importante para LEG en la población caucásica, nuestros resultados sugieren que el proceso de mezcla genética entre poblaciones Amerindias y caucásicas ha dado como resultado el aumento de riesgo de desarrollar LEG en la población Mexicana. En otras palabras el Mestizo Mexicano es un híbrido genético especialmente susceptible a desarrollar LEG. En los humanos la familia de los genes de las proteínas de choque térmico está mapeada en el brazo corto del cromosoma 6 dentro del complejo principal de histocompatibilidad.

Recientemente se ha descrito un polimorfismo limitado de estos genes [80]. Los productos de los genes HSP70 tienen un papel muy importante en el movimiento de péptidos a través de las membranas intracelulares y de los procesos de conformación de proteínas [81]. Algunos estudios han sugerido recientemente que las HSP's son un blanco importante de la respuesta inmune en enfermedades reumáticas [82].

En lupus se han encontrado diversos anticuerpos en contra de las proteínas HSP70. LA localización cromosómica dentro de la región de clase III del MHC, el fuerte desequilibrio genético con otros importantes alelos de los genes HLA y la relevancia en la reparación de proteínas y en la respuesta inmune, plantean la necesidad de estudiar este sistema genético en relación con la susceptibilidad a las enfermedades autoinmunes. En diversas poblaciones se ha observado que el polimorfismo en el gen HSP70-2 se ha asociado con susceptibilidad a diabetes tipo 1, lupus eritematoso generalizado, y artritis reumatoide [66, 83]. En el presente estudio, se describen las frecuencias alélicas y genotípicas del gen HSP70-2 en distintas poblaciones mexicanas tanto sanos como con LEG. En la primera fase de este trabajo se describen los polimorfismos de HSP70-2 en poblaciones indígenas, lo cual es importante ya que la población Mestiza mexicana está conformada por un porcentaje importante de genes Indígenas, así como de un porcentaje menor de genes caucásicos y genes de origen negroide. Como resultado de ello observamos que las poblaciones mexicanas muestran una distribución similar de las frecuencias de los alelos HSP70-2A y HSP70-2B. De manera interesante observamos que el genotipo BB en Mestizos Mexicanos, y en los Indígenas Nahuatl es poco frecuente con un 5 y 7.5 % respectivamente, en relación con la frecuencia en Indígenas Mazatecos con 17.3 %. Este aspecto es importante ya que la homocigocia para el genotipo BB se asocia a LEG en los Caucaicos y en Afro-Americanos [73]. La baja frecuencia del genotipo homocigoto BB en los Mestizos sanos

podría ser el resultado de un proceso de selección negativa o podía estar relacionado con la relativamente baja incidencia de enfermedades autoinmunes. El resultado de este estudio sugiere que no hay una asociación significativa entre el alelo HSP70-2B con la susceptibilidad a LEG. La presencia de individuos homocigotos BB en el grupo control podría solamente ser reflejo del desequilibrio genético del alelo HSP70-2B con algún alelo HLA en particular, en este contexto no se observaron diferencias en la distribución de los alelos HSP70-2 con algún alelo HLA en particular. Los datos obtenidos no sostienen la asociación de HSP70-2 con LEG como se ha reportado en otros estudios [84]. Probablemente muchas de estas afirmaciones fueron el resultado del desequilibrio de los alelos del gen HSP70-2 con haplotipos extendidos como A1-B8-DR3 o A30-B18-DR3 que son de origen caucásico o bien probablemente asociaciones secundarias con los loci de DQ. El mecanismo por el cual los genes HSP70 podrían determinar la susceptibilidad a LEG o a otras enfermedades autoinmunes no se conoce. Sin embargo en artritis reumatoide se ha sugerido que algunas secuencias en las moléculas HLA-DR4 o HLA-DR10 asociadas con la enfermedad tienen afinidad por secuencias de las proteínas HSP70. Esto podría en consecuencia influir determinadamente en el procesamiento de péptidos antigénicos y su inclusión en la región captadora del péptido de la molécula HLA-DRB1. Lo anterior podría esperarse en el polimorfismo de la proteína HSP70 *Hom* el cual se encuentra dentro del dominio que se une al péptido, [85] pero no en el polimorfismo de HSP70-2 el cual está determinado por una mutación silente (A por G) en la región codificante. Por lo tanto podemos interpretar que cualquier contribución de HSP70-2 a LEG podría estar determinada por un gen vecino no identificado.

Por otro lado la participación de los polimorfismos del promotor de TNF- α no se ha establecido, uno de estos polimorfismos, el alelo TNF2 ha mostrado asociaciones significativas con LEG en caucásicos (frecuencia génica en LEG=0.26 vs frecuencia génica en controles =0.16 [56]). Estos datos difieren a los observados en pacientes de Sud-África en quienes la enfermedad no está asociada con el HLA-DR3. En el presente estudio la frecuencia de TNF2 no estuvo aumentada significativamente en pacientes con LEG. Algunos estudios han sugerido que existe fuerte desequilibrio genético entre el HLA-DR3 y el TNF2. Por lo anterior el aumento en el TNF2 podría ser simplemente un epifenómeno del incremento en la frecuencia de DR3 [86]. En contraste, otros trabajos no sostienen esta hipótesis y concluyen que el TNF2 es un factor de susceptibilidad independiente de HLA-DR3 [86]. El polimorfismo en la posición -308 se ha vinculado con aspectos funcionales, principalmente su efecto en la tasa de transcripción del gen de TNF- α [64, 88, 89]. En este estudio se muestra la asociación del alelo TNFA -238 y el LEG en la población Mestiza Mexicana. Sin embargo el desequilibrio genético observado con los alelos DRB1*1401 y DRB1*0301 sugiere que este incremento de TNFA podría tratarse de un efecto secundario, resultado del desequilibrio genético entre el TNF y los alelos HLA-DRB en los pacientes mexicanos con LEG. Es importante mencionar que en los controles se observaron diferentes patrones de desequilibrio genético, lo cual también sugiere que ciertas combinaciones de genes TNF-DRB podrían ser importantes para conferir la susceptibilidad a la enfermedad. Recientemente se describió una asociación entre el genotipo heterocigoto TNF -238 G/A en pacientes caucásicos con artritis reumatoide y no se encontró relevancia funcional de algún polimorfismo con relación a la producción o transcripción del gen TNF- α [90]. Además de esto, algunos otros polimorfismos como el TNF -857 T parecen

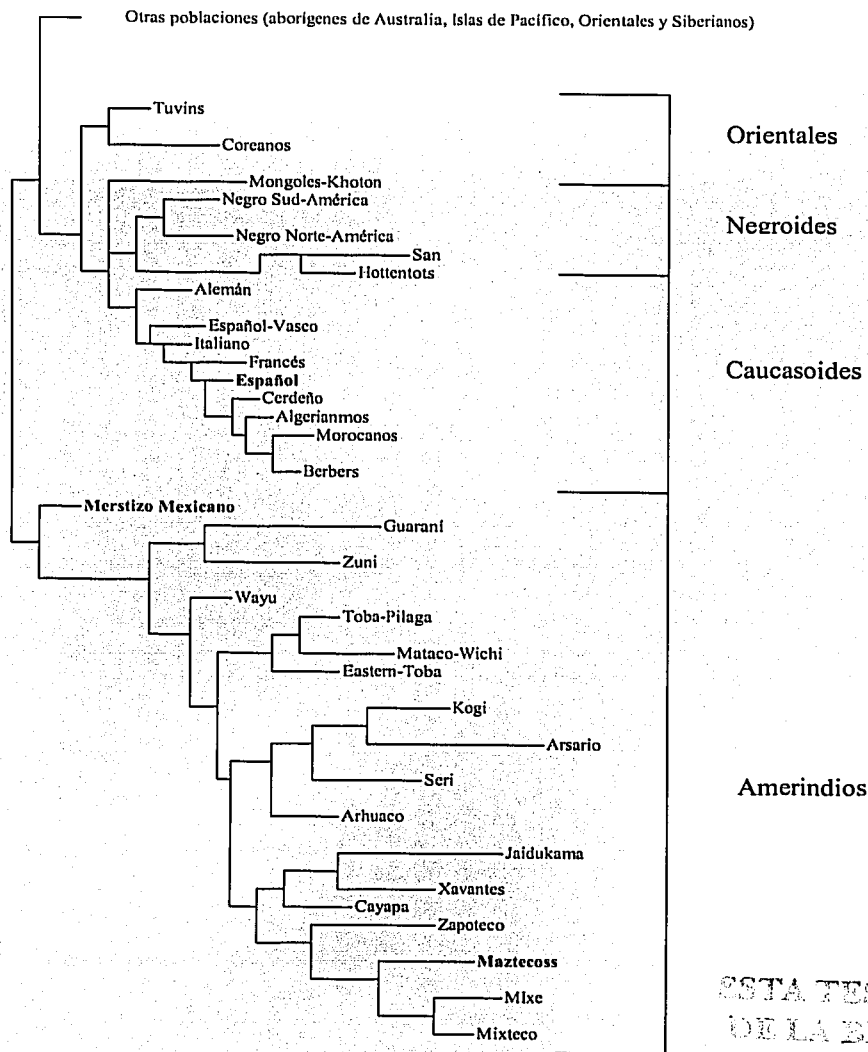
asociarse con AR en pacientes que poseen alelos con el epítoto reumatoide [91]. Existen otros polimorfismos dentro del promotor de TNF- α que son interesantes para estudiar como -367, -857, -863 y -1031 que podrían ser responsables de fenómenos funcionales y al mismo tiempo herramientas poderosas en el estudio de asociación con enfermedades.

En el análisis de haplotipos HLA-DRB1-DQA1-DQB1 y TNF -308 con TNF -238 se observaron diferentes combinaciones de haplotipos entre pacientes y controles en el cromosoma homólogo. En todos los casos las combinaciones encontradas en los pacientes con LEG fueron raramente observadas en los controles o incluso no se observaron. Por ejemplo se encontraron combinaciones del haplotipo HLA-DRB1*0407-DQA1*03-DQB1*0302 con 10 haplotipos más en 14 pacientes con LEG, mientras que en los cinco controles con este haplotipo, solo se combinó con otros cuatro haplotipos. El haplotipo DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 mostró siete diferentes combinaciones en el cromosoma homólogo en 7 pacientes mientras que en los controles solo 2 de esas combinaciones se encontraron. Los otros haplotipos que contienen el alelo DRB1*1501 mostraron combinaciones que no son comunes en el grupo control. Con respecto a las asociaciones entre haplotipos de TNFA -238 y TNF2 -308 con los haplotipos HLA-DRB1-DQA1-DQB1 fueron más heterogéneas en los pacientes con LEG que en los controles, el alelo TNF2 se encontró con más frecuencia en individuos que portan el haplotipo DRB1*0802-DQA1*0401-DQB1*0402 mientras que en los pacientes el alelo TNF2 se combinó con nueve distintos haplotipos, incluyendo el DRB1*0802-DQA1*0401-DQB1*0402. Se observó un efecto similar en cuanto a las combinaciones con el TNFA -238.

Los datos sugieren que la presencia de haplotipos específicos en el cromosoma homólogo podría tener un efecto aditivo en la susceptibilidad genética a LEG.

La finalidad de este trabajo fue definir las propiedades y el origen étnico de los genes HLA o los haplotipos extendidos que caracterizan a los pacientes con LEG. Es importante definir las características y discordancias étnicas que claramente se reflejan en este documento entre los pacientes con LEG, los individuos sanos y los Indígenas que nos dan una semejanza de la frecuencia de genes autóctonos. Por ejemplo en los indígenas Mazatecos observamos una frecuencia importante del haplotipo HLA-DRB1*1602-DQA1*0501-DQB1*0301 es importante resaltar que este haplotipo es frecuente en poblaciones de Amerindios [92, 93]. En los Indígenas Mazatecos no se observaron cambios en la heterocigocia esperada, lo cual podría sugerir que esta población ha permanecido con una baja tasa de mezcla genética o mestizaje. Por lo anterior es obligado pensar que este grupo étnico es fundamental para comparar los aspectos antes mencionados. El análisis de prevalencia de ciertos de genes HLA en los pacientes con LEG y en los individuos sanos en relación a los Indígenas sugiere que los genes de susceptibilidad como el HLA-DR3, TNF2 y TNFA podrían haber sido integrados a la población mexicana por mestizaje con poblaciones de origen caucásico. Con la utilización del marcador HLA-DRB1, la distancia genética entre Indígenas Mazatecos y mestizos mexicanos tiene un valor de 33.24 mientras que en relación a los españoles es de 78.06; **Figura 5**; esto nuevamente sostiene la hipótesis que los genes de susceptibilidad a LEG fueron integrados a la estructura genética de la población mexicana por mestizaje con otros grupos étnicos.

Figura 5.- Dendograma que muestra la relación (distancias genéticas) entre Indígenas Mazatecos Mestizos mexicanos y caucásicos españoles, en relación a otras poblaciones. Las distancias genéticas se calcularon utilizando el genotipo HLA-DRB1. Modificada de Arnaiz-Villena y Cols. Tissue Antigens 2000;56:405-416.



ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

- 1.- Las poblaciones mexicanas, presentan una distribución similar de la frecuencia de los alelos HSP70-2A y HSP70-2B, aunque la frecuencia del genotipo homocigoto HSP70-2B/HSP70-2B en la población Mazateca es mayor (17.3 %).
- 2.- Los polimorfismos del gen HSP70-2 no están asociados con la susceptibilidad a desarrollar LEG en mexicanos.
- 3.- El alelo HLA-DRB1*0301 es el principal alelo de clase II en la susceptibilidad a LEG en la población Mexicana.
- 4.- La presencia de ciertos haplotipos en el cromosoma homólogo de los pacientes con LEG que son portadores de los haplotipos DRB1*0407-DQA1*03-DQB1*0302 y DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 tiene un efecto aditivo en la susceptibilidad a LEG.
- 5.- El proceso de mezcla genética (mestizaje) entre Indígenas mexicanos con poblaciones caucásicas y negroides hace que el mestizo mexicanos sea especialmente susceptible al desarrollo de LEG.
- 6.- El alelo TNF2 -308 de promotor de TNF- α está en desequilibrio genético con el alelo HLA-DR3 en la población mexicana.
- 7.- El alelo TNFA -238 tiene un efecto aditivo al del alelo HLA-DR3 en la susceptibilidad a LEG.
- 8.- Los haplotipos que caracterizan a los pacientes con LEG son:
TNFG-TNF1-DRB1*0101-DQA1*0101-DQB1*0501
TNFG-TNF1-DRB1*0407-DQA1*03-DQB1*0302

REFERENCIAS

- 1.- Kotzin BL. Systemic lupus erythematosus. *Cell*. 1996;85:303-6.
- 2.- O'Dell JR., Kotzin BL. Systemic lupus erythematosus. In *Samter's Immunologic Diseases*, ed MM Frank, KF Austen, HN Claman, ER Unanue, pp. 667-97, Boston:Little Brown.
- 3.- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [Letter]. *Arthritis Rheum*. 1997;40:1725.
- 4.- O'Brien WM., Bagby GF. Rare adverse reaction in no-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Rheumatol* 1985;12:13-20, 347-353, 562-567, 785-790.
- 5.- Condeelis JJ. The autoimmune diseases. *JAMA* 1992;268:2882-92.
- 6.- Hochberg MC. The incidence of systemic lupus erythematosus in Baltimore, Maryland 197-1977. *Arthritis Rheum* 1985;28:80-86.
- 7.- Hochberg M. The application of genetic epidemiology to systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1987;14:867-869.
- 8.- Lawrence JS., Martins CL., Drake GL. A family survey of lupus erythematosus. 1. Heritability. *J Rheumatol*. 1987;14:913-921.
- 9.- Deapen D. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1992;35:311-318.
- 10.- Jarvinen P. Systemic lupus erythematosus and related diseases in a nationwide twin cohort: an increased prevalence of disease in MZ twins and concordance of disease features. *J Intern Med* 1992;231:67-72.
- 11.- Gafney PM., Moser KL., Graham RR., and Behrens TW. Recent advances in the genetics of systemic lupus erythematosus. *Rheum. Dis. Clin. North Am*. In press.

- 12.- Harley JB., Moser KL., Gaffney PM., Behrens TW. The genetics of human systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Immunol.* 1998;10:690-696.
- 13.- Shur PH. Genetics of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1995;4:425-437.
- 14.- Srivastava R., Ram BP., & Tyle P. Immunogenetics of the major histocompatibility complex. VCH Publishers, New York.
- 15.- Klein J., Satta Y., O'hUigin C., & Takahata N. The molecular descent of the major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:269-295.
- 16.- Laird DJ., De Tomasso AW., Cooper M., and Weissman IL. 50 million years of chordate evolution: seeking the origins of adaptative immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97:6924-6926.
- 17.- Bjorkman PJ., & Parham P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Immunol* 1990;59:253-288.
- 18.- Boutellier PL. HLA class I chromosomal region, genes, and products: facts and questions. *Crit Rev Immunol.* 1994;14:89-129.
- 19.- Hughes AL. Origin and evolution of HLA class I pseudogenes. *Mol Biol Evol* 1995;12:247-258.
- 20.- Busch R. & Mellins ED. Developing and shedding inhibitions: how MHC class II molecules reach maturity. *Curr. Opin. Immunol.* 1996;8: 51-58.
- 21.- Spies T., Morton CC., Nedospasov SA., Fiers W., Pious D., Strominger JL. Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83:8699-704.
- 22.- Klein J. & O'hUigin C. Composite origin of major histocompatibility complex genes. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 1993;3:923-930.

- 23.- Bodmer JG., Marsh SG., Albert DE., Bodmer WF., Dupont B., Ehrlich HA., Mach B., Mayo WR., Parham P., Sasazuki T. Nomenclature for factors of the HLA system. *Hum Immunol* 1994;41:1-20.
- 24.- Monaco JJ. Structure and function of genes in the MHC class II region. *Curr Opin Immunol* 1993;5:17-20.
- 25.- Trowsdale J. Both man & bird & beast: comparative organization of MHC genes. *Immunogenetics*, 1995;41:1-17.
- 26.- Singer DS. Maguire JE. Regulation of expression of class I MHC genes. *Crit Rev Immunol* 1990;10:235-257.
- 27.- Halloran PF. & Madrenas J. Regulation of MHC transcription. *Transplantation* 1990;10:307-328.
- 28.- Cogswell JP., Zeleznik-Le N. & Ting JPY. Transcriptional regulation of the HLA-DRA gene. *Crit Rev Immunol* 1991; 11:87-112.
- 29.- Glimcher LH. Kara CJ. Sequences and factors: a guide to MHC class II transcription. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:13-49.
- 30.- Klein J, and Sato A. Birth of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 1998;47:199-209.
- 31.- Marsh SGE., Bodmer JG., Albert ED., Bodmer WF., Bontrop WE., Dupont B., Erlich HA. Nomenclature for factors of the HLA system 2000. *Tissue Antigens.* 2001;57:236-283.
- 32.- Hughes AL. & Hughes MK. Natural selection on the peptide-binding regions of major histocompatibility complex molecules. *Immunogenetics* 1995;42:233-243.
- 33.- Abi-Rached L., and Pontarotti P. The MHC "Big-Bang" : duplication and exon shuffling during chordate evolution. A hypothetico-deductive approach. In *major histocompatibility*

complex: Evolution, Structure, and Function, M. Kasahara, ed (Tokyo, Springer-Verlag), pp. 45-52.

34.- Klein J. Natural history of the major histocompatibility complex. John Wiley & Sons, New York.

35.- Kasahara M., Flajnik MF., Ishibashi T. & Natori T. Evolution of the major histocompatibility complex: a current overview. *Transplant Immunol* 1995;3:1-20.

36.- Kaplan D. The onset of disease in twins and siblings with systemic lupus erythematosus *J Rheumatol* 1984;11:648-652.

37.- Buckman KJ. Familial systemic lupus erythematosus. *Arch Intern Med* 1978;138:1674-1676.

38.- Chantler S. Incidence of nuclear antibodies in patients and in related and unrelated groups from a community with a microepidemic of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopath.* 1973;2:9-15.

39.- Mendlovic S. Anti-DNA idiotype and anti-idiotype-specific T cell responses in patients with systemic lupus erythematosus and their first-degree relatives. *Clin Exp Immunol* 1990;82:504-508.

40.- Winchester RJ. Genetic aspects. In: Shur PH (ed). *Clinical Management of systemic lupus erythematosus*. Grune & Stratton: New York, 1983, pp 17-27.

41.- Citera G., Wilson WA. Ethnic and geographic perspectives in SLE. *Lupus* 1993;2:351-353.

42.- Hartung K. Hetero- and homozygosity of MHC class II gene products in systemic lupus erythematosus. The members of the Deutsche Multizentrische SLE-studie. *Tissue Antigens* 1991;38:165-168.

- 43.- Shur PH. Inherited complement component abnormalities. *Ann Rev Med* 1986; 37:333-346.
- 44.- Walport MJ. Complement deficiency in SLE. *Lupus* 1995;4:8.
- 45.- Kono DH. Lupus susceptibility loci in New Zealand mice. *Proc Natl Acad Sci Usa* 1994; 91:10168-10172.
- 46.- Tan EM. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1272-1277.
- 47.- Johnson AE. Cross-sectional analysis of the differences between patients with systemic lupus erythematosus in England, Brazil and Sweden. *Lupus* 1994;3:501-506.
- 48.- Goldstein R., Sengar DP. Comparative studies of the major histocompatibility complex in French Canadian and non-French Canadian Caucasians with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1993;36:1121-1127.
- 49.- Shur PH. The effect of ethnicity on major histocompatibility complex complement allotypes and extended haplotypes in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1990;33:985-992.
- 50.- Lander ES. Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science* 1994;265:2037-2048.
- 51.- Galeazzi M., Sebastiani GD., Morozzi G., Carcassi C., Ferrara GB., Scorza R., Cervera R., de Ramon Garrido E., Fernández-Nebro A., Houssiau F., Jedryka-Goral A., Piassiu G., Papasterides C., Piette JC., Smolen J., Porciello G., Marcolongo R. HLA class II DNA typing in a large series of European patients with systemic lupus erythematosus: correlations with clinical and autoantibody subsets. *Medicine* 2002; 81: 169-78.
- 52.- Russell GI. Hydralazine sensitivity: clinical features, autoantibody changes and HLA-DR phenotype. *Q J Med* 1987;65:845-852.

- 53.- James JA. Immunoglobulin epitope spreading and autoimmune disease after peptide immunization: Sm B/B'-derived PPPGMRPP and PPPGIRGP induce spicosome autoimmunity. *J Exp Med* 1995;181:453-461.
- 54.- Elson CJ. Immunologically ignorant autoreactive T cells, epitope spreading and repertorie limitation. *Immunol Today* 1995;16:71-76.
- 55.- Theofilopolous AH. The basis of autoimmunity. 1. Mechanisms of aberrant self-recognition. *Immunol Today* 1995;16:90-98.
- 56.- Rudwaleit M, Tikly M, Kamashta M, Gibson K, Klinke J, Hughes G, Wordsworth. Interethnic differences in the association of tumor necrosis factor promoter polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1996; 23:1725-8.
- 57.- Jarjour W, Reed AM, Gauthier J, Hunt S, Winfield JB. The 8.5-kb PstI allele of the Stress Protein Gene, Hsp70-2. An independent risk factor for systemic lupus erythematosus in African Americans?. *Hum Immunol* 1996; 45: 59-63.
- 58.- Brenan P, Hajeer A, Ong KR, Worthington J, John S, Thomson W, Silman A, Ollier B. Allelic markers close to prolactin are associated with HLA-DRB1 susceptibility alleles among women with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1383-1386.
- 59.- Pablos JL, Carreira PE, Martin-Villa JM, Montalvo G, Arnaiz-Villena A, Gomez-Reino JJ. Polymorphism of the heat-shock protein gene HSP70-2 in SLE. *Brit J Rheum* 1995; 34: 721-723.
- 60.- Lisker R, Pérez-Briceño R, Granados J, Babinsky V, DeRubens J, Armendares S, Buentello L. Gene frequencies and admixture estimates in a Mexican City population. *Am J Physical Anthropol* 71 : 203-207, 1986.

- 61.- Lisker R, Pérez-Briceño R, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in the State of Puebla, Mexico. *Am J Physical Anthropol* 76 : 331-335, 1988.
- 62.- Lisker R, Ramirez E, Pérez-Briceño R, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican Urban Centers. *Hum Biology* 62 : 791-801, 1990.
- 63.- D'alfonso S., Richardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNF alpha promoter region. *Immunogenetics*. 1994; 39:150-154.
- 64.- Wilson AG., di Giovine FS., Blakemore AIF., Duff GW. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:3195-9.
- 65.- Kroeger-KM; Carville-KS; Abraham-LJ The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol-Immunol*. 1997 Apr; 34(5): 391-9.
- 66.- Vinasco J., Beraún Y., Nieto A., Fraile A., Mataran L., Pareja E., Martín J. Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1997; 49:74-78.
- 67.- Fraile A., Nieto A., Beraún Y., Vinasco J., Matarán L., Martín J. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 1998; 51: 386-90.
- 68.- Wilson AG., Gordon C., di Giovine FS. A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha. *Eur J Immunol* 1994; 24: 191-5.
- 69.- Wilson AG., de Vries N., Pociot G., di Giovine FS., van der Putte LBA., Duff GW. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor a promoter region is strongly associated with HLA A1, B8 and DR3 alleles. *J Exp Med* 1993; 177: 557-60.
- 70.- Beckmann RP., Mizzen LA Welch MJ. Interaction of hsp70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 1990;248:850-854.

- 71.- Sargent CA., Dunham I., Trowsdale J. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:1968-1972.
- 72.- Jarjour W, Reed AM, Gauthier J, Hunt S, Winfield JB. The 8.5-kb PstI allele of the Stress Protein Gene, Hsp70-2. An independent risk factor for systemic lupus erythematosus in African Americans? *Hum Immunol* 1996; 45: 59-63.
- 73.- Pablos JL., Carreira PE., Martín-Villa JM., Montalvo G., Arnaiz-Villena A., Gomez Reino JJ. Polymorphism of the heat-shock protein gene HSP70-2 in SLE. *B J Rheum* 1995;34:721-723.
- 74.- López-Cortés E., Pérez-Quijada J. Mazatecos. Pueblos Indígenas de Méjico. México D.F. Instituto Nacional Indigenista, 1994.
- 75.- Excoffier L., Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* 1995;12:921-927.
- 76.- Cowland JB. DNA polymorphism of HLA class II genes in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1994;43:34-37.
- 77.- Wilson AG. A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha. *Eur J Immunol* 1994; 24:191-195.
- 78.- Hartung K. Major histocompatibility complex haplotypes and complement C4 alleles in systemic lupus erythematosus. Results of a multicenter study. *J Clin Invest* 1992;90:1346-1351.
- 79.- Granados J, Vargas-Alarcón G, Andrade F, Melin-Aldana H, Alcocer-Varela J, Alarcón-Segovia D. The role of HLA-DR alleles and complotypes through the ethnic barrier in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1996;5:184-189.

- 80.- Milner CM., Campbell RD. Polymorphic analysis of the three MHC linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 1992;36:357-362.
- 81.- Milner CM., Campbell RD. Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 1990;32:242-251.
- 82.- Minota S., Cameron B., Wlech WJ., Winfield JB. Autoantibodies to the constitutive 73-kD member of the HSP70 family of heat shock proteins in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1988;168:1475-1480.
- 83.- Pociot F., Ronningen KS., Nerup J. Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2) and HSP70 Hom genes in insulin dependent diabetes mellitus (IDDM). *Scan J Immunol* 1993;38:491-495.
- 84.- Ratanachaiyavong S., Demaine AG., Campbell RD. Et al. Heat shock protein 70 (HSP70) and complement C4 genotypes in patients with hyperthyroid Graves' disease. *Clin Exp Immunol* 1991;84:48-52.
- 85.- Rippmann F., Taylor WR., Rothbard JB., Green NM. A hypothetical model for the peptide binding domain of hsp70 based on the peptide binding domain of HLA. *EMBO J* 1991;10:1053-1059.
- 86.- . (Wilson AG., de Vries N., Pociot G. Et al. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor a promoter region is strongly associated with HLA A1, B8 and DR3 alleles. *J Exp Med* 1993;177:557-560.
- 87.- Rood MJ., van Krugten MV., Zanelli E., et al. TNF -308 A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000;43:129-134.
- 88.- Kroeger KM., Carville KS., Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997;34:391-399.

- 89.- Abraham LJ., Kroeger KM. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukoc Biol* 1999;66:562-566.
- 90.- Verweij CL. Tumor necrosis factor gene polymorphisms as severity markers in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999;58:120-126.
- 91.- Waldron-Lynch F., Adams C., Amos C. Tumor necrosis factor 5' promoter single nucleotide polymorphisms influence susceptibility to rheumatoid arthritis (RA) in immunogenetically defined multiplex RA families. *Genes Immunity* 2001;2:82-87).
- 92.- Imanishi T, Akaza T, Kimura A, Tokunaga K, Gojobori T. Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasasaki T, eds. *HLA*. 1991. Vol 1. Oxford: Oxford University Press, 1992:627-32.
- 93.- Clayton J, Lonjou C. Allele and Haplotype frequencies for HLA loci in various ethnic groups. In: Charron D, ed. *Genetic diversity of HLA. Functional and medical implications*. Vol I. Paris: EDK, 1997: 665-820.

ANEXO 1.- METODOLOGIAS

D).- EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO (Método de Fenol-Cloroformo).

Soluciones:

AKC:

Cloruro de Amonio	8.29 g
Cloruro de Potasio	1.34 g
Agua dd	1.0 Lt.

PBS:

NaCl	7.65
Fosfato de Sodio dibásico	3.8 g
Fosfato de Potasio	0.06 g
Agua dd	1.0 Lt.
Ajustar pH	8.0

SDS 10 %:

SDS (Sodio dodecil sulfato)	10 g
Agua dd	100 ml.

NaCl 5 M:

NaCl	292 g
Agua dd	1.0 Lt.

Tris Base 0.5 M:

Tris Base	60.55 g
Agua dd	1.0 Lt.
Ajustar pH	8.0

Buffer TE:

Tris HCl (10 mM)	1.57 g
EDTA (1mM)	0.32 g
Agua dd	1.0 Lt.
Ajustar pH	8.0

RSB:

NaCl (10 mM)	0.584 g
Tris Base (10 mM)	1.21 g
EDTA (25mM)	9.3 g
Agua	1.0 Lt.
Ajustar pH	7.4

Cloroformo Isoamílico:

Cloroformo	24 partes
Alcohol isoamílico	1 parte

Procedimiento:

- 1.- Colocar 20 ml de sangre total anticoagulada con EDTA en un tubo fálcon de 50 ml.
- 2.- Lavar con 30 mL de PBS, mezclar por inmersión y centrifugar 10 min a 2000 rpm.
- 3.- Eliminar el sobrenadante por aspiración con una pipeta cuidando de no arrastrar el paquete celular.
- 4.- Agregar hasta 50 ml de AKC (solución de lisis de glóbulos rojos), mezclar e incubar 30 min a temperatura ambiente en un mezclador. Después de la incubación, centrifugar 10 min a 2000 rpm.
- 5.- Eliminar el sobrenadante por aspiración. Repetir el lavado de PBS y centrifugar 10 min a 2000 rpm.
- 6.- Eliminar el sobrenadante y lavar nuevamente con AKC, incubar 15 min en movimiento y centrifugar 10 min a 2000 rpm.
- 7.- Eliminar el sobrenadante y lavar con PBS y centrifugar 10 min a 2000 rpm.
- 8.- Eliminar el sobrenadante y agregar 3 ml de RSB, 100 ul de proteinaza K (10 mg/mL), 300 ul de SDS 10 %, mezclar e incubar 6 horas o toda la noche a 65°C en baño maría.

Al siguiente día:

- Saturar Fenol con Tris Base 0.5 M pH 8.0, en una relación 1:1, dejar reposar 15 min a TA o hasta que las dos fases se separen.
- 9.- Agregar 3 ml de fenol saturado a cada muestra, mezclar vigorosamente y centrifugar 5 min a 1500 rpm.
- 10.- Con ayuda de una pipeta Pasteur, descartar la fase orgánica (fase inferior).
- 11.- Repetir los pasos 9 y 10 del lavado con fenol saturado.

- 12.- Agregar 2 ml de buffer TE y 5 ml de cloroformo isoamílico (cloroformo- alcohol isoamílico relación 24:1). Mezclar y centrifugar 5 min a 1500 rpm.
- 13.- Descartar la fase orgánica con una pipeta Pasteur. Lavar nuevamente con cloroformo isoamílico, mezclar y centrifugar 5min a 1500 rpm.
- 14.- Descartar la fase orgánica.
- 15.- Adicionar a la fase acuosa 50 ul de NaCl 5 M, mezclar perfectamente y agregar 15 ml de etanol absoluto frio. Mezclar por inmersión varias veces.
- 16.- Con ayuda de una pipeta, transferir el DNA a un tubo ependor y lavar con 1 ml de etanol al 70 %, centrifugar a 10000 rpm durante 5 min.
- 17.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el DNA con 200ul de H₂O dd o buffer TE.

II).- CUANTIFICACION DE DNA POR ESPECTROFOTOMETRIA

Procedimiento:

1.- Marcar tubos eppendorf de 1.5 o 2.0 mL con el número que corresponda a cada muestra.

2.- Realizar una dilución conocida se la siguiente manera:

Para hacer una dilución 1:200, tomar 5 ul del DNA en solución y adicionar 995 ul de agua dd, mezclar bien. También se pueden hacer otras diluciones como 1:100 o 1:250.

3.- Realizar la lectura de nuestra dilución en un espectrofotómetro de luz UV a una longitud de onda de 260 nm.

4.- La concentración se calcula con la siguiente fórmula:

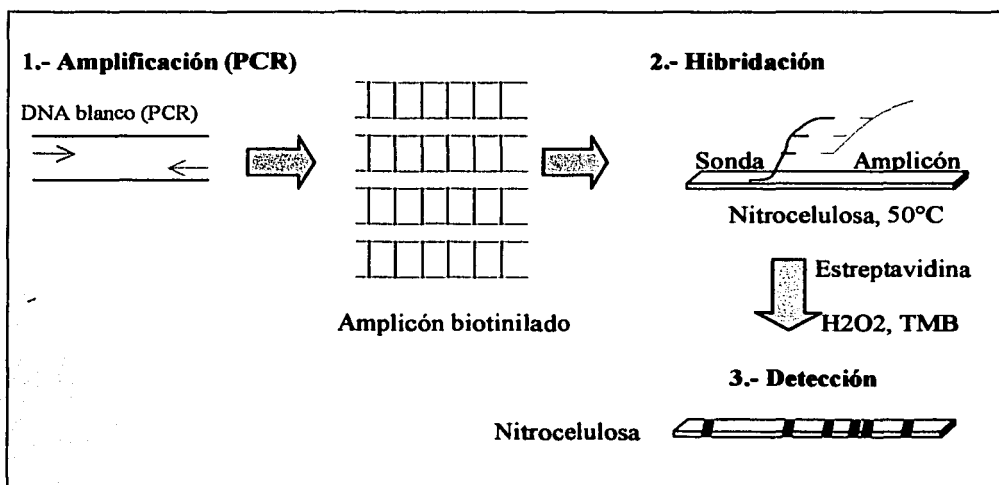
$$\text{Conc de DNA ng/ul} = (A_{260 \text{ nm}}) (\text{Dilución}) (50).$$

5.- En base a esta cuantificación se puede ajustar la concentración de nuestra muestra, generalmente a 100 o 200 ng/ul.

IV).- TIPIFICACION DE HLA-DRB, DQA Y DQB.

METODOLOGÍA: Reacción en cadena de la polimerasa e hibridación con sondas específicas de secuencia (PCR-SSO).

La tipificación genérica de HLA-DRB1, DRB2, DRB3, DRB5, DQA1, DQB1 se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa e hibridación con sondas específicas de secuencia, con el equipo comercial Dynal RELI SSO HLA. Esta metodología consiste en la amplificación de una secuencia, en este caso se amplificaron los exones polimórficos de los genes HLA-DRB1, DQA1 y DQB1 con oligonucleótidos biotinilados. Posteriormente el amplicón marcado con biotina, se desnaturalizó por alcalinidad y se realizó el proceso de hibridación con sondas específicas de secuencia que se encuentran distribuidas en una membrana de nitrocelulosa. Finalmente se lleva a cabo el proceso de detección con la adición de un complejo streptavidina-peroxidasa y posteriormente peróxido de hidrógeno y TMB (tetrametilbencidina) para generar una reacción colorida en donde hubo positividad para la hibridación, **Ver esquema.**



Procedimiento:

- 1.- Prender el termociclador PE 9700 unos 30 minutos antes de su utilización.
- 2.- Programar el quipo con las siguientes condiciones de PCR:

95° C	15 seg.	
60° C	45 seg.	35 ciclos
72 ° C	15 seg.	
70 ° C	5 min	1 ciclo
15 ° C	∞	

- 3.- Preparar la mezcla con las siguientes cantidades por cada tubo de muestra:

en un tubo de PCR de 0.2 ml. Colocar: 10 ul de master MIX, 5 ul de MgCL₂, 8 ul de H₂O y 0.125 ul de *Taq* DNA polimerasa.

- 4.- Agregar 2 ul de DNA a una concentración de 100 ng/ul y mezclar por pipeteo.
- 5.- Si es necesario agregar 2 gotas de aceite mineral para evitar la evaporación y tapar bien los tubos.
- 6.- Colocar los tubos en el termociclador e iniciar el programa de amplificación.

Hibridación:

- 7.- Precalear el horno de hibridación a 50°C.
- 8.- Calentar 50 ml. de buffer de lavado y 50 ml. de buffer de hibridación.

- 9.- Agregar 25 ul de solución desnaturalizante al tubo del amplificado, mezclar bien e incubar por 15 minutos.
- 10.- Colocar una membrana de nitrocelulosa del equipo comercial HLA-DRB o DQA o DQB en el contenedor para reacción y agregar 2 ml de buffer de hibridación precalentado a 50°C.
- 11.- Inmediatamente agregar el volumen total del tubo con el amplificado desnaturalizado, colocar la charola de reacción en el horno de hibridación a 50° C en movimiento durante 30 min.
- 12.- Después e la incubación, eliminar el sobrenadante y agregar 2 ml. de buffer de lavado a temperatura ambiente, agitar por 1 minuto y eliminar el sobrenadante.
- 13.- Agregar 2 mL. de buffer de lavado precalentado a 50° C, e incubar durante 15 minutos en el horno de hibridación a 50° C.
- 14.- Preparar una mezcla de 1.1 mL. de buffer de lavado y 3.3 ul de complejo estreptavidina-peroxidasa, por cada muestra, prepara lo suficiente para el número de muestras que se estén procesando.
- 15.- Terminada la incubación de buffer de lavado a 50° C, eliminar el sobrenadante y agregar 1.1 mL. de la mezcla estreptavidina-peroxidasa. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente en movimiento.
- 16.- Eliminar el sobrenadante y realizar 2 lavados con 1.1 mL. de solución de lavado con incubación de 5 minutos.
- 17.- Realizar una incubación con 1.1. mL de solución de citratos durante 5 minutos en movimiento.

18.- Para el revelado, agregar 933 ul de solución A y 233 ul de solución de tetrametilbencidina, incubar en movimiento durante 10 minutos, cubriendo la placa de la luz con un papel aluminio.

19.- Realizar la interpretación de cada una de las membranas de nitrocelulosa introduciendo el patrón de bandas positivas en el software que es enviado con el equipo de tipificación de HLA (DynaL Pattern Matching Program).

V).- ELECTROFORESIS DE DNA EN GEL DE AGAROSA.

METODOLOGÍA: Separación de fragmentos de DNA en un campo eléctrico. En este proceso se podrán separar fragmentos de DNA amplificado en un a fase sólida (agarosa) tras la aplicación de un campo electrico. La movilidad electroforética es inversamente proporcional al tamaño de cada molécula, es decir los fragmentos más pequeños migrarán electroforéticamente más rápido que los fragmentos pesados. El DNA está cargado negativamente por lo que al aplicar una corriente eléctrica, el DNMA migrará en dirección al polo positivo de la cámara de electroforesis. Esto se hace con la ayuda de una solución con alto contenido iónico como la solución TBE.

REACTIVOS:

-Agarosa Grado Molecular (Sigma, Aldrich)

-Solución de electroforesis TBE 10X:

Tris-HCl

Ac. Bórico

EDTA

H2O

-Bromuro de etidio 10 mg/ml.

Bromuro de etidio 100 mg

dd H2O 10 ml.

Mezclar. El bromuro de etidio es una sustancia con alto poder mutagénico, deberá manejarse con guantes y debere evitarse su inhalación o contacto con la piel.

1.- Preparar el molde donde se solidificará el gel con los peines debidamente insertados.

2.- Para preparar un gel de agrosa al 2 % se pesan 2 gr. De agarosa de bajo punto de fusión (Sigma, Aldrich) por cada 100 ml de solución TBE a utilizar.

- 3.- Colocar la agarosa y la solución TBE al 0.5 X en un matraz y calentar hasta lograr ebullición.
- 4.- Agitar continuamente el matraz durante la ebullición con la finalidad de disolver los granos de agarosa.
- 5.- Cuando se observa que la solución esta transparente, enfriar al chorro de agua, durante unos minutos hasta que la solución se aproxime a los 55 o 60 ° C.
- 6.- En una campana de extracción, agregar 2uL de bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml. Por cada 100 ml de gel. Mezclar bien.
- 7.- De preferencia dentro de la campana de extracción, vaciar el contenido del matraz en el molde de la cámara de electroforesis y dejar solidificar el gel durante unos 15 a 20 minutos a temperatura ambiente.
- 8.- Cuando el gel esta solidificado, retirar cuidadosamente los peines y colocar dentro de una cámara de electroforesis horizontal con solución TBE al 0.5 X.
- 9.- Mezclar el amplificado en una relación de V/V con solución de carga y depositar esa mezcla con cuidado en cada uno de los pozos del gel y aplicar corriente eléctrica basado en los lineamientos que marcan la cantidad de volts por cada cm^2 de gel.

VI).- ANÁLISIS DE POLIMORFISMO DE HSP70-2

METODOLOGÍA: PCR-RFLP

El polimorfismo del gen HSP70-2 en la posición 1267 se determinó mediante reacción en cadena de la polimerasa y corte con la endonucleasa de restricción *Pst* I. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos 1) nucleótidos 1083-1102 dentro de la región codificante 5'-CATCGACTTCTACACGTCCA-3' y 2) nucleótidos 2180-2199 dentro de la región terminal 3' que no se transcribe 5'-CAAAGTCCTTGAGTCCCAAC-3'.

Procedimiento:

1.- Preparar las mezclas de reacción (25 ul de volumen final) de la siguiente manera:

(dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 1.25uM:	4.0 ul
Buffer PCR 10 X:	2.5 ul
MgCL ₂ 25 mM	1.5 ul
Oligonucleótido 1 (10 uM)	
(5'-CATCGACTTCTACACGTCCA-3')	2.5 ul
Oligonucleótido 2 (10 uM)	
(5'-CAAAGTCCTTGAGTCCCAAC-3'.)	2.5 ul
Agua dd	10.5 ul
Taq DNA polimerasa 5 U/ul	0.125 ul
DNA genómico 100 ng/ul	2.0 ul

2.- Colocar los tubos de 0.2 ml de PCR en el termociclador. En este caso utilizamos un modelo Perkin Elmer 9700 (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems).

Condiciones de PCR:

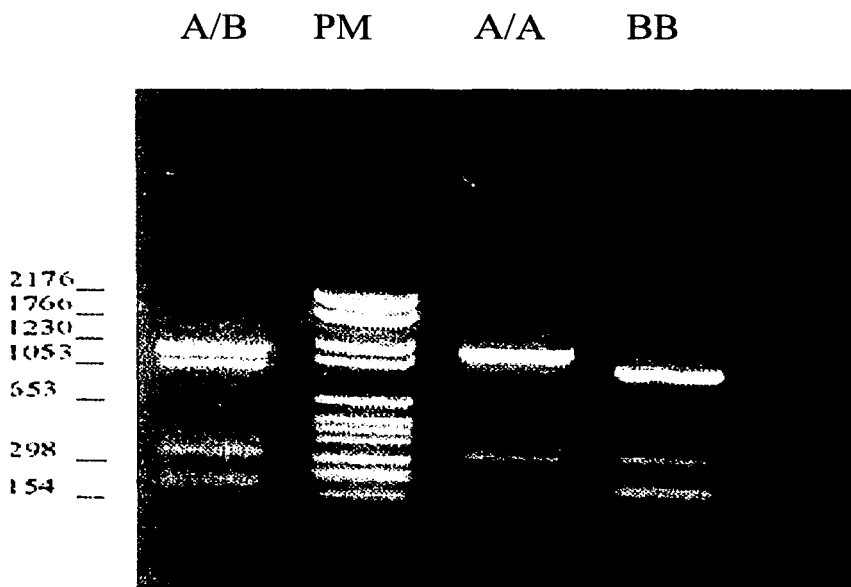
94° C	5 min.	1 ciclo
94° C	1 min.	
56° C	1 min.	35 ciclos
72 ° C	2 min.	
70 ° C	10 minutos	1 ciclo
4 ° C	∞	

3.- Verificación de amplificado por electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, tenido con bromuro de etidio. La banda de amplificado que se obtiene es de 107 pares de bases.

4.- El proceso de digestión con la endonucleasa de restricción *Pst* I se realiza de la siguiente manera:

- a) En un tubo de 0.2 ml, realizar una mezcla de 0.5 ul de *Pst* I, Buffer de la enzima 2.0 ul, Agua 0.5 ul y 15 ul de amplificado.
- b) Para evitar la evaporación, agregar una gota de aceite mineral a cada tubo de reacción.
- c) Incubar a 37 ° C en un baño maría o en un horno de hibridación, durante toda la noche.
- d) Corroborar el patrón de restricción por electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 2.5 % (Agarosa 1000, Gibco, Life-Technologies).

e) Interpretación: La ausencia de sitio de corte para *Pst* I en el fragmento amplificado genera un producto de 1117 bp después de la restricción (alelo A), mientras que en presencia de sitio de restricción la endonucleasa genera dos fragmentos, uno de 936 y otro de 181 pares de bases (alelo B). Ver fotografía:
Carril 1: Heterocigoto HSP70*2 A/B (1117, 936 y 181 pb); Carril 2: Peso molecular; Carril 3: Homocigoto HSP70*2 A/A (1117 pb); Carril 4: Homocigoto HSP70*2 B/B (936 y 181 pb).



VII.- ANÁLISIS DE POLIMORFISMO DEL PROMOTOR DE TNF- α

METODOLOGÍA: PCR-RFLP.

El genotipo de el polimorfismo TNF-308 se realizó por reacción en cadena de la polimerasa y corte con la endonucleasa de restricción *Nco* I. En este metodología el oligonucleótido 1 (5'-GAGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT) contiene un nucleótido cambiado a propósito (subrayado) para generar el sitio de restricción de la enzima *Nco* I. En el caso de que el gen contenga la sustitución de A por G en la posición -308 (alelo TNF2) provoca un error en el alineamiento del oligonucleótido (mismatch) y por lo tanto no se genera el sitio de corte de la enzima. Si el gen contiene el nucleótido G en la posición -308 (gen silvestre), si se obtiene el corte generando dos fragmentos, uno de 20 pb y otro de 87 pb.

Procedimiento:

1.- Preparar las mezclas de reacción (25 ul de volumen final) de la siguiente manera:

(dATP, dGTP, dCTP, dTTP) [1.25uM]	4.0 uL
Buffer PCR 10 X:	2.5 uL
MgCL ₂ [25 mM]	1.5 uL
Oligonucleótido 1 [10 uM]	
(5'-GAGGCAATAGGTTTTGAGGG <u>C</u> CAT)	2.5 uL
Oligonucleótido 2 [10 uM]	
(5'-GGGACACACAAGCATCAAG)	2.5 uL
Agua dd	10.5 uL
Taq DNA polimerasa [5 U/uL]	0.125 uL
DNA genómico [100 ng/uL]	2.0 uL

2.- Colocar los tubos de 0.2 ml de PCR en el termociclador. En este caso utilizamos un modelo Perkin Elmer 9700 (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems).

Condiciones de PCR:

94° C	5 minutos	1 ciclo
94° C	40 segundos	
60° C	40 segundos	35 ciclos
72 ° C	40 segundos	
70° C	10 minutos	1 ciclo
4 ° C	∞	

3.- Verificación de amplificado por electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, tenido con bromuro de etidio. La banda de amplificado que se obtiene es de 107 pares de bases.

4.- El proceso de digestión con la endonucleasa de restricción *Nco* I se realiza de la siguiente manera:

- f) En un tubo de 0.2 ml, mezclar de 0.5 uL de *Nco* I (Gibco BRL, Life Technologies), 2.0 uL de Buffer de la enzima y 0.5 uL de Agua . Finalmente agregar 15 uL del amplificado.
- g) Para evitar la evaporación, agregar una gota de aceite mineral a cada tubo de reacción.
- h) Incubar a 37 ° C en un baño maría o en un horno de hibridación, durante toda la noche.
- i) Corroborar el patrón de restricción por electroforesis en gel de agarosa de alta resolución al 2.5 % (Agarosa 1000, Gibco, Life-Technologies).o en un gel de poliacrilamida (Sigma Aldrich) no desnaturizante al 20 % de concentración.

j) Interpretación:

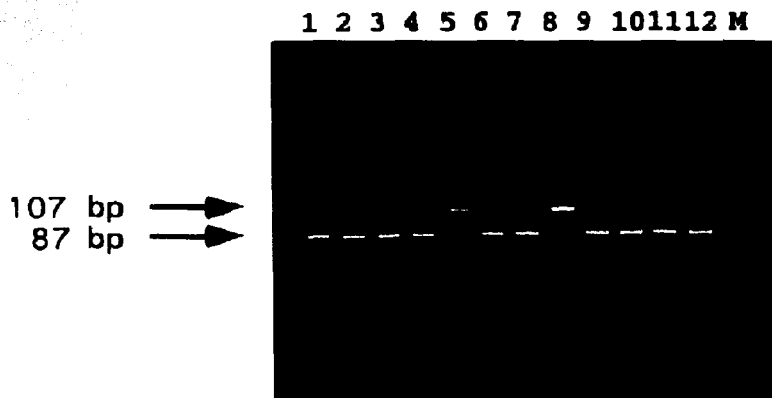
Las bandas de 87 y 20 pares de bases definen al alelo TNF1 (si hay corte), mientras que la banda de 107 pares de bases define al TNF2 (no hay corte); por lo tanto en cada caso tendremos un patrón de restricción particular:

Homocigoto TNF-1/1: bandas de 20 y 87 pares de bases (pb)

Heterocigoto TNF-1/2: bandas de 20, 87 y 107 pb

Homocigoto TNF-2/2: banda de 107 pb (No corte)

Ver Fotografía:



Nota: si se observa las muestras 17 y 18 muestran las bandas de 20, 87 y 107 pares de bases por lo tanto son heterocigotos TNF1/2 y el resto de muestras solamente muestran la banda de 87 y 20 pares de bases por lo que son homocigotos TNF 1/1.

VIII).- RECONSTITUCIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS:

1.- Centrifugar el tubo durante unos segundos a 10,000 rpm. para llevar el DNA al fondo del tubo.

2.- Destapar cuidadosamente el tubo y agregar 200 ul de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA).

3.- Dejar hidratar por 2 minutos y mezclar vigorosamente en el vórtex unos 15 segundos.

Se recomienda almacenar los oligonucleótidos reconstituidos a una temperatura de -20°C .

NOTA: Los oligonucleótidos reconstituidos en buffer TE tienen una estabilidad mayor a 6 meses a -20°C .

IX).- CÁLCULOS PARA AJUSTAR LA CONCENTRACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS A 10 μ M.

1.- Se toma inicialmente el valor de cantidad total de nmoles que se reporta en la hoja de datos del oligonucleótido.

2.- A partir de los n moles totales, se calcula la cantidad en pmoles, multiplicando X 1000.

Ejemplo: $90.38 \text{ nmoles} \times 1000 = 90,380 \text{ pmol}$

3.- Se obtiene la cantidad de pmol/ul, dividiendo la cantidad de pmol/ el volumen en el que fue disuelto el oligonucleótido (200 ul).

4.- Tomar 10 ul del stock de oligo y llevamos al volumen final equivalente a la cantidad de pmol/ul con agua dd o buffer TE.

X).- DILUCIÓN DE DESOXIRIBONUCLEÓTIDOS

Concentración final de: 1.25 μ M.

- 1.- Tomar un DNTP set (4x250 μ l; 25 μ M cada uno) y juntar las soluciones de los cuatro desoxiribonucleótidos en un tubo falcon de 50 ml.
- 2.- Hacer una dilución 1:20 con agua destilada, mezclar bien en el vortex.
- 3.- Hacer alícuotas de 500 μ l y congelar a -20° C.

ANEXO 2

FORMULAS ESTADÍSTICAS UTILIZADAS

ANÁLISIS PARA POBLACIÓN NO RELACIONADA.

1.- Frecuencias antigénicas y génicas.

La frecuencia antigénica (FA) es la proporción de sujetos del total, que son portadores de un determinado antígeno. Esta se calcula en porcentaje. Ej: si dos 2 de 100 individuos tienen el marcador B27, la frecuencia antigénica será de 2 %.

La frecuencia génica (FG) se calcula a partir de la FA la cual se toma en números absolutos mediante la fórmula de Haldane cuya formula es la siguiente:

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

2.- Tabla De contingencia de 2 x 2:

Cuando dos grupos serán comparados, es necesario utilizar una tabla de contingencia de 2 x 2. Esta tabla se requiere para el calculo de la significancia, riesgo relativo, razón de momios e intervalo de confianza. Una tabla de contingencia puede tener dos o más renglones o columnas pero esencialmente para estudiar asociaciones se utiliza con 2 columnas y 2 renglones.

		Alelo		
		Presente	Ausente	
Pacientes	a	b	a + b	
Controles	c	d	c + d	
Columnas Totales	a + c	b + d	N = a+b+c+d	

3.- Prueba de Chi-cuadrada:

Para calcular la Chi-cuadrada para el mismo dato se construye una tabla de contingencia de 2 x 2, se colocan en cada casilla el numero de veces que ocurre cada evento y se calculan las frecuencia esperadas. La frecuencia esperada en una celda es el producto de el renglón relevante y el total de la columna divididos entre el tamaño de la muestra (gran total $N=a+b+c+d$). La diferencia entre los valores observados y esperados (residual) es la misma para cada celda pero con diferentes signos (- o +). Esto significa que es una sola observación independiente en vez de cuatro con un grado de libertad solamente. La Chi-cuadrada es la suma de diferencia entre la frecuencia observada y esperada (O-E) al cuadrado entra la frecuencia esperada para todas las celdas.

$$X^2 = \Sigma [(O-E)^2/E]$$

4.- Prueba exacta de Fisher:

La corrección de Yates puede ser utilizada para hacer ajustes en la continuidad en casos en los que se realiza la prueba de Chi-cuadrada con tamaños de muestra pequeños. Sin embargo esta corrección no elimina la necesidad de contar con frecuencias esperadas. Las frecuencias esperadas en cada celda de una tabla de contingencia de 2x2 necesitan ser al menos de 5 para que la prueba de Chi cuadrada se confiable. En general se considera que hay una frecuencia esperada de uno o más y menor de cinco o menos una prueba de significancia alternativa y confiable es la prueba exacta de Fisher. El resultado de una

prueba exacta de Fisher usualmente es semejante al valor de chi-cuadrada con la corrección de Yates. La formula de la prueba exacta de Fisher es la siguiente:

$$p = \frac{(a+b)! (a+c)! (b+d)! (c+d)!}{n! a! b! c! d}$$

5.- Calculo del intervalo de confianza

Cuando un valor, ya sea una proporción o una razón de momios obtenidos de una muestra es el estimado de un valor "real" desconocido (dentro de la población de donde la muestra fue tomada), el intervalo de confianza en este tipo de casos puede ser de mucha utilidad.

Dicho intervalo es más informativo que los simples resultados de una prueba de hipótesis donde la hipótesis nula es rechazada o aceptada. Un problema en las pruebas de hipótesis es que la no significancia puede determinar la aceptación de la hipótesis nula, lo cual mas bien podría ser un error para rechazarla (debido a una muestra pequeña, por ejemplo). En los casos donde se comparan dos grupos, el intervalo de confianza ayuda al investigador a observar que tan grande puede ser la diferencia entre dos proporciones y no solamente a saber si solo es diferente a cero.

Un intervalo de confianza de 95 % de la diferencia entre dos proporciones puede calcularse con la siguiente fórmula:

$$P_{diff} \pm 1.96 ES_{diff} \quad ES_{diff} = 1/n [(b+c) - ((b-c)^2/N)]^{1/2}$$

ANEXO 3. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

FORMATO DE CARTA DE CONSENTIMIENTO

PROYECTO

“GENÉTICA DE LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO EN PACIENTES MESTIZOS MEXICANOS”

Resumen del Proyecto: El lupus eritematoso generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por afectar diferentes órganos y por la presencia de anticuerpos dirigidos contra muchas estructuras celulares. El o los motivos por los cuales se desarrolla esta enfermedad no se conoce bien. Sin embargo los investigadores han centrado su atención en los factores genéticos que son importantes en el control del sistema inmunológico. Estudios previos en la población caucásica han descrito la asociación de LEG con algunas variantes de estos genes como el HLA-B8, DR3, mientras que en otras poblaciones como la Japonesa, la enfermedad se ha asociado con el HLA-DR2. en algunos casos la genética de esas poblaciones ha complicado la asignación del verdadero o de los

verdaderos genes responsables de la susceptibilidad. Algunos estudios realizados en la población mexicana sostienen que el HLA-DR está asociado con la susceptibilidad a LEG, sin embargo aún hay pocos datos acerca de la genética de LEG en los mexicanos. Es importante recordar que la población mestiza mexicana se conformó por mezcla genética entre Indígenas autóctonos, Españoles y Negros. El objetivo de este proyecto es determinar el papel de los genes del complejo principal de histocompatibilidad en la susceptibilidad a LEG en la población mestiza mexicana.

Su participación en este proyecto consiste en donar una pequeña cantidad de sangre 20 ml, lo cual servirá como fuente de su material genético. Toda la información obtenida de este estudio será confidencial y no obtendrá ningún beneficio personal a partir de ella.

La participación es totalmente voluntaria y su estatus como paciente del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán será la misma independientemente de su participación o no en este estudio.

Con todo lo anterior; si decide aceptar, por favor escriba sus datos completos:

Yo _____ he leído y entendido la información anterior que se escribe en este documento. Mis dudas y todas mis preguntas han sido contestadas.

ACEPTO PARTICIPAR VOLUNTARIAMENTE EN ESTE PROYECTO:

NOMBRE _____

FIRMA _____

NOMBRE Y FIRMA INVESTIGADOR _____

FECHA _____

ANEXO 4: ARTÍCULOS PUBLICADOS

BRIEF COMMUNICATION

Heat-shock protein (HSP70-2) allelic frequencies in three distinct Mexican populations

J Zúñiga¹, G Vargas-Alarcón², N Osnaya¹, S Martínez-Tripp², TS Rodríguez-Reyna¹, B Hernández-Martínez¹, R Hesiquio², G Hernández-Pacheco², R Gamboa², F Juárez¹, N Salgado¹ and J Granados¹

¹Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15 Tlalpan 14000, México D.F.; ²Cellular Biology Section, Department of Physiology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México D.F., and Medicine School, Universidad Panamericana, Mexico

The major histocompatibility complex (MHC) genes are highly polymorphic and therefore have been useful in population genetics and disease association studies. We analyzed restriction fragment length polymorphism of HSP70-2 alleles in healthy unrelated Mestizo, Mazatecan and Nahuatl populations. Both Indian groups, Mazatecans and Nahuas, were in Hardy-Weinberg equilibrium, while Mestizos were in disequilibrium ($\chi^2 = 0.399$; $P < 0.05$). The Mazatecan Indians presented a high frequency of BB homozygosity (17.35%) compared to Mestizos (5%) ($P = 0.01$). Mexican ethnic groups present differences in distribution of BB genotype. The low frequency of BB genotype in Mestizos may be the result of a negative selection process.

Keywords: heat-shock protein 70; major histocompatibility complex; HSP70-2 polymorphism; Mexican ethnic groups; autoimmunity

The major histocompatibility complex (MHC) genes are located in the short arm of the sixth human chromosome. These genes are highly polymorphic and therefore have been useful in population genetics and disease association studies.¹ The Amerindian tribes are excellent candidates for genetic structure and diversity analyses in populations.² Some Mexican ethnic groups were genetically characterized by MHC class I, class II and class III gene frequencies and they showed similarities with South American Indian groups.¹ The MHC class III genes are located in a 1100 kb segment that lies between the HLA-B (class I) and DR (class II) loci. Recently, three heat-shock protein 70 (HSP70) genes have been mapped within the MHC class III region: HSP70-1, HSP70-2 and HSP70-Hom.^{3,4} In this study, we analyzed genetic polymorphism and allelic frequencies of HSP70-2 alleles in Mexican Mestizo and in two Mexican Amerindian populations: Mazatecan and Nahuatl. A Mexican Mestizo is defined as an individual who was born in Mexico and is descendant from the original autochthonous inhabitants of such region, and from individuals, mainly Spaniards of Caucasian and/or Black origin, that came to America during the 16th century. The Mazatecans who inhabit the northern region of Oaxaca and some areas in the State of Veracruz, are linguistically classified within the Olmeca-Otomangue group, Otomiano-Mixteco subgroup and Popolca family.⁵ A Macro-Nahuatl ethnic group was

included in the study, the splendor of the Nahuatl ethnic group was achieved in the 15th century, but underwent annihilation by the Aztec civilization.⁶

The restriction pattern observed in all amplified DNA samples generated by endonuclease *Pst*I is consistent with the pattern described in previous studies.⁸

The lack of the polymorphic *Pst*I site within the HSP70-2 gene generated a single product of 1117 bp after restriction (allele A), whereas that with the *Pst*I site produced two fragments of 936 and 181-bp (allele B) (Figure 1). Genotypic and gene frequencies of HSP70-2 genes in Mexican Mestizo, Mazatecan and Nahuatl populations are shown in Table 1. The two Indian populations were in Hardy-Weinberg equilibrium, while the Mexican Mestizo was in disequilibrium ($\chi^2 = 0.399$, $P < 0.05$). The frequencies of AA and AB genotypes were similar in Mazatecan (AA = 39.1% and AB = 43.4%) and Nahuatl (AA = 48.8% and AB = 43.7%) populations; however, in Mexican Mestizo the AB genotype was predominant (AB = 72.2%). The Mazatecan population presents a high frequency of BB homozygosity (17.3%) with a significant difference when compared to Mexican Mestizo (5%) ($P = 0.01$). The distribution of the A allele was similar in our three populations; however, we observed an increase in the B allele frequency in the Mestizo population (gene frequency (g.f.) of B allele = 0.411), this increase was not statistically significant. Genotype and allele frequencies obtained in the three distinct Mexican populations were compared with those previously reported in other populations (Table 1). A low frequency of BB homozygotes was observed in Mexican Mestizo compared with Spaniards (Mediterranean),⁸ Caucasian (UK),⁹ and Afro-American¹⁰ populations. The other two genotypes, AA and AB,

Correspondence: Dr J Granados, Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga, 15 Tlalpan 14000, Mexico City
Received 16 February 1999; revised and accepted 15 April 1999

Table 1 Genotypic and gene frequencies of HSP70-2 in three distinct Mexican ethnic groups compared with other populations*

Genotype	Nahua n = 80 n(%)	Mazatecan n = 46 n(%)	Mestizo* n = 158 n(%)	Caucasian (UK) n = 110 n(%)	Mediterranean n = 117 n(%)	Afro-American n = 42 n(%)
AA	39 (48.8)	18 (39.1)	36 (22.8)	36 (32.7)	38 (32.5)	7 (16.7)
AB	35 (43.7)	20 (43.4)	114 (72.2)	64 (58.2)	59 (50.4)	19 (45.2)
BB	6 (7.5)	8 (17.3)	8 (5)†	10 (9.1)	20 (17.1)	16 (38.1)
Alleles	n/g.f.	n/g.f.	n/g.f.	n/g.f.	n/g.f.	n/g.f.
A	113 (0.706)	56 (0.608)	186 (0.589)	136 (0.617)	135 (0.577)	33 (0.393)
B	47 (0.293)	36 (0.391)	130 (0.411)	84 (0.382)	99 (0.423)	51 (0.607)

*Hardy-Weinberg disequilibrium $\chi^2 = 0.399$, $P < 0.05$. †Significant decrease of BB homozygosity in Mexican Mestizo ethnic group (Mestizo vs Mazatecan $P = 0.01$).

*A panel of 158 healthy unrelated Mexican Mestizo individuals were studied. A sample of 46 healthy unrelated individuals from the Mazatecan ethnic group settled in Huautla de Jimenez and San Mateo Yoloxochil, two Mexican villages located in the State of Oaxaca and 80 unrelated individuals belonging to the Macro-Nahua ethnic group were included in the study.

show similar frequencies in all compared populations. The allele analysis is also shown in Table 1; the frequencies for the A allele are similar to those present in the other populations, except when compared to Afro-American which shows a decreased frequency of this allele in relation to all Mexican ethnic groups, specially with Nahua, in which the A allele frequency is the highest. In the case of B allele distribution, its frequency was similar to that reported in Caucasian, but decreased in our three populations when compared to an Afro-American population.

In human beings, the HSP70 family is mapped in the short arm of the sixth chromosome. Limited polymorphism in the HSP70 genes has been described.⁶ The HSP products play an important role in the movement of peptides across intracellular membranes and in protein conformation.^{9,6} Recent studies have suggested that HSPs are a major target of immune response in rheumatic diseases.¹¹ In SLE, there are autoantibodies against different HSPs.¹¹ Thus, the chromosome mapping of the HSP family in the MHC class III region, the strong linkage disequilibrium with other important MHC alleles and the relevance in the immune response point out that HSP70 genes could be relevant to susceptibility for autoimmune diseases. Polymorphism in the HSP70-2 gene is associated with an increase in the risk to develop type 1 diabetes,¹² systemic lupus erythematosus,¹⁰ and rheumatoid arthritis.¹²

The present study describes the allele and genotype frequencies of the HSP70-2 gene in three Mexican populations. The determination of MHC polymorphism in Indian populations is important because the Mexican Mestizo population has a high frequency of Indian, Caucasian and Black genes.¹³ In this study, the Mexican populations present similar distribution of A and B allele frequencies. Interestingly, the BB genotype in Mexican Mestizo and Nahua ethnic groups was infrequent (5% and 7.5%) respectively, compared with the Mazatecan ethnic group (17.3%). This must be noted, since the BB homozygosity is associated with susceptibility to autoimmune diseases in Caucasian¹⁰ and Afro-American¹⁰ populations. The BB genotype low frequency in a healthy Mestizo population is understood, and this may be the result of a negative selection process or may be co-related with a low incidence of certain autoimmune diseases. The

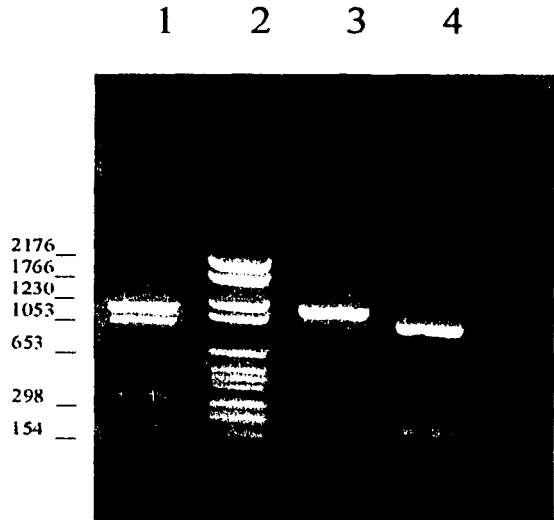


Figure 1 HSP70-2 restriction fragment length polymorphism was characterized by a PCR procedure. This analysis was performed considering the polymorphic *Pst*I site at position 1267 of these alleles. The PCR-amplified were cleaved with the endonuclease *Pst*I (Gibco, USA) and electrophoresed on ethidium bromide-stained 1.5% agarose. DNA lacking the polymorphic *Pst*I site within the HSP70-2 gene generates a single product of 1117 bp after restriction (A allele), whereas that with the *Pst*I site produced two fragments of 936 and 181 bp (B allele). Lane 1: heterozygous AB; Lane 2: Molecular Weight Marker; Lane 3: homozygous AA; Lane 4: homozygous BB.

HSP70-2 polymorphism is due to an A-G substitution in the coding sequence of the HSP70-2 gene. Recent reports show quantitative differences in HSP70-2 expression between BB and AB individuals.¹⁴ These differences in regulation could cause abnormalities in self-tolerance.

Acknowledgements

We thank Astrid Cruz Semidey for her valuable comments on the writing of this manuscript.

References

- 1 Klein J. *Natural History of the Major Histocompatibility Complex*. Wiley and Sons: New York, 1986, p 635.
- 2 Layrisse Z, Layrisse M, Heinen HD, Wilbert J. The histocompatibility system in the Warao Indians of Venezuela: Warao exhibit restricted polymorphism in A, B and C loci, HLA system, and simplicity of the HLA-D locus. *Science* 1976; **194**: 1135-1138.
- 3 Kotsyu DD, Amos DB. Mysteries of the Amerindians. *Tissue Antigens* 1981; **16**: 111-123.
- 4 Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J, Campbell RD. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 1968-1972.
- 5 Milner CM, Campbell RD. Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 1990; **32**: 242-251.
- 6 Milner CM, Campbell RD. Polymorphic analysis of the three MHC linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 1992; **36**: 357-362.
- 7 Swadesh M. *Indian Linguistic Groups of Mexico*. Escuela Nacional de Antropología e Historia: México, 1959.
- 8 Pablos JL et al. Polymorphism of the heat-shock protein gene HSP70-2 in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1995; **34**: 721-723.
- 9 Pociot F, Ronningen KS, Nerup J. Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2) and HSP70. Hom genes in insulin dependent diabetes mellitus (IDDM). *Scand J Immunol* 1993; **38**: 491-495.
- 10 Jarjour W, Reed AM, Gauthier J et al. The 8.5-kb Pst I allele of the stress protein gene, HSP70-2. An independent risk factor for systemic lupus erythematosus in African Americans? *Hum Immunol* 1996; **45**: 59-63.
- 11 Minota S, Cameron B, Welch WJ, Winfield JB. Autoantibodies to the constitutive 73-kD member of the HSP70 family of heat shock proteins in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1988; **168**: 1475-1480.
- 12 Vinasco J, Beraun Y, Nieto A et al. Heat shock protein 70 polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1997; **50**: 71-73.
- 13 Lisker R, Ramírez E, Pérez Briceño R et al. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum Biol* 1990; **62**: 791-801.



Tumor necrosis factor- α promoter polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE)

J Zúñiga¹, G Vargas-Alarcón², G Hernández-Pacheco², C Portal-Celhay³, JK Yamamoto-Furusho³ and J Granados³

¹Molecular Biology and Immunogenetics Laboratory, Infectious Diseases Unit, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Mexico City, Mexico; ²Cellular Biology Section, Physiology Department, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico; ³Immunology and Rheumatology Department, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

The major histocompatibility (MHC) genes including TNF- α , HSP70 and HLA genes have been associated with systemic lupus erythematosus (SLE) in several populations. In this study we analyze the polymorphism of TNF- α promoter in 51 Mexican Mestizo SLE patients and 55 ethnically-matched healthy controls by polymerase chain reaction methods. No statistically significant differences were observed in the TNF-308 allele and genotype distribution between patients and healthy controls. However, we found a significant increase in the TNF G/A-238 genotype and in the TNFA-238 allele frequencies in the SLE group when compared with healthy controls ($P_c = 0.03$, $OR = 4.77$ and $P_c = 0.02$, $OR = 3.62$, respectively). DRB1 analysis showed a similar distribution in patients and controls. Linkage disequilibrium was observed for five haplotypes: DRB1*1401-TNFA-238 ($D = 0.84$; $D' = 1.0$; $P = 0.015$); DRB1*0301-TNFA-238 ($D = 1.38$; $D' = 0.41$; $P = 0.042$); DRB1*1106-TNF2-308 ($D = 0.9$; $D' = 1.0$; $P = 0.0006$); DRB1*1104-TNF2-308 ($D = 0.83$; $D' = 0.45$; $P = 0.02$) and DRB1*1406-TNF2-308 ($D = 0.83$; $D' = 0.45$; $P = 0.02$). Our data suggest that the association between the TNF- α -238 polymorphism and SLE could play a major role in disease susceptibility. *Genes and Immunity* (2001) 2, 363–366.

Keywords: SLE; genetic susceptibility; HLA genes; MHC region; TNF promoter polymorphisms; Mexicans

Introduction

Several HLA alleles have been reported to be associated to systemic lupus erythematosus (SLE).¹ The mechanism by which these genes determine susceptibility is not completely understood and the participation of unknown susceptibility genes in linkage disequilibrium with those currently detected is being suggested. The gene that codifies for tumor necrosis factor- α (TNF- α) an important inducible proinflammatory cytokine,² is located within the major histocompatibility complex (MHC) class III region in human chromosome 6.³ TNF- α polymorphisms have been related in the pathogenesis of SLE,^{4–6} rheumatoid arthritis (RA)^{7,8} and ankylosing spondylitis.⁹

Two-biallelic polymorphisms in the promoter region of the TNF- α gene have been recently described. The first is located at position -238 in relation to the transcription start site in which the presence of adenine (A) defines the TNFA allele; and the presence of guanine (G) defines the wild-type and more common allele TNFG.¹⁰ The second

polymorphism is located at position -308; the presence of G defines the TNF1 allele and A defines TNF2 allele.¹¹

It has been demonstrated that these different allelic forms have functional implications. The TNF2 allelic form results in a two-fold greater transcription greater than the TNF1 form in PMA-stimulated Jurkat and U937 cells.¹¹ On the other hand, -308 G/A polymorphisms may play a role in the altered TNF- α gene expression observed in individuals with the HLA-A1, B8, DR3 haplotype.¹²

Association of different susceptibility alleles is particular to different populations. In the Caucasian population, the TNF2 allele has been associated with SLE susceptibility.^{13,14} In South African patients, it has been demonstrated that the TNF2 and HLA-DR alleles contribute independently to susceptibility to SLE while the TNF2 allele did not show any special distribution with particular HLA-DR genotypes.¹³ However, in Caucasian patients, the TNF2 allele is in linkage disequilibrium with the HLA-DR3 allele.^{15,16} In the present study we analyzed the allelic and haplotypic distribution of TNF- α promoter polymorphisms in Mexican Mestizo SLE patients.

Results

Table 1 shows the distribution of TNF- α promoter polymorphism genotype and allele frequencies on 51 SLE

Correspondence: Dr J Granados, Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan 14000, Mexico City, Mexico
E-mail: joazn@ynhoo.com

Received 11 June 2001; revised 29 July 2001; accepted 3 August 2001

Table 1 Distribution of TNF- α promoter polymorphisms genotypes and gene frequencies in SLE Mexican Mestizo patients and healthy controls

	SLE (n = 51/102) n (%)		Healthy (n = 55/110) n (%)		P	OR	CI 95%
TNF-α Genotypes							
-308 polymorphism							
TNF 1/1	44	(86.2)	52	(94.5)	NS		
TNF 1/2	6	(11.7)	3	(5.4)	NS		
TNF 2/2	1	(2.0)	0	(0)	NS		
-238 polymorphism							
TNF G/G	38	(74.5)	51	(92.7)	NS		
TNF G/A	11	(21.0)	3	(5.4)	0.03	4.77	(1.12-23.23)
TNF A/A	2	(3.9)	1	(1.9)	NS		
TNF-α Alleles							
-308 polymorphism							
TNF 1	94	0.921	107	0.972	NS		
TNF 2	8	0.078	3	0.027	NS		
-238 polymorphism							
TNFG	87	0.853	105	0.954	NS		
TNFA	15	0.147	5	0.045	0.02	3.62	(1.17-11.92)

g.f., gene frequencies; NS, not significant.

patients and 55 healthy controls. In both groups, the most common genotypes were TNF -308 1/1 and TNF -238 G/G. The most frequent alleles were TNF1 and TNFG in both groups. The genotype distribution reveals an increase TNF -238 G/A genotype frequency in the SLE patients when compared to healthy controls ($P_c = 0.03$; OR = 4.77; 95% CI = 1.12-23.23). Also, we observed an increase in the TNFA -238 allele frequency in the patients group ($P_c = 0.02$; OR = 3.62; 95% CI = 1.17-11.92).

Complete analysis of HLA-DR alleles in patients and healthy controls are shown in Table 2. In this case, we observed a slight increase of DRB1*0101, *1501, and *1301 alleles frequency in the SLE group, however, none of these alleles remain significant after P -value correction.

Table 2 Gene frequencies (g.f.) of HLA-DRB1 alleles in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and healthy controls

DRB1	SLE (n = 51)		Healthy controls (n = 55)		Pc
	n	g.f.	n	g.f.	
0407	19	0.186	11	0.100	NS
0101	12	0.117	5	0.045	NS
1501	10	0.098	3	0.027	NS
0701	8	0.078	14	0.127	NS
1301	6	0.058	0	0.000	NS
0802	5	0.049	14	0.127	NS
0401	5	0.049	1	0.009	NS
0301	4	0.039	3	0.027	NS
0411	4	0.039	2	0.018	NS
1602	3	0.029	2	0.018	NS
1101	2	0.019	8	0.072	NS
1302	2	0.019	5	0.045	NS
0404	2	0.019	3	0.027	NS
1402	1	0.009	6	0.054	NS
1407	1	0.009	3	0.027	NS
1502	1	0.009	3	0.027	NS
0403	0	0.000	5	0.045	NS

g.f., gene frequency; NS, not significant.

Linkage disequilibrium between TNF promoter polymorphisms and HLA-DR alleles was noted: TNFA-DRB1*1401 ($D = 0.84$; $D' = 1.0$; $P = 0.015$); TNFA-DRB1*0301 ($D = 1.38$; $D' = 0.41$; $P = 0.042$); TNF2-DRB1*1106 ($D = 0.9$; $D' = 1.0$; $P = 0.0006$); TNF2-DRB1*1104 ($D = 0.83$; $D' = 0.45$; $P = 0.02$); TNF2-DRB1*1406 ($D = 0.83$; $D' = 0.45$; $P = 0.02$). On the other hand, linkage disequilibrium between TNF2-DRB1*0802 ($D = 1.4$; $D' = 0.61$; $P = 0.004$) and DRB1*1302 ($D = 0.81$; $D' = 0.3$; $P = 0.005$) and TNFA-DRB1*0404 ($D = 0.7$; $D' = 0.29$; $P = 0.03$) was observed in the control group.

Discussion

In this study we analyzed the TNF- α promoter region and DRB1 polymorphisms in SLE Mexican Mestizo patients. Several studies have reported an association of HLA alleles with SLE in different ethnic groups.¹³ However, the participation of TNF- α polymorphism in the susceptibility to the disease is unclear. In Caucasoid SLE patients, a significant association with TNF2 (gene frequency in SLE group = 0.26 vs gene frequency in controls = 0.16) has been found.¹³ These data differ from the TNF2 frequency in South African patients in which the disease is not associated with HLA-DR3.¹³ In our study, the frequency of TNF2 allele was not significantly increased in SLE patients when compared to healthy controls with similar ethnic backgrounds. Some studies have suggested a strong linkage disequilibrium between TNF2 and HLA-DR3 in the Caucasian population. Therefore the apparent increase of TNF2 in Caucasian SLE patients may be result of an HLA-DR3 increase.¹⁶ In contrast, other studies did not confirm this data and concludes that the TNF2 and HLA-DR3 are independent susceptibility factors for SLE.¹⁴ The polymorphism on position -308 has been associated with inducible levels of TNF- α ,^{11,12} but this association is not well documented and it contrasts with recently published data, which suggest that this polymorphism does not affect the TNF production.¹⁷

Our preliminary data shows an association between

TNFA-238 allele and SLE in the Mexican Mestizo population. However, linkage disequilibrium between TNFA-238 and DRB1*1401, DRB1*0301 alleles were found, suggesting that the association between TNFA-238 and SLE may be a result of this linkage disequilibrium between TNF and DRB alleles in the Mexican SLE patients. In controls, we found a different linkage disequilibrium pattern. These results would suggest that certain TNF-DRB combinations in patients could be important in conferring genetic susceptibility. The lack of association of the HLA-DR alleles in the present study may be a result of the small number of included patients and controls. Previous serological study of HLA alleles in a Mexican population showed an increased frequency of HLA-DR3 allele on SLE patients.¹⁸ A genetic association between TNF-238 G/A heterozygous genotype and RA was recently described in the Caucasian population. However, data provided does not support the evidence of a physiological role of the -238 polymorphism on the TNF- α production or gene transcription.¹⁹ On the other hand, recent studies provide further evidence that -308 A and -857 T alleles are associated to RA in patients with 'shared epitope' alleles.²⁰ Furthermore, there are a number of additional single nucleotide polymorphisms in the promoter region of TNF- α at positions -376, -857, -863, and -1031 that could be functional and prove useful for disease association studies.

In conclusion, the TNFA-238 allele frequency is increased in SLE Mexican Mestizo patients. This data suggests that the TNF-238 polymorphism could play an important role in the SLE susceptibility in the Mexican population. The small sample size in the present study could fail to confirm previous associations (-308 and HLA polymorphisms), therefore we considered that additional studies in a large number of patients may help to establish the true significance of these associations in Mexicans.

Materials and methods

Patients

Fifty-one unrelated Mexican Mestizo SLE patients who fulfilled the American College of Rheumatology (ACR) criteria, were studied. As controls 55 healthy Mexican Mestizo individuals, without a case history of connective tissue disorders, were included. We considered those individuals whose last two generations were born in Mexico to be Mexican Mestizo. This group is genetically well characterized and has shown a proportion of 56% Indian genes, 40% Caucasian genes and 4% black genes.²¹⁻²³

DNA extraction

Genomic DNA from whole blood containing EDTA was isolated by standard technique.²⁴

TNF-238 and TNF-308 polymorphisms

The TNF polymorphism was evaluated by the previously described amplification refractory mutation system (ARMS) and polymerase chain reaction (PCR).¹³ Briefly, the TNF-238 G amplification primers were sense: 5'-ACAGCCCTCCGGAATCG-3' and antisense: 5'-CCGGATCATGCTTTCAGTGC-3' (PCR product of 447 bp). The TNF-238 A primers were sense: 5'-

GCCCCTCCCAGTCTAGTCTATC-3' and antisense: 5'-CACATCCCCATCCTCCCTGGTCT-3' (PCR product of 209 bp). As a positive control a 608-bp constant DNA fragment was amplified with primers sense: 5'-GCCCCTCCCAGTCTAGTCTATC-3' and antisense: 5'-CCGGATCATGCTTTCAGTGC-3'. Hot start PCR condition were followed by five cycles of 94°, 67° and 72°C (60 s each), followed by 25 cycles of 94°, 62°, 72°C (60 s each). The TNF1-308 polymorphism (characterized by Guanine in -308 position) primers were sense: 5'-GGCAATAGCTTTTGAGGGCGGTGG-3' and antisense: 5'-AAGCGGTAGTGGGCCCTGCACCTT-3' (216 bp PCR product), and for the TNF2-308 allele we used sense: 5'-GCCCCCTCCCAGTCTAGTCTATC-3' and antisense: 5'-ACCCCTGGAGCGTGAAGCTGGCCCT-3' (139 bp PCR product). As internal control a constant PCR band of 354 bp was amplified with sense primer: 5'-GCCCCTCCCAGTCTAGTCTATC-3' and antisense primer: 5'-AAGCGGTAGTGGGCCCTGCACCTT-3'. Hot start cycling conditions were followed by 30 cycles of 94°, 62° and 72°C (60 s each). The PCR products were analyzed by phototyping in 2% agarose gels, stained with ethidium bromide.

HLA DR typing

Generic HLA-DR typing was performed by PCR-SSO reverse dot blot using the Amplicor Kit (Hoffmann La Roche, Basel, Switzerland). HLA-DRB1 alleles were detected by PCR and hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes (SSOP) as previously described.²⁵

Statistical analysis

The differences among proportions were evaluated by the Mantel-Haenszel, chi-square test that combined the 2 \times 2 contingency tables using the EPIINFO statistical program. If the number in any cell was <5, Fisher's exact test was used. The *P* values were corrected by the Bonferroni method multiplying the *P* value for the number of comparisons. Relative risks (RR) with 95% confidence interval (95% CI) were estimated as the odds ratios. Linkage disequilibrium (*D* = disequilibrium values; *D'* = normalized disequilibrium values, *D*/*D*_{max}) between TNF and HLA DR alleles was assessed using the ARLEQUIN statistical program.²⁶

References

- 1 Ahearn JM, Provost TT, Dorsch CA et al. Interrelationships of HLA-DR, MB and MT phenotypes, autoantibody expression and clinical features in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1031-1040.
- 2 Ruddle NH. Tumor necrosis factor (TNF- α) and lymphotoxin (TNF- β). *Curr Opin Immunol* 1992; 4: 327-332.
- 3 Spies T, Morton CC, Nedospasov SA et al. Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 8699-8704.
- 4 Jacob CO, Fronck Z, Lewis GD. Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor- α : relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1233-1237.
- 5 Jacob CO. Tumor necrosis factor- α in autoimmunity: pretty girl or old witch? *Immunol Today* 1992; 4: 122-125.
- 6 Jacob CO, Hwang F, Lewis GD, Stall AM. Tumor necrosis factor alpha in murine systemic lupus erythematosus disease models:

- implications for genetic predisposition and immune regulation. *Cytokine* 1991; 3: 551.
- 7 Vinasco J, Beraún Y, Nieto A *et al*. Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 1997; 49: 74-78.
 - 8 Brinkman BMN, Huizinga TWJ, Kurban SS *et al*. Tumor necrosis factor a gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of disease. *Br J Rheumatol* 1997; 36: 516-521.
 - 9 Fraile A, Nieto A, Beraún Y *et al*. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 1998; 51: 386-390.
 - 10 D'Alfonso S, Richardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNF alpha promoter region. *Immunogenetics* 1994; 39: 150-154.
 - 11 Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AIF, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3195-3199.
 - 12 Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism affects transcription. *Mol Immunol* 1997; 34: 391-399.
 - 13 Rudwaleit M, Tikly M, Kamashita M *et al*. Interethnic differences in the association of tumor necrosis factor promoter polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1996; 23: 1725-1728.
 - 14 Rood MJ, van Krugten MV, Zanelli E *et al*. TNF -308 A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 129-134.
 - 15 Wilson AG, Gordon C, di Giovine FS. A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha. *Eur J Immunol* 1994; 24: 191-195.
 - 16 Wilson AG, de Vries N, Pociot G *et al*. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor a promoter region is strongly associated with HLA A1, B8 and DR3 alleles. *J Exp Med* 1993; 177: 557-560.
 - 17 Braun J, Yin Z, Spiller I *et al*. Low secretion of tumor necrosis factor alpha, but no other Th1 or Th2 cytokines, by peripheral blood mononuclear cells correlates with chronicity in reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 2039-2049.
 - 18 Granados J, Vargas-Alarcón G, Andrade F *et al*. The role of HLA-DR alleles and complotypes through the ethnic barrier in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1996; 5: 184-189.
 - 19 Verweij CL. Tumor necrosis factor gene polymorphism as severity markers in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 120-126.
 - 20 Waldron-Lynch F, Adams C, Amos C *et al*. Tumor necrosis factor 5' promoter single nucleotide polymorphisms influence susceptibility to rheumatoid arthritis (RA) in immunogenetically defined multiplex RA families. *Genes Immun* 2001; 2: 82-87.
 - 21 Lisker R, Pérez-Briceño R, Granados J *et al*. Gene frequencies and admixture estimates in a Mexican City population. *Am J Physical Anthropol* 1986; 71: 203-207.
 - 22 Lisker R, Pérez-Briceño R, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in the State of Puebla, Mexico. *Am J Physical Anthropol* 1998; 76: 331-335.
 - 23 Lisker R, Ramirez E, Pérez-Briceño R *et al*. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican Urban Centers. *Hum Biology* 1990; 62: 791-801.
 - 24 Davis RW, Thomas M, Cameron J *et al*. Rapid DNA isolation for enzymatic and hybridization analysis. *Methods Enzymol* 1980; 65: 404-411.
 - 25 Gil-Carrasco F, Vargas-Alarcón G, Zúñiga-Ramos J *et al*. HLA-DRB and DQB loci in the genetic susceptibility to develop glaucoma in Mexicans. *Am J Ophthalmol* 1999; 128: 297-300.
 - 26 Lewontin RC. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 1988; 120: 849-852.