

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO 2

2es

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DISTRIBUCION HAPLOTIPICA DE LOS GENES
MHC CLASE II EN PACIENTES MEXICANOS CON
LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO (LEG).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
AREA INMUNOLOGIA

P R E S E N T A L A M. E N C.

VILMA CAROLINA BEKKER MENDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
"SALVADOR ZUBIRAN"

MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

265873



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.

El presente trabajo se realizo en el Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Dedico la realización de este trabajo a:

A Mis Padres, gracias por estar siempre ahí.

Al Dr. Julio Granados gracias por sus consejos académicos y como amigo.

Al Dr. Jorge Alcocer Varela por sus atinados consejos y apoyo, por permitirme formar parte de su grupo, gracias.

Al Dr. Donato Alarcón Segovia por permitirme formar parte de su muy distinguido grupo de trabajo.

Al Dr. Jorge Arellano por sus importantes consejos y aportaciones al trabajo y también como amigo.

INDICE GENERAL

TABLA DE CONTENIDO:

PUBLICACIONES ORIGINALES

I- RESUMEN	1
II- INTRODUCCION GENERAL	
• SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD	4
• MOLECULAS CLASE I	5
• MOLECULAS CLASE II	7
• OTROS GENES DEL SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD	9
III- MECANISMOS GENETICOS DE SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDAD	10
• HLA Y ENFERMEDAD	11
IV- LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO	
• HISTORIA	13
• GENETICA DEL LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO	16
V-HIPOTESIS	19
VI-OBJETIVOS	19
VII-MATERIALES Y METODOS	
• PACIENTES Y CONTROLES	20
• TIPIFICACION MOLECULAR DE LOS ALELOS DRB,DQA Y DQB	20
• EXTRACCION DE DNA	21
• AMPLIFICACION POR PCR	22
• MARCAJE NO ISOTOPICO DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS	23
• PREPARACION Y PRE-HIBRIDACION DE LA MEMBRANA DE NYLON	23
• HIBRIDACION	24
• REVELADO POR QUIMIOLUMINISCENCIA	25
• ANALISIS ESTADISTICO	26
VIII- RESULTADOS	28
IX -DISCUSION Y CONCLUSIONES	30
X-BIBLIOGRAFIA	33
XI- ANEXOS	
ANEXO A TABLAS	49
ANEXO B MEZCLA DE REACTIVOS	58
ANEXO C EQUIPO UTILIZADO	59
ANEXO D OTRAS PUBLICACIONES EN RELACION AL TEMA PRINCIPAL	

PUBLICACIONES ORIGINALES.

Del presente estudio se derivaron 4 trabajos de los cuales 3 de ellos han sido presentados en congresos nacionales y uno de ellos se publico en una revista internacional.

1. C. BEKKER MÉNDEZ, G. VARGAS-ALARCÓN, J. GRANADOS ARRIOLA, J. ALCOCER -VARELA Y D. ALARCÓN-SEGOVIA. Estudio molecular de los alelos clase II en pacientes Mexicanos con Lupus Eritematoso Generalizado. *Revista Mexicana de Reumatología* 1994; 9(1):80.
2. C. BEKKER , J. GRANADOS ARRIOLA, N.A. SALGADO, J. ALCOCER-VARELA, D. ALARCÓN -SEGOVIA. El locus DQA en Pacientes Mexicanos con Lupus Eritematoso Generalizado. *Revista Mexicana de Reumatología* 1996; 11(1):4.
3. C. BEKKER, J.K. YAMAMOTO-FURUSHO, G. VARGAS-ALARCON, N.A. SALGADO, J. ZUÑIGA, T.CUTIÑO, J. ALCOCER-VARELA, J. GRANADOS ARRIOLA, D. ALARCÓN-SEGOVIA. Los Loci HLA-DR,DQA1 Y DQB1 en Pacientes Mexicanos con Lupus Eritematoso Generalizado (LEG). *Revista Mexicana de Reumatología* 1997;12(1):30.
4. C. BEKKER-MENDEZ , JK. YAMAMOTO-FURUSHO, G. VARGAS-ALARCÓN, D. IZE-LUDLOW, J. ALCOCER-VARELA, J. GRANADOS ARRIOLA. Haplotype distribution of class II MHC genes in Mexican patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Scandinavian Journal of Rheumatology* 1998;27 (5):373-376.

I- RESUMEN

El Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) es una enfermedad multifactorial en la que el componente genético es fundamental. Estudios en Mexicanos y en otros grupos étnicos han mostrado asociación con los genes clase II del Sistema Principal de Histocompatibilidad (MHC). En Caucásicos el gen relevante se localiza en el locus HLA-DQ, de éste, el alelo DQA1*0501 tiene el riesgo relativo mayor para la susceptibilidad en ese grupo étnico. Dicho alelo tiene en Caucásicos desequilibrio genético con DR3 y con DQB1*0201.

En el presente estudio se analizaron las moléculas del MHC y se compararon con controles apareados por etnicidad para conocer si la asociación del alelo DQA1*0501 en la susceptibilidad al LEG descrito en individuos Caucásicos también ocurre en Mexicanos.

PACIENTES Y METODOS:

El estudio incluyó a 58 pacientes con LEG con al menos tres generaciones nacidas en México según información proporcionada por los familiares los cuales reunían los criterios del Colegio Americano de Reumatología. Como testigos se incluyeron 96 individuos sanos étnicamente pareados.

El DNA genómico se extrajo a partir de 20 ml de sangre periférica por varios métodos estandarizados. Las secuencias de oligonucleótidos de las especificidades DRB1, DQA1 y DQB1 fueron tomadas del XI Taller de Histocompatibilidad. Los genes del HLA clase II (DRB1, DQA1 y DQB1) se amplificaron por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando iniciadores genéricos. Los productos amplificados se caracterizaron por electroforesis en gel de agarosa. El DNA amplificado se aplicó sobre membranas de nylon. Los oligonucleótidos se marcaron con digoxigenina-11-2',3'-dideoxy-uridine-5'-trifosfato (DIG-11-ddUTP, Boehringer Mannheim GmbH, Germany) y se usaron para la detección por medio de un sustrato de fosfatasa alcalina. Los puntos se visualizaron después de una hora de exposición en una película Kodak X-AR5.

En el análisis estadístico se compararon las frecuencias de los alelos HLA clase II en pacientes con LEG y controles étnicamente pareados utilizando la prueba de χ^2 -cuadrada, p exacta de Fisher y tablas de contingencia de 2 X 2, donde se utilizó el programa de estadística EPISTAT. Los valores de p fueron corregidos por el método de Bonferroni multiplicando por el número de comparaciones.

RESULTADOS:

En el locus del HLA-DR, HLA-DR4 fue el alelo más frecuente en pacientes con LEG (39%), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa al compararse con los controles. Solamente el DR2 (29%) mostró estar aumentado de manera significativa ($p=0.03$).

Los fenotipos más comúnmente encontrados en pacientes se relacionan con los alelos DR4 y DR2. El DR4 fue heterogéneo, se encontró asociado frecuentemente con el DR1(10.3%), el DR13 (5.1%) y el DR2 (5.1%); el DR4 homocigoto también fue común (8.6%). Con respecto al HLA-DR2, el fenotipo más común fue el DR2/DR7 (6.8%).

Las frecuencias antigénicas de los alelos HLA-DQA1 y HLA-DQB1 en pacientes con LEG se listaron de acuerdo al orden de frecuencia en los pacientes; a manera de comparación, se incluyeron dos estudios recientes en individuos Caucásicos que reportaron participación directa de los loci HLA-DQA1 y HLA-DQB1 en la susceptibilidad a LEG. En el locus HLA-DQA1 las frecuencias antigénicas en los pacientes con LEG son semejantes a la de los controles, a diferencia de lo que ocurrió en el estudio Noruego donde el alelo DQA1*0501 apareció en el 84% de los pacientes con anti-Ro/La y solo en 25% de los controles ($p=0.00000, RR=15.8$), y con el estudio Inglés que reportó que el 63.6% de los pacientes tuvieron el alelo DQA1*0501 en

contraposición a solo 26% de los controles ($p < 0.0001$, $RR = 4.97$). El tercer alelo en orden de frecuencia en los pacientes Mexicanos fue el DQA1*0101, éste tuvo una frecuencia en pacientes con LEG parecida a la del grupo control. Esta frecuencia de dicho alelo estuvo disminuida en los pacientes Noruegos con anti-Ro/La ($p = 0.293$, $RR = 0.1$), dicha disminución también ocurrió en los pacientes Ingleses, lo que al compararse con los controles respectivos fue estadísticamente significativo ($p = 0.0012$). Los otros alelos del locus DQA1 se distribuyeron de manera semejante tanto en Mexicanos como en Noruegos e Ingleses.

Con respecto al locus DQB1, el alelo DQB1*0201 que se conoce está en desequilibrio genético con el DQA1*0501 tuvo frecuencias semejantes en los pacientes Mexicanos con LEG y en los controles. Sin embargo en los pacientes Noruegos positivos al autoanticuerpo anti-Ro/La, su frecuencia fue de 74%, que al compararse con los controles resultó aumentada de manera significativa ($p = 0.0010$, $RR = 5.5$). El siguiente alelo en orden de frecuencia fue DQB1*0301, éste tuvo frecuencias similares en todos los grupos de estudio. El cuarto alelo en orden de frecuencia DQB1*0501, tuvo frecuencias semejantes en los casos y controles en individuos Mexicanos y Noruegos, aunque en los pacientes Ingleses dicho alelo estuvo disminuido con respecto a los controles ($p < 0.0001$, $RR = 0.03$).

Los haplotipos más frecuentes en el grupo de pacientes Mexicanos con LEG, fueron: [HLA-DR4-DQA1*03-DQB1*0302] el cual resultó ser el más frecuente en la población normal Mexicana y en los pacientes. El segundo en orden de frecuencia fue el [HLA-DR1-DQA1*0101-DQB1*0501] con una frecuencia haplotípica de 0.224 mientras que en los controles fue de 0.661 ($p = 0.003$). El tercer haplotipo en los pacientes fue el [HLA-DR3-DQA1*0501-DQB1*0201] con una frecuencia haplotípica en pacientes de 0.207 la que al compararse con los controles (frecuencia haplotípica: 0.072) resultó estar aumentada de manera significativa ($p = 0.01$; $RR = 1.85$, IC 95%). Finalmente, el haplotipo: [HLA-DR8-DQA1*0401-DQB1*0402] en los pacientes se encontró disminuido de manera significativa al compararse con los controles ($p = 0.009$).

DISCUSION:

En el presente estudio se reportan las frecuencias antigénicas en 58 pacientes Mexicanos con LEG. Se encontró un incremento en el fenotipo del HLA-DR2 ($p = 0.03$). Este incremento no se mantuvo significativo al corregir la p probablemente debido al reducido tamaño de la muestra. Otros alelos que se encontraron aumentados en los pacientes fueron: DR3, DR6 y DR7, lo cual confirma lo encontrado en estudios previos obtenidos por serología en el mismo grupo.

Se observaron en los pacientes fenotipos relevantes como lo son DR1/DR1, DR2/DR7, DR2/DR3 así como homocigotos DR4/DR4, DR14/DR14, DR8/DR8 y DR3/DR3.

Con respecto a los alelos DQA y DQB este estudio no muestra una asociación con el alelo HLA-DQA1*0501 en pacientes con LEG como si ocurre en Caucásicos. Dicho alelo se ha relacionado con la producción de los autoanticuerpos anti-Ro/La. En los Mexicanos, la positividad para este autoanticuerpo es menor al 5% (142), lo que no puede explicarse por la frecuencia del alelo DQA1*0501 en los Mexicanos, ya que en este estudio en los pacientes la frecuencia del alelo fue de 43% y en los controles fue de 47%. Lo anterior sugiere que el mecanismo de producción de auto-anticuerpos en Mexicanos parece ser diferente a la de los Caucásicos.

Los resultados en el locus DQB1 reflejan un desequilibrio genético del alelo DQB1*0201 con el alelo DQA1*0501, pero al mismo tiempo muestran que el mencionado desequilibrio podría explicar en mayor detalle la susceptibilidad. Esta hipótesis se refuerza con los resultados de los haplotipos donde el alelo DQA1*0501 es parte de cuatro haplotipos diferentes en los pacientes, siendo el más frecuente de ellos [HLA-DR3-DQA1*0501-DQB1*0201] el cual resultó aumentado de manera significativa al compararse con los controles. Ello demuestra que el segmento de DNA contenido en el haplotipo es mejor marcador genético de la susceptibilidad

al LEG que el que confiere con el locus aislado como es el caso del HLA-DQA1, al menos en individuos mexicanos. Esto fue evidente en el presente estudio probablemente debido a que los desequilibrios en el grupo control son marcadamente diferentes a los de los pacientes.

Estos datos sugieren que la susceptibilidad al LEG esta fuertemente influida por el mestizaje, siendo en Mexicanos particularmente importantes los genes Caucásicos y Negros, también explica en parte el distinto perfil de autoanticuerpos en los Mexicanos con LEG.

II-GENERALIDADES: SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El elevado grado de diversidad alélica es la piedra angular genética que contiene las bases funcionales del MHC. Este polimorfismo alélico tiene importantes consecuencias funcionales que dictan las interacciones celulares que se requieren para la activación inmunológica en estados normales y autoinmunes. La detección de este polimorfismo genético es extremadamente importante para comprender la base de las contribuciones genéticas asociadas con la enfermedad. El Sistema Principal de Histocompatibilidad (MHC) está formado por un grupo de genes localizados en el brazo corto del cromosoma seis humano (6p21) [Ver Dibujo 1]. Este sistema abarca entre tres mil y cuatro mil pares de bases nucleotídicas (1-3).

El análisis del polimorfismo genético del MHC hasta hace poco era confuso, sin embargo con el advenimiento de tecnologías moleculares tales como la amplificación del DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la tipificación del HLA se efectúa de forma más precisa y directa (4). Históricamente la tipificación HLA se ha realizado por serología usando sueros de mujeres multiparas como reactivos para identificar aloantígenos en linfocitos de individuos no relacionados. Los sueros de multiparas ocasionalmente contienen aloanticuerpos resultantes de la sensibilización durante el embarazo o parto, los cuales reaccionan con aloepítopes similares presentes en individuos no relacionados (5). La nomenclatura a partir de esta tipificación serológica incluye las especificidades HLA A, B, C, DR y DQ. En general la relación entre la nomenclatura serológica HLA y los loci subsecuentemente definidos se ha mantenido, de modo que las especificidades de DR se refieren a los productos de la subregión de HLA-DR, las especificidades de DQ a los productos de la subregión DQ y las especificidades HLA-A,-B,-C a productos de los loci HLA A, B y C respectivamente (6).

Los estudios estructurales efectuados en los 80's mostraron que una de las principales dificultades en la tipificación serológica HLA, la constituye el hecho que algunas especificidades serológicas HLA en realidad representan múltiples moléculas diferentes. Uno de los ejemplos más claros ocurre con la especificidad HLA-DR4, la cual se reconoce como un

determinante serológico que representa a por lo menos 20 moléculas HLA diferentes codificadas por 20 alelos diferentes DRB1. Estas diferentes moléculas DR4 positivas comparten un epítipo serológico que reacciona con los aloantisueros DR4 lo que explica su tipificación serológica similar (7). No obstante, difiere en otros determinantes, algunos de los cuales pueden reconocerse inmunológicamente, por células T en cultivo mixto de linfocitos (MLC). El reconocimiento de moléculas HLA clase II por células T forman la base de otra taxonomía de tipificación HLA conocida como el sistema HLA-D, más discriminatoria que la tipificación serológica (8). El reconocimiento por células T, en ensayos de proliferación (MLC). Así, DR4 posee seis especificidades definidas celularmente reconocidas como Dw4, Dw10, Dw13, 14, 15. Por consiguiente, las especificidades celulares forman un sistema para subtipificar una especificidad serológica HLA-DR4. Sin embargo la tipificación celular es también incompleta y no puede detectar algunos polimorfismos alélicos importantes (4,9). Para una tipificación HLA más precisa muchos de los laboratorios de tipificación HLA utilizan actualmente tipificación molecular para la detección de alelos específicos (10). La tipificación molecular proporciona un método satisfactorio para detección genética específica que refleja con precisión el alto grado de polimorfismo alélico dentro del complejo HLA. La tipificación de oligonucleótidos se basa en el principio de que bajo condiciones adecuadas una sonda de oligonucleótidos sintética puede hibridar específicamente con una secuencia complementaria exacta de DNA del genoma, esto permite la detección de genes individuales de forma específica (11,12).

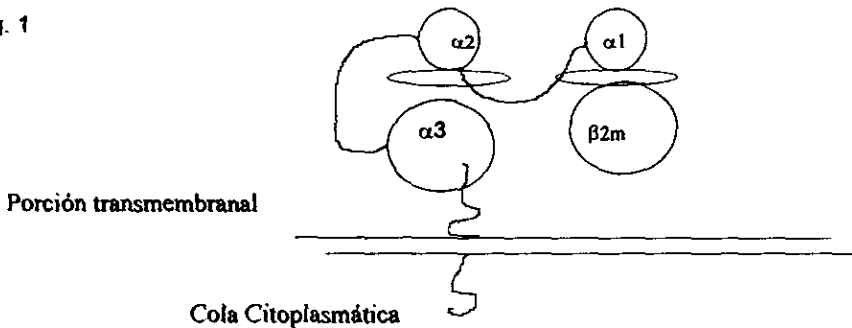
MOLECULAS CLASE I:

Los genes HLA clase I se localizan en un segmento de 2,000 kb de DNA en el extremo telomérico del Sistema Principal de Histocompatibilidad (MHC) humano (13,14). Existen 10 loci HLA clase I bien caracterizados, los loci del HLA-A, B, C codifican los principales antígenos de trasplante en humanos, se expresan en todas las células nucleadas y son mediadores de

eliminación alogénica y de restricción de linfocitos T efectores (15). Los antígenos clase I están constituidos por un par de cadenas polipeptídicas unidas no covalentemente; una cadena pesada alfa glicoproteica transmembranal de 45 Kilodaltons (Kd) y una cadena ligera beta (beta2-microglobulina) también glicoproteica de 12 Kd codificada fuera de la región del MHC en el cromosoma 15. La cadena alfa es polimórfica y codifica los antígenos HLA-A, B y C. Estas moléculas tienen dominios extracelulares, una región transmembranal y una cola citoplasmática corta. La cadena pesada alfa consta de tres dominios externos (alfa 1, 2 y 3). Los dominios alfa 1 y 2 conforman una estructura donde se encuentran los residuos polimórficos, la cual constituye el sitio de unión del antígeno (16,17) que será presentado por la molécula de HLA al receptor del linfocito T (ver Fig 1). Cada uno de los antígenos de clase I de HLA-A,-B,-C es altamente polimórfico en la población. Este polimorfismo se crea mediante un alto grado de variación alélica, en cada uno de los tres loci. Existen más de 35 alelos HLA-B conocidos en la población humana, un grado de polimorfismo algo menor se observa en los loci HLA-A y C. Cada uno de los genes de clase I codifica para un solo polipéptido de la cadena pesada HLA de clase I (18-19).

Molécula Clase I

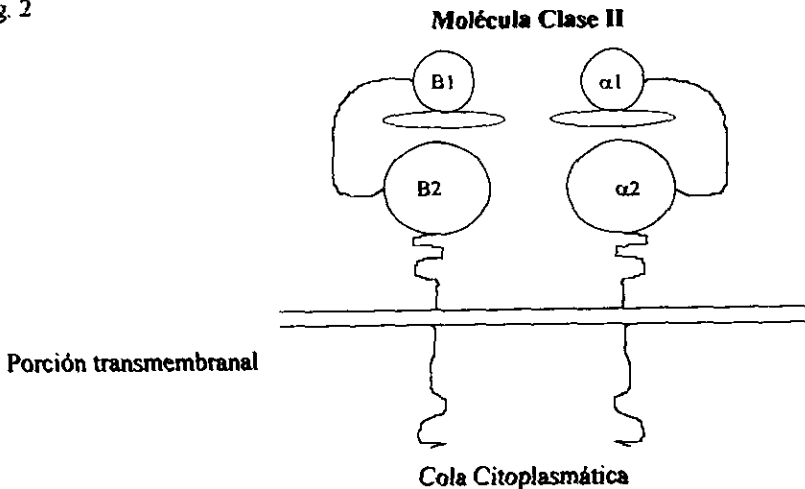
Fig. 1



MOLECULAS CLASE II:

Las moléculas de clase II son heterodímeros, expresados por linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, células epiteliales de ductos mamarios, túbulos renales y tracto digestivo (20). Estas moléculas están constituidas por dos cadenas glicoproteicas, unidas no covalentemente, una cadena pesada alfa de 33 Kd y una cadena ligera beta polimórfica de 28 Kd ambas codificada dentro del MHC (Fig 2).

Fig. 2



Las moléculas clase II tienen cuatro dominios externos: alfa 1 y 2, beta 1 y 2. Los dominios alfa 1 y beta 1 son polimórficos mientras que los dominios alfa 2 y beta 2, son constantes y homólogos a las inmunoglobulinas (21,22). Hasta hace poco se obtuvo la estructura tridimensional por cristalografía de rayos X de las moléculas de clase II y mostró una similitud con la estructura de las moléculas clase I (23-25).

Las moléculas Clase II tienen asociada a las cadenas alfa y beta una glicoproteína transmembranal de 31 Kd, conocida como cadena invariante o gamma. Esta cadena no es detectable con anticuerpos en la superficie celular, por lo que se piensa que se disocia del complejo entre el paso por el aparato de Golgi y el arribo a la membrana celular (26-28).

El sistema de HLA clase II contiene haplotipos individuales de hasta 23 diferentes loci de clase II conglomerados en tres subregiones principales denominadas HLA-DR, DQ, DP cada una de estas subregiones contiene por lo menos un locus funcional beta y un locus funcional alfa así como pseudogenes adicionales o genes de función desconocida (29,30). Los loci HLA DRA1 y DRB1 codifican los polipéptidos alfa y beta respectivamente los cuales forman una molécula madura de HLA DR de clase II. De forma similar, productos de los loci DQA1 y DQB1 forman la molécula DQ y los loci DPA1 Y DPB1 que codifican la molécula DP. Una segunda molécula expresada DR se codifica en la mayoría de los haplotipos mediante los loci DRA, DRB3 y DRB4 o DRB5. Por consiguiente, a pesar de la complejidad genética la mayoría de los haplotipos codifican solamente para cuatro moléculas distintas clase II (31).

Los loci HLA clase II son extremadamente polimórficos. Debido a que los genes de HLA están físicamente ligados entre sí, existe un alto grado de desequilibrio de unión entre los loci HLA, esto es, diferentes alelos en diferentes loci HLA no se recombinan al azar sino que existen en haplotipos que están relativamente fijos en la población. Por ende, la herencia de un alelo específico en un locus se acompaña frecuentemente de la herencia de un alelo específico en un locus cercano, por ejemplo: el alelo DRB1*0404 que codifica una de las cadenas DRB DR4 positivas de clase II se encuentra normalmente ligada a los alelos DQA1*0301 y DQB1*0302 en el locus DQ y frecuentemente está ligada al alelo HLAB*4001 en el locus HLA-B. Este fenómeno de ligamiento imparte ciertas restricciones sobre la diversidad general de los haplotipos de HLA que se encuentran comunmente en la población (32). Esto significa que cuando un marcador polimórfico de HLA se observa asociado con una enfermedad en particular, el gen de susceptibilidad real puede ser el marcador del HLA mismo, o ser un gen ligado y cercano al marcador o un gen a cierta distancia de este marcador pero en el mismo haplotipo (33).

Puesto que la mayoría de los individuos son heterocigotos, el fenotipo del HLA de un individuo está determinado por dos haplotipos HLA, es decir la mayoría de los individuos expresan seis

moléculas clase I y por lo menos 8 moléculas clase II. Además, la transcomplementación ofrece una fuente mayor de diversidad en los heterocigotos, ya que las moléculas HLA clase II son heterodímeros alfa y beta producidos por dos genes HLA; es posible que una cadena alfa codificada en un haplotipo pueda complementarse con una cadena beta codificada en el otro haplotipo, lo cual crea nuevos dímeros en el heterocigoto. Un individuo heterocigoto para los genes DQA1*0501 y DQB*0201 en un haplotipo y los genes DQA1*0301 y DQB1*0302 en el otro haplotipo expresa realmente cuatro y no dos diferentes heterodímeros DQ que resultan de la asociación en combinación de cada una de las cadenas alfa y beta. Sin embargo no todas las combinaciones alfa y beta en el complejo de clase II pueden formar estos dímeros transcomplementarios. De modo que el grado de diversidad adicional depende de los haplotipos específicos en cada individuo (34).

OTROS GENES DEL SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD:

Los 10 genes de clase I y los 23 genes de clase II mencionados representan solamente cerca de la mitad de los genes conocidos que se encuentran dentro de los 4 Mb del MHC humano. Diversos genes tienen importantes funciones inmunológicas que podrían estar involucrados en eventos patogénicos relacionados con enfermedades autoinmunes asociadas al HLA (35).

La región HLA clase III identifica a un conglomerado de genes entre los complejos de clases I y II, en la cual se localizan varios genes activos que incluyen a los genes para los componentes del complemento C2, C4 y BF (factor B), así como los genes estructurales para la 21-hidroxilasa A y B (21-OHA y 21-OHB) (36).

Otra parte interesante del MHC se encuentra en el complejo de clase II entre los conglomerados de DQ y DP. Por lo menos dos genes dentro de esta región codifican para polipéptidos implicados en el procesamiento de antígenos o en el transporte de péptidos (37-40). Líneas celulares diferentes para esta región carecen de la capacidad de expresar HLA clase I y posiblemente clase II que normalmente forman complejos con el antígeno.

III- MECANISMOS GENETICOS DE SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDAD:

La principal característica de los genes de HLA asociados con enfermedades es el polimorfismo estructural que identifica al alelo asociado con la enfermedad. Cuando un gen HLA clase I o clase II está implicado directamente con la susceptibilidad a enfermedad parece que un número limitado de polimorfismos de aminoácidos en residuos que contribuyen a la unión con el péptido y al reconocimiento por células T, son la clave determinante de la asociación con la enfermedad (41). La ocurrencia de enfermedades asociadas con ciertos alelos del MHC se conoce desde hace mucho tiempo, aunque poco se ha avanzado para determinar la razón de dicha asociación. Una de las posibles razones puede ser que la naturaleza selectiva de la unión del péptido al nicho de la molécula del MHC asegura que sólo ciertos alelos sean capaces de presentar péptidos patógenos (42). Se tiene evidencia de lo anterior, por ejemplo en la enfermedad Celiaca, en donde el antígeno (gliadina) se ha observado una fuerte asociación con los alelos HLA-DQA1*0501 y HLA-DQB1*0201 (43). El material aislado de biopsias de células T reactivas a Gliadina ha mostrado tener una fuerte asociación con HLA-DQA*0501 y HLA-DQB*0201 (44). El mecanismo puede ser más complejo donde la co-expresión de HLA-B8 y HLA-B*2702 evita la presentación a células T por células infectadas de Influenza las cuales llevan un péptido particular asociado con el antígeno HLA-B8. Esta reacción se debe a una competencia entre dos moléculas del MHC por el péptido. Lo anterior sugiere que algunas respuestas genéticas inmunes ligados a alelos del MHC podrían deberse a una competencia por el péptido por diferentes alelos MHC. Normalmente se asume que la asociación de la enfermedad está relacionada con la función unión-péptido de las moléculas del MHC, pero existen otras posibilidades. Mientras que la significancia funcional de estas alteraciones es desconocida, es tentador suponer que la expresión aberrante de los genes dentro de la región DQA está relacionada con la patogenia de la enfermedad (45,46). También se ha pensado que las expresiones diferenciales de las moléculas HLA-DR y DQ en las células presentadoras de antígeno (CPA) podrían influir el balance Th1/Th2 de las células T

de respuesta, y que los patrones de expresión de citocinas estuvieran relacionadas con la inducción o patogénesis de algunas enfermedades (47). La investigación en el área del MHC asociado con enfermedad se complica debido a los factores ambientales (positivo y negativo) en la etiología o patogénesis de la enfermedad. Sin embargo el tratar de entender la asociación de la enfermedad desde el nivel molecular es importante, ya que provee una importante herramienta para el entendimiento de los mecanismos celulares básicos que causan la enfermedad.

HLA Y ENFERMEDAD:

La asociación de polimorfismos específicos HLA con diversas enfermedades reumáticas está bien reconocida desde hace más de una década (48,49). Antes de 1980 la mayoría de los estudios de HLA y enfermedad se correlacionaban con la presencia de especificidades serológicas asociadas con polimorfismos HLA más frecuentes en pacientes que en controles. Estudios recientes han utilizado técnicas moleculares para identificar haplotipos específicos y en ciertos casos genes específicos como responsables de estas asociaciones (50).

La fuerza de la asociación genética se refleja en el término de riesgo relativo (RR), la cual es una razón estadística de momios que representa el riesgo de la enfermedad en un individuo que porta un marcador genético en particular, comparado con el riesgo de individuos en esa población que no tienen el marcador (51,52). Como es el caso de las enfermedades asociadas con HLA clase I: Espondilitis anquilosante, Síndrome de Reiter, Artritis Psoriática y enfermedad Inflamatoria Intestinal, HLA-B27 es hasta la fecha el único marcador HLA clase I claramente implicado en estas enfermedades reumáticas (53-55), probablemente reflejando la participación directa de HLA B27 en la patogénesis de Espondilitis y Artritis. Por el contrario varias enfermedades se asocian con diferentes moléculas HLA clase II, con diferentes moléculas por ejemplo: Artritis Reumatoide (AR) Adulta, AR Poliarticular Juvenil con DR4; Dermatomiositis Juvenil y Síndrome de Sjogren con DR3 y Lupus Eritematoso Generalizado

DR2, DR3; (AR) Pauciarticular Juvenil DR8, DR5, DP2.1. (56-58). Actualmente se acepta que varias de estas asociaciones con el HLA representan en realidad diferentes mecanismos genéticos que reflejan la participación de genes ligados al complejo de genes de clase II, en otros casos una combinación de más de un gen de clase II y en otros la función de un alelo específico o aún la función de una secuencia específica de aminoácidos dentro de la molécula HLA clase II. Ciertas formas de LEG pueden representar enfermedades asociadas con moléculas HLA clase II debido a la cercanía con genes vecinos no HLA. Tanto los haplotipos HLA-DR2 como DR3 están asociados con LEG en Caucásicos (59). El haplotipo HLA-DR3 predominante en Caucásicos tiene un estrecho ligamiento con otros genes MHC, notablemente HLA-A1, B8, Cw7 y C4A (60-63). Otro gen identificado es el gen estructural para el componente C4 como parte de haplotipos DR3. Es importante recalcar que los alelos nulos de C4A están aumentados significativamente en pacientes con LEG aún en haplotipos no DR3 y particularmente cuando el paciente es HLA-DR2+ (64,65). Esta relación puede indicar que la presencia de un alelo silencioso del C4A más que la expresión de cualquier gen clase II en particular es el principal elemento genético predisponente en estos pacientes. Un ejemplo diferente de la complejidad de interpretación de asociaciones del HLA con enfermedad se observa en padecimientos asociados con más de un gen o haplotipo HLA. Este parece ser el caso de pacientes con síndrome de Sjögren ó ciertas formas clínicas de LEG en los que se han encontrado positividad al autoanticuerpo anti-Ro(SS-A) (66,67). Los pacientes con este perfil de autoanticuerpos tienen una frecuencia elevada de heterocigocia para haplotipos DR2, DQw1 y DR3, DQw2 lo que sugiere cierta interacción entre dos distintos genes de susceptibilidad. Se ha reportado un fenómeno similar para Artritis Crónica Juvenil (ACJ) pauciarticular en donde la enfermedad se asocia con genes de locus DRB1 y también con genes del locus DPB1. Es interesante observar que en pacientes con alelos DP2.1 y un alelo de susceptibilidad DRB1, DR8, 5, 6 en posición cis o trans presentan un riesgo relativo mayor que el esperado según el efecto aditivo de estos genes (68).

IV- LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO (LEG):

HISTORIA:

El Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) es una enfermedad de origen desconocido que afecta diferentes sistemas del organismo y que se caracteriza por la presencia de múltiples autoanticuerpos los cuales mediante mecanismos inmunológicos provocan daño tisular (69). El término *lupus* deriva del latín y etimológicamente significa lobo, por alusión a la lesión cutánea que el *lupus* produce en la cara y que lo asemeja a las manchas que los lobos presentan en sus mejillas.

A pesar de los esfuerzos realizados por investigadores, no se ha podido formular ninguna teoría unificadora que explique la patogénesis del LEG ni tampoco algún agente etiológico. Sin embargo existe claramente, un componente genético en el LEG como se ha mostrado en las enfermedades manifestadas por humanos y modelos murinos. En humanos la base genética está en el grado de concordancia en gemelos homocigotos y en la relativa alta incidencia del LEG en los parientes de primer grado de pacientes con LEG (70). Finalmente las bases genéticas del LEG se confirman con la predisposición del LEG observada en individuos con defectos heredados de los genes del complemento, especialmente en aquellos de la vía clásica (71).

De acuerdo a los conceptos actuales de autoinmunidad, algunos de los problemas con la tolerancia defectuosa para antígenos propios, debe ser causada por blastomas de células T o B o ambas. Se sabe que mecanismos poderosos de la tolerancia central y periférica trabajan en un sistema inmune normal en ambos compartimentos células T y B (72,73). También se han demostrado defectos en la capacidad de establecer tolerancia-propia, lo cual ha sido demostrado en ratones autoinmunes para células B y T (74). Aunque estos defectos no se han definido en el LEG humano, se encontró en un estudio que el 60% de un pequeño grupo de

pacientes con LEG mostraban un incremento en los niveles de moléculas solubles FAS/APO, lo cual interfiere con apoptosis, que a la vez resulta en una tolerancia defectuosa (75).

Por mucho tiempo se ha debatido si el defecto básico del LEG es debido a una hiperactividad de células B, que desencadena una activación policlonal, lo cual resulta en una producción (tal vez al azar) de autoanticuerpos (76,77). Sin embargo, existe una fuerte evidencia que sugiere que la generación de autoanticuerpos específicos para LEG, primordialmente IgG, no se encuentra regulada por la activación policlonal sino por un proceso restringido por HLA dependiente de células T y la respuesta de células B mediadas por antígenos (102).

LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO :

El Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) es una enfermedad autoinmune inflamatoria de etiología desconocida que puede afectar cualquier órgano del cuerpo (78-81). El curso de la enfermedad es una serie de remisiones y exacerbaciones. La enfermedad se caracteriza por autoanticuerpos contra DNA y RNA y otros autoanticuerpos en contra del núcleo de la célula. Los complejos inmunes circulantes se observan con frecuencia y pueden depositarse en riñón, piel, cerebro, pulmones y otros tejidos causando inflamación y daño tisular. Lo cual provoca mecanismos de activación y fijación de el sistema del complemento (82). Las enfermedades de tejido conectivo, conocidas como "enfermedades de la colágena" son un grupo de enfermedades multisistémicas frecuentemente caracterizadas por cambios patológicos en vasos sanguíneos y tejido conectivo. No se sabe con certeza cual es el gen o genes relevantes del MHC, que incrementa la susceptibilidad al desarrollo del LEG (83). Los dos grupos de genes codificados dentro del MHC que han atraído el mayor interés, son los genes Clase II y los genes del complemento Clase III particularmente los que codifican C4A y C4B (los dos isotipos de C4) y C2 (84). Estudios iniciales mostraron una prevalencia elevada de HLA-DR2 y HLA-DR3 entre pacientes Caucásicos con LEG. Los estudios realizados muestran de forma clara el papel de un componente genético en el LEG. En humanos estas bases

genéticas están fundamentadas en la alta concordancia entre gemelos homocigotos (85) y en la relativa alta incidencia del LEG en los familiares en primer grado de pacientes con LEG. Los estudios realizados en HLA utilizando las técnicas de tipificación del DNA con sondas específicas han sido de gran importancia para la identificación de haplotipos asociados con las enfermedades autoinmunes y para la localización de alelos que confieren la enfermedad en ciertos grupos étnicos.

MANIFESTACIONES CLINICAS

El LEG es una enfermedad inflamatoria multisistémica de etiología desconocida con manifestaciones clínicas diversas cuyo curso es variable así como su pronóstico.

-Trastornos inmunológicos que provocan una producción excesiva de autoanticuerpos algunos de ellos causando daño citotóxico, mientras que otros participan en la formación de complejos inmunes resultando en deterioro inflamatorio de ciertos órganos.

Las manifestaciones clínicas pueden ser constitucionales o resultado de la inflamación en varios órganos incluyendo piel, mucosas, articulaciones, riñón, cerebro, membranas serosas, pulmones, corazón y ocasionalmente tracto digestivo.

-La participación de órganos vitales como son los riñones y el sistema nervioso central son responsables de una significativa morbilidad y mortalidad (80).

EPIDEMIOLOGIA:

El Lupus se presenta en todo el mundo, su prevalencia en USA es de 15 a 50 por cada 1,000,000 de habitantes, mientras que en la Gran Bretaña es de 12 por cada 1,000,000 de habitantes y en Suecia 42 por 100,000. Estas variaciones en la prevalencia de la enfermedad en diferentes áreas geográficas sugiere que la etnicidad influye de manera determinante(86). La incidencia de casos también varía, por ejemplo en Rochester es de 1.8/100,000/año, mientras que en San Francisco es de 7.6/100,000/año. En Escandinavia la incidencia es de

4.8/100,000/año. El LEG es frecuente en ciertos grupos étnicos, como por ejemplo los Latinoamericanos y los negros americanos (87,88). En un estudio reciente, realizado en pacientes Mestizos Mexicanos con LEG se encontró aumento significativo de las frecuencias de HLA-DR3 ($pC=0.03$, $RR=2.56$) y DR7 ($*pC=0.004$, $RR=3.08$) (89).

El LEG es claramente más frecuente en mujeres, particularmente en los años que corresponden a la edad reproductiva en una proporción de 9 a 1. Para el grupo que se encuentra entre las edades de 14-64, la incidencia de edad-específica y sexo-específico muestran una proporción 6 a 10 veces mayor de mujeres. Este efecto en la edad y sexo en los rangos de incidencia y prevalencia de LEG sugieren un papel importante de factores hormonales en la patogénesis del LEG.

En los Estados Unidos se ha observado que el LEG es tres veces más común en la población de Negros que en Blancos (90). Un estudio realizado en Hawái mostró que la prevalencia de LEG es más común en la población Oriental que en la de los Blancos (112,113). Sin embargo también se observó una alta frecuencia del LEG en Suecia donde la población es estrictamente Caucásica (91). Existe predisposición hereditaria al LEG observada en estudios en familias donde la prevalencia de la enfermedad entre los parientes de estos pacientes con LEG es mayor que la de la población general (92). Estudios del HLA han permitido tener un mejor análisis de la epidemiología genética del LEG de su forma de heredar y el número de genes que podrían contribuir en la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad.

GENETICA DEL LUPUS ERITEMATOSO GENERALIZADO:

En la tabla 1 (Ver Anexo A) se puede observar la asociación que existe entre el LEG y varios loci y alelos del MHC en diferentes países. El haplotipo B8-DR3 se encuentra asociado al LEG en Caucásicos: en Australia, Canadienses, Checoslovacos, Ingleses, Franceses, Alemanes, Húngaros, Italianos, Escandinavos y Suizos (93-102).

Los haplotipos DR2 y DR3 se han asociado al LEG en pacientes de Bulgaria, Rusia y USA (103-105). El LEG también se ha encontrado asociado al DR2 en Grecia, al DQ6 en Franco-Canadienses, al DR4 en Indúes y al haplotipo B18-DR3 en Españoles (106-109). Además se ha encontrado una fuerte asociación del haplotipo extendido (A1-B8-C4A0-DR3-DQw2) mayor que a cualquiera de los alelos aislados (93-100). El LEG en Afro-Americanos está asociado con DR2 y DR3 (110). Es importante mencionar que el LEG no se observa en Africa Central ni Oeste (111). El LEG en el Oriente se asocia con el DR2 y DR3 en China y con el DR2 en Japon, Korea y Singapur (112-114). El LEG se ha asociado también a deficiencia del complemento. La deficiencia heterocigota del componente del complemento C4A se ha observado con frecuencia en pacientes con LEG de México, Australia, entre Anglo-Canadienses, Inglaterra, Alemania y Escandinavos; y en algunos estudios realizados en China, Francia, Japon y USA (121, 123, 93, 94, 96, 98, 99, 112, 115, 91, 113, 105). Estos datos sugieren que la herencia del LEG es compleja. Esto se puede observar en los estudios realizados en gemelos, donde se sugiere que al menos cuatro genes se encuentran involucrados (116). A su vez los estudios realizados en modelos murinos para LEG tales como el modelo de ratones de Nueva Zelanda, sugiere que por lo menos ocho genes se encuentran involucrados (117). El determinar cuales genes causan la enfermedad es difícil, por lo que se requiere un criterio uniforme para el LEG. La clasificación del LEG fue realizada por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) (118); pero este criterio se basó en pacientes Caucásicos por lo que se debe tomar en cuenta que la frecuencia de las manifestaciones clínicas del LEG varían dependiendo del grupo étnico que se estudie. Debido a esto, se puede suponer que el lupus podría ser un grupo de síndromes relacionados con diferentes expresiones en los diferentes países/grupos/étnias con acervo genético diferente (119-123). Se le ha dado énfasis a la asociación entre los genes del MHC y LEG. Esta asociación se puede deber al desequilibrio de unión entre el gen del MHC y genes de susceptibilidad; Por ejemplo, las

proteínas del MHC influyen de alguna forma el tipo de respuesta negativo/positivo en la selección de Th1 vs. Th2; y/o en algunos alelos en particular del MHC los cuales tienen una capacidad y facilidad para presentar péptidos asociados a enfermedad a células T (100). También es importante mencionar que se ha observado que los individuos DR2 y DR3 tienden a tener una respuesta inmune cuantitativa y cualitativamente diferente al compararse con otros individuos con alelos DR diferentes. Como se muestra en la tabla 1 anexo A, existe una fuerte asociación con el haplotipo extendido del MHC A1-B8-SC01-DR3-DQw.

La fuerte asociación existente en los haplotipos más que con alelos de un locus en particular tiene varias implicaciones: se debe considerar la importancia biológica de varios componentes del haplotipo del MHC (incluyendo las respuestas inmunes de Th1 y Th2, HLA; TAP y LMP y antígenos de transporte y procesamiento; complemento e inflamación; HSP70 y proteína de choque que median inflamación; TNF e inflamación; y 21-hidroxilasa y metabolismo de esteroides) (124-126). En una enfermedad tan compleja como el LEG se debe tomar en cuenta que algunos genes no van a actuar solos y que puedan estar representando "susceptibilidad" que podrán ser efectivos si coexpresan con genes adicionales (85). También se debe tomar en cuenta que un gen puede ser susceptible al desarrollo de una enfermedad pero también ser altamente representativo de una población en general, lo cual dificulta el poder definir su asociación con el desarrollo de susceptibilidad.

V-HIPOTESIS:

Existen diferentes alelos codificados por MHC clase II cuyos alelos difieren en los pacientes con LEG al compararse con controles sanos.

VI-OBJETIVO:

1. Tipificar moléculas clase II (HLA-DR y DQ) del sistema principal de histocompatibilidad en 58 pacientes Mexicanos con LEG y su comparación con normales.
2. Tipificar todos estos marcadores en 96 controles étnicamente pareados.
3. Seleccionar los alelos del MHC clase II relevantes para la susceptibilidad genética al LEG en pacientes Mexicanos.

V-HIPOTESIS:

Existen diferentes alelos codificados por MHC clase II cuyos alelos difieren en los pacientes con LEG al compararse con controles sanos.

VI-OBJETIVO:

1. Tipificar moléculas clase II (HLA-DR y DQ) del sistema principal de histocompatibilidad en 58 pacientes Mexicanos con LEG y su comparación con normales.
2. Tipificar todos estos marcadores en 96 controles étnicamente pareados.
3. Seleccionar los alelos del MHC clase II relevantes para la susceptibilidad genética al LEG en pacientes Mexicanos.

VII -MATERIAL Y METODOS:

Pacientes:

El estudio incluye a 58 pacientes con LEG con al menos tres generaciones nacidas en México según información proporcionada por los familiares los cuales reunían los criterios del Colegio Americano de Reumatología para esta enfermedad (94).

Controles:

Como grupo control para el análisis molecular se incluyeron a 96 individuos no relacionados sin LEG u otra enfermedad autoinmune. El grupo control utilizado en este estudio incluyó solamente a mestizos mexicanos con tres generaciones nacidas en México.

Tipificación molecular de los alelos DRB,DQA y DQB:

La tipificación molecular de estos alelos se llevó a cabo en DNA extraído de sangre periférica y amplificado mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Luego el DNA amplificado se hibridó con oligonucleótidos específicos de alelo (OE) marcados con técnicas no isotópicas para la tipificación de cada uno de los alelos conocidos. Para este trabajo se marcaron 12 oligonucleótidos para DRB1, 16 oligonucleótidos para DQA1 y 15 para DQB1. Las secuencias fueron tomadas del XI taller de Histocompatibilidad llevado a cabo en Japón (ver tabla 2A y 2B Anexo A).

TECNICAS:**Extracción de DNA (127)**

1. 20 ml de sangre (EDTA) en un tubo Falcon de 50ml
2. Añadir 30ml de PBS, centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos
3. Tirar sobrenadante y el paquete agregarle 50 mililitros (ml) de solución de lisis (AKC), incubar por 30 minutos e inmediatamente centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos.
4. Descartar el sobrenadante y colocar PBS, mezclar centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
5. Descartar el sobrenadante y agregar AKC, mezclar y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
6. Descartar el sobrenadante y agregar PBS, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
7. Descartar el sobrenadante y agregar 3ml de amortiguador RCB, 300ul de SDS al 10% y 100µl de proteinasa K (10mg/ml). Incubar la mezcla durante toda la noche en baño maria a 65-70°C.
8. Saturar el fenol utilizando Tris-Base 0.5M pH=8.0 volumen a volumen.
9. Agregar a cada tubo 3ml de fenol saturado, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
10. Obtener fase acuosa y agregarle 3ml de fenol saturado, agitar y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
11. Separar la fase acuosa y agregarle 2ml de amortiguador de Tris-EDTA y 5ml de cloroformo, agitar y centrifugar como en el paso anterior.
12. Obtener la fase acuosa y agregar otros 5ml de cloroformo, agitar y centrifugar. El paso anterior se repite hasta que la fase acuosa quede cristalina.
13. Separar la fase acuosa y agregar NaCL 5M (a una concentración final de 0.5M en la solución).

14. Se agita el contenido y se agrega etanol absoluto en una proporción de 1:4 V/V.
15. El DNA precipitado se coloca en un tubo ependorf de 2.5ml.
16. El DNA obtenido se deja secar con N_2 .
17. Seco el DNA se procede a hidratarlo con agua destilada.

Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (128,129).

La amplificación de los genes se lleva a cabo en una mezcla que contiene todos los reactivos necesarios para amplificar la región específica que se desea obtener (mezcla de reactivos de PCR ver Anexo B.1).

Mezclar bien y agregar 2 gotas de aceite mineral. Previamente cada tubo tendrá 1 microlitro del DNA extraído de cada individuo y se mezclará con los reactivos antes mencionados para llevar a cabo la amplificación, lo ideal es que cada tubo tenga una mezcla total de 50ul. Los tubos son colocados en el termociclador, el cual está programado y estandarizado según las condiciones encontradas en el laboratorio y el tipo de recomendaciones dadas por las compañías donde se obtuvieron (ver tabla 3 Anexo A) los reactivos y la región específica que se desea amplificar.

Una vez terminados los 30 ciclos, se corren dichas muestras sobre un gel de agarosa al 1%. Donde se mezclan 5 μ l de cada muestra con 6 μ l de colorante naranja G. Esta mezcla se corre a 100 volts por 30 a 45 minutos incluyendo a un marcador de peso molecular de 1Kb.

Los iniciadores utilizados en el presente trabajo fueron específicos para cada región de interés como es el caso de DRB, DQA y DQB genéricos (ver tabla 4 Anexo A).

Lo amplificado se guarda a -20°C para luego ser transferidas a membranas de nylon. Posteriormente se hibridan con el oligonucleótido específico.

Marcaje no isotópico de los Oligonucleótidos (130):

Para el marcaje no isotópico de los oligonucleótidos específicos se utilizaron los siguientes reactivos (Mezcla de reactivos no isotópicos ver Anexo B.2):

El oligonucleótido es mezclado a una concentración de 95 picomoles, luego esta mezcla se incubaba a 37°C durante 30 minutos después es colocada en hielo, se le agrega a la mezcla 2 microlitros de una solución preparada con 1 microlitro de glicógeno y 200 microlitros de EDTA a 0.2M pH= 8.0

El oligo es precipitado con 2.5 microlitros de LiCl 4M y 85 microlitros de etanol absoluto pre-enfriado a -20°C, se mezcla bien y se somete dicha mezcla por unos 15-20 minutos a -70°C y luego por 2 horas o toda la noche a -20°C.

El siguiente paso consiste en centrifugar a 12000 g durante 20 minutos a 4°C, se elimina cuidadosamente el sobrenadante y se lava el paquete con 75µl de etanol al 70%.

Se repite el paso anterior de centrifugar a 12000 g durante 10 minutos a 4°C, se elimina el sobrenadante y se deja secar al vacío o al aire. Finalmente se agregan 100 microlitros de agua destilada y se puede dejar a -20°C hasta que se utilice en las hibridaciones.

Preparación y pre-hibridación de la membrana de nylon (131)

- 1- La membrana de nylon es cortada del tamaño deseado, en este caso 10X10 cm² y luego marcada con lápiz cuadros de 1 cm².
- 2- Una vez cortada la membrana de nylon ésta se sumerge en agua destilada por un minuto.
- 3- Luego es sumergida en una solución de SSPE 10X durante 15 min a 60C.
- 4- La membrana una vez seca está lista para que se le coloque el amplificado de DNA 1-3µl máximo por muestra.
- 5- Se deja secar a temperatura ambiente.
- 6- Luego se deja remojar la membrana por 10 minutos en solución de 10X SSPE por 10 minutos.

7- La membrana inmediatamente es transferida a una solución de NaOH al 0.4M por 5 minutos para desnaturalizar al DNA.

8- Finalmente la membrana se homea a 80°C durante 10 minutos y para fijar el DNA a la membrana se expone al transiluminador de luz UV por 3 minutos.

Hibridaciones (132):

Una vez lista la membrana que contiene las muestras del DNA amplificado de una región específica ésta se somete a una hibridación previa, con la solución de hibridación (0.1-0.2 ml/cm²). Esto se realiza con el objeto de neutralizar a la membrana antes de añadir el oligonucleótido específico.

1- Este proceso se lleva a cabo a 42°C por 1 hora en baño maría en recipientes de plástico con movimiento continuo.

2- Después de una hora se añade el oligonucleótido

previamente marcado con digoxigenina (2 a 4 picomoles de oligo por cada mililitro de solución de hibridación) y se deja en la solución de hibridación por dos horas sin que varíe la temperatura.

3- Las membranas son posteriormente lavadas 2 veces por 5 minutos con una solución de SSPE 2X y SDS 0.1% a temperatura ambiente con agitación. De esta solución se utilizan 100 mililitros por 100cm² de membrana (suficiente para que se cubra toda la membrana).

4- La solución de hibridación que contiene el oligonucleótido marcado se recupera y se guarda a -20°C para hibridar 4 veces más en un lapso de 6 meses.

5- Los siguientes lavados son realizados con solución TMAC 3M durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego 2 lavados de 15 minutos cada uno a 59°C.

6- Se elimina el exceso de TMAC y se colocan las membranas sobre papel filtro para eliminar el exceso de líquido.

Revelado por medio de quimioluminiscencia (133).

Los lavados e incubaciones para la detección del oligonucleótido específico sobre la membrana se llevan a cabo en recipientes de plástico a temperatura ambiente y con movimiento continuo.

- 1- La membrana es lavada en la solución de detección II durante 5 minutos.
- 2- Luego se incuba en solución de detección IV durante 30 minutos esta solución se puede conservar a -20°C y ser reutilizada varias veces.
- 3- Se vuelve a lavar la membrana con solución de detección II durante 15 minutos 2 veces.
- 4- Remojar la membrana en solución equilibrante V durante 5 minutos.
- 5- Incubar la membrana durante 5 minutos en solución de revelado IV conteniendo el sustrato de la fosfatasa alcalina (PPD) en cantidad de 0.1 mg de PPD/ml de solución 3 (dilución de 1:100).

El PPD se conserva en oscuridad a -4°C y puede reutilizarse varias veces. El exceso de PPD se elimina colocando la membrana en papel filtro sin dejar que se seque totalmente. Luego la membrana es colocada en un recipiente de plástico y se incuba en baño maría a 37°C durante 20 minutos. Finalmente la membrana está lista para ser expuesta a una película de rayos X a temperatura ambiente durante 1-3 horas. La detección quimioluminiscente se llevará a cabo sobre la película la cual después de un tiempo aproximado de entre 20 minutos a 1 hora. La película se somete a una solución de fijación y luego de revelado. De esta manera se podrá visualizar la luz emitida en forma de puntos negros.

Deshibridación de las membranas:

Una vez revelada la película, la membrana deberá ser lavada para quitar el oligonucleótido y poder reutilizar las membranas las cuales pueden resistir hasta 6 hibridaciones diferentes sin

que el DNA se pierda. Se recomienda por lo tanto ser cuidadoso en los lavados ya que cualquier exceso podría remover el DNA en las membranas. La membrana se incubó en una solución de NaOH 0.4M a 42°C durante 20 minutos con movimiento constante. Luego ésta es transferida a una solución de Tris-HCl 0.2M pH=8.0, SSPE 0.1X y SDS 0.1% a 42°C por 20 minutos. La membrana se deja secar en papel filtro y se verifica la ausencia absoluta del oligo, exponiendo la membrana a una película de rayos X para verificar ausencia de detección quimioluminiscente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO (134,135).

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de chi-cuadrada (χ^2). Dicha comparación entre dos grupos de estudio en función de dos características independientes se efectúa mediante tablas de contingencias 2 x 2, se utilizó el programa estadístico EPISTAT. Para poder establecer la probabilidad de que ambos grupos difieran uno del otro en forma significativa, y que la variación no haya sido solo debida al azar, la tabla de 2 x 2 se evalúa mediante la prueba de Chi cuadrada según la siguiente fórmula.

$$\chi^2 = \frac{(ad - bc)^2 N}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

Si el valor obtenido de la prueba X^2 implica un valor de "p" menor de 0.05, la hipótesis nula que dió lugar a la comparación se rechaza. Un valor de $p=0.05$ significa que en menos de 1 en 20 casos se cometen errores al rechazar la hipótesis nula.

El valor de "p" se obtiene al interpolar en tablas de distribución X^2 el valor numérico de X^2 en función de los grados de libertad de la prueba. Para todas las tablas de contingencia de 2×2 se considera un grado de libertad. Si las cifras esperadas en cualquiera de las casillas a,b,c,d fueran menores a 5, la prueba de X^2 deja de tener validez y se debe utilizar en este caso la prueba exacta de Fisher que nos da directamente el valor de "p" según la siguiente fórmula:

$$f = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{a! b! c! d! N!}$$

Los valores de p fueron corregidos por el método de Bonferroni, multiplicando por el número de comparaciones. Se calculó el riesgo relativo (RR) para cada antígeno estudiado siguiendo el método de Woolf (producto cruzado).

$$RR = \frac{a c}{b d}$$

VIII-RESULTADOS:

La tipificación genérica de DR clase II se muestra en las siguientes tablas:

La tabla 5 muestra la tipificación genérica de DR en 58 pacientes mexicanos con LEG. HLA-DR4 es el alelo más frecuente en los pacientes con LEG (39%), sin embargo no muestra diferencia significativa al compararse con los controles. Otros alelos comunes en el grupo de pacientes fueron: DR2 (29%), DR6 (24%), DR1 (22%), DR3 (19%) y DR7 (17%). Sólo DR2 se encontró incrementado al compararse con los controles ($p=0.03$).

La tabla 6 muestra los fenotipos más comunes en los pacientes. Más de la mitad de los pacientes tienen fenotipos relacionados con los alelos DR4 y DR2: HLA-DR4 aunque heterogéneo se encontró asociado con más frecuencia a DR1 (10.3%), DR13 (5.1%), DR2 (5.1%) y con DR4 (homocigoto) (8.6%); con respecto a DR2, el fenotipo más común fue DR2-DR7(6.8%). Los pacientes con LEG también fueron homocigotos para DR14/DR14, DR8/DR8 y DR3/DR3.

La tabla 7 muestra las frecuencias antigénicas de los alelos de HLA-DQA1 y HLA-DQB1 en pacientes mexicanos con LEG y controles. Los antígenos se encuentran listados de acuerdo al orden de frecuencia en los pacientes; a manera de comparación, se incluyeron dos estudios recientes en individuos caucásicos Británicos (84) y Noruegos (138). Estos estudios fueron seleccionados ya que reportaron la participación directa de los loci HLA-DQA1 y HLA-DQB1 en la susceptibilidad a LEG. Puede notarse que en el locus HLA-DQA1 las frecuencias antigénicas en los pacientes mexicanos son semejantes a las de los controles. Con respecto al segundo alelo DQA1*0501, desafortunadamente sólo cuatro pacientes mexicanos resultaron positivos para anti-Ro/La y solamente uno de ellos resultó ser DQA1*0501 positivo, lo cual hacía superflua su inclusión en la tabla 7.

El tercer alelo en orden de frecuencia en los pacientes mexicanos fue DQA1*0101, el cual mostró una frecuencia similar. Los otros alelos del locus DQA1 se distribuyeron de manera semejante.

Con respecto al locus DQB1, el alelo DQB1*0201 que se conoce está en desequilibrio genético con el DQA1*0501, nuestro estudio reveló frecuencias semejantes en pacientes mexicanos con LEG y en controles. El siguiente alelo en orden de frecuencia fue DQB1*0301, éste tuvo frecuencias similares en todos los grupos de estudio. El cuarto alelo en orden de frecuencia DQB1*0501, tuvo frecuencias semejantes en los casos y controles. Otro alelo distintivo fue el DQB1*0402, el cual en mexicanos tuvo igual frecuencia en casos y controles.

Nos interesa conocer si un desequilibrio genético fuera responsable de este efecto en el grupo de mexicanos, por lo que analizamos los haplotipos presentes entre pacientes y controles.

La tabla 8 muestra los haplotipos más frecuentes en el grupo de pacientes Mexicanos con LEG, existieron 10 haplotipos diferentes cuyas frecuencias fueron susceptibles de comparación. El primero de ellos: [HLA-DR4-DQA1*03-DQB1*0302] es el más frecuente en la población normal mexicana y como se ve también lo fue en los pacientes. El segundo en orden de frecuencia fue el [HLA-DR1-DQA1*0101-DQB1*0501] cuya frecuencia haplotípica fue de 0.224 mientras que en los controles fue de 0.661 ($p=0.003$). El tercer haplotipo en los pacientes fue el [HLA-DR3-DQA1*0501-DQB1*0201] cuya frecuencia haplotípica en los pacientes fue de 0.207 la que al compararse con los controles (frecuencia haplotípica: 0.072) resultó estar aumentada de manera significativa ($p=0.01$; $RR=1.85$, IC 95%).

Finalmente, el haplotipo: [HLA-DR8-DQA1*0401-DQB1*0402] en los pacientes se encontró disminuido de manera significativa al compararse con los controles ($p=0.009$). Todos los otros haplotipos se distribuyeron de manera semejante en los casos y controles.

IX-DISCUSSION

El presente trabajo muestra las frecuencias de los antígenos clase II del MHC en 58 pacientes Mexicanos con LEG. Por medio de tipificación genómica del DR se observó incremento moderado donde el fenotipo HLA-DR2 ($p=0.03$) el cual no había sido detectado en estudios anteriores donde se utilizaron técnicas serológicas; sin embargo este incremento no fue significativo cuando los valores de p fueron corregidos para el número de comparaciones.

Otros alelos de interés aumentados en los pacientes fueron el DR3, DR6 y DR7 el cual confirmó los resultados obtenidos por el mismo grupo étnico. (139).

De particular importancia fue el hallazgo de la baja frecuencia del HLA-DR4 en este grupo de pacientes ya que este antígeno es el alelo más común en la población normal mexicana (indígena y mestizo) (89), lo cual sugiere una relativa baja proporción de genes no autóctonos en pacientes Mexicanos con LEG; estos hallazgos requieren de un análisis más detallado comparando subtipos de DRB1 en pacientes y controles.

El subtipo de DRB1 más común en los pacientes con LEG fue el DRB1*0407, lo cual concuerda con lo reportado en un estudio realizado en una muestra de pacientes con LEG Mexico-Americanos (140).

Los datos presentados en la tabla 5 muestran la gran heterogeneidad de los alelos clase II del MHC en los pacientes con LEG; aunque sin restarle importancia a los fenotipos relevantes como DR4/DR1, DR2/DR7, DR2/DR3 así como a los homocigotos DR4/DR4, DR14/DR14, DR8/DR8 Y DR3/DR3.

Este estudio muestra que en individuos mexicanos no existe un papel directo del alelo HLA-DQA1*0501, como si ocurre en Caucásicos (138). El alelo HLA-DQA1*0501 se ha asociado con la producción de autoanticuerpos anti-Ro/La (141). Sin embargo en este estudio la frecuencia de DQA1*0501 fue de 43% en los pacientes y la positividad de anti-Ro/La fue muy baja como para ser incluida en la tabla 7 (estos hallazgos son similares a estudios previos realizados en el mismo grupo étnico (142). Lo anterior sugiere que el mecanismo de producción de auto-anticuerpos en mexicanos parece ser diferente a la de los Caucásicos.

En el estudio noruego el alelo DQA1*0501 apareció en el 84% de los pacientes con anti-Ro/La y sólo en 25% de los controles ($p=0.00000$, $RR=15.8$), esta asociación también fue evidente en el estudio inglés pues reportó que el 63.6% de los pacientes tuvieron el alelo DQA1*0501 en contraposición a solo 26% de los controles ($p=0.0001$, $RR=4.97$). El tercer alelo en orden de frecuencia en los pacientes mexicanos fue DQA1*0101, tuvo una frecuencia en pacientes parecida a la del grupo control. Sin embargo la frecuencia de dicho alelo estuvo marcadamente disminuida en los pacientes noruegos con anti-Ro/La ($p=0.293$, $RR=0.1$), dicha disminución también ocurrió en los pacientes ingleses, lo que al compararse con los controles respectivos fue estadísticamente significativo ($p=0.0012$). Los otros alelos del locus DQA1 se distribuyeron de manera semejante tanto en mexicanos como en noruegos.

Con respecto al locus DQB1, el alelo DQB1*0201 que se conoce está en desequilibrio genético con el DQA1*0501 tuvo frecuencias semejantes en los pacientes mexicanos con LEG, sin embargo en los pacientes noruegos positivos al autoanticuerpo anti-Ro/La, su frecuencia fue de 74% que al compararse con los controles resultó aumentada de manera significativa ($p=0.0010$, $RR=5.5$). Es interesante que dicho efecto no ocurrió en los pacientes ingleses. El siguiente alelo en orden de frecuencia fue DQB1*0301, éste tuvo frecuencias similares en todos los grupos de estudio. El cuarto alelo en orden de frecuencia DQB1*0501, tuvo frecuencias semejantes en los casos y controles en individuos mexicanos y noruegos, aunque en los pacientes ingleses dicho alelo estuvo nuevamente disminuido con respecto a los controles ($p=0.0001$, $RR=0.03$). Otro alelo distintivo fue el DQB1*0402, el cual en mexicanos tuvo igual frecuencia en casos y controles pero que en los pacientes noruegos dicho alelo no existió en ninguno de ellos mientras que si apareció en los controles. Puesto que en los dos estudios en Caucásicos (noruegos e ingleses) mostraron tanto alelos asociados con LEG como alelos protectores, esto no ocurrió en los mexicanos.

Los resultados de la tabla 7 en el locus DQB1 simplemente reflejan el desequilibrio genético del alelo DQB1*0201 con el alelo DQA1*0501, pero al mismo tiempo que el mencionado desequilibrio podría explicar en mayor detalle la susceptibilidad.

Nos interesó conocer si alguna forma de desequilibrio genético fuese la responsable de que no se exhiba dicho efecto para los cuales estudiamos los haplotipos presentes en los pacientes y los comparamos con los controles. Esta hipótesis se refuerza con los resultados de los haplotipos de la tabla 8. En ella se nota que el alelo DQA1*0501 es parte de cuatro haplotipos diferentes en los pacientes, el más frecuente de ellos [HLA-DR3-DQA1*0501-DQB1*0201] resultó incluso aumentado de manera significativa al compararse con los controles. Ello demuestra que el segmento de DNA contenido en el haplotipo es mejor marcador genético de la susceptibilidad al LEG que el que confiere con el locus aislado como es el caso del HLA-DQA1, al menos en individuos mexicanos. Pocos estudios se han realizado en pacientes mexicanos con LEG; en uno de ellos llevado a cabo en pacientes mexicanos-americanos de Texas (140), se encontró una significativa asociación con HLA-DR8. En nuestro estudio no se encontró dicha asociación, pero lo que se pudo observar es que este alelo juega un papel protector. Las diferencias observadas las interpretamos como el resultado de una estratificación genética significativa en ambos grupos control, ya que es difícil asegurar que el DR8 se encontró en una frecuencia baja en los mexicanos-americanos y en una frecuencia alta a los individuos mexicanos nacidos en la ciudad de México. En estudios previos donde se investigó la estructura poblacional normal en mexicanos aquí en el país (143) y por un grupo de la Universidad de Arizona en mexico-americanos (144), se observó que el DR8 es el segundo alelo más común en mexicanos después del DR4. Esto muestra la importancia de seleccionar "casos" y "controles" en estudios donde se investiga la asociación a enfermedades inclusive en un mismo grupo. Finalmente este estudio muestra que los genes de susceptibilidad para LEG se encuentran localizados en el MHC. Sin embargo la identificación de un gen relevante requiere del análisis de los haplotipos del MHC más que del estudio de genes aislados.

IX-BIBLIOGRAFIA:

- 1- DUNHAM I.,SARGENT CA,TROWSDALE J,CAMPBELL RD. Molecular mapping of the human Major histocompatibility Complex by pulsed-field gel electrophoresis. Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 1987; 84:7237-41.
- 2- CARROLL MC,KATZMAN P,ALICOT EM, et al. Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. Proc Natl Acad Sci USA. 1987;84:8535-9.
- 3- MONACO JJ. Structure and function of genes in the MHC class II region. Current opinion Immunol. 1993;5:17-20.
- 4- MARUYA E,SAJI H,YOKOYAMA S. PCR-LIS-SSCP (Low ionic strength single-stranded conformation polymorphism) a simple method for high-resolution allele typing of HLA-DRB1, DQB1, and DPB1. Genome Res. 1996;6(1):51-57.
- 5- KLIPPEL JH,DIEPPE AP. The Major Histocompatibility Complex. Section 1 (Nepom TG,Nepom B). 1994 published by Mosley Year Book Europe Limited.
- 6- BODMER JG,MARSH SGE,ALBERT E.D., BODMER WF, BONTROP RE,CHARRON D,DUPON B,ERLICH HA,FARICHET R,MASH B, MAYR WR,PARHAM P,SASAZUKI T,SCHREUDER GM,STROMINGER JL,SVEJGAARD A, TERASAKI Y.. Nomenclature for factors of the HLA system Human Immunology .1996; 53(1):98-128.
- 7- ZOSCHKE D,SEGALL M. Dw subtypes of DR4 in rheumatoid arthritis evidence: for a preferential association with Dw4. Human Immunol 1986;15:118-24.
- 8- HIRSHBERG H,ALBRECHSTEN D,SOLHEIM BG et al. Inhibition of human mixed lymphocyte culture stimulation by anti-HLA-D associated antisera; studies with primed responding cells. European J Immunol 1977;7:26-29.
- 9- McCLOSKEY DJ,BROWN J and NAVARRETE C. Serological typing HLA-A-B and C antigens, In M Hui and JL Bidwell (eds) (1993):Handbook of HLA typing techniques. Boc Raton FL: CRC press,pp-175-247.

- 10- ZETTERQUIST H, BENGTSSON M, BACKSTROM G, EGGLE-JANSSON Y, EKDAHL AM, GRUNNET N, GUSTAFSSON Y, KNUITSEN Y, KUHLE A, RYDBERG L, SPURKLAND A, STEFFENSEN R, STORGARDS M, SZOJMER E, SODERHOLM G, THURESSON B, TURESSON H, OLERUP O. Report from the HLA class II typing by PCR-SSP Multicenter Study. *Eur. J. Immunogenet.* 1997;24(3): 191-199.
- 11- MICKLSON E, SMITH A, MCKINNEY S, ANDERSON J, HANSEN JA. A comparative study of HLA-DRB1 typing by standard serology and hybridization of non-radioactive sequence-specific oligonucleotide probes to PCR-amplified DNA. *Tissue Antigens* 1993;41;86-93.
- 12- BUYSE Y, DECORTE R, BAENS M, CUPPENS H, SAMANA G, EMONDS MP, MARYNEN P, CASSIMAN JJ. Rapid DNA typing of class II HLA antigens using the polymerase chain reaction and reverse dot blot hybridization. *Tissue Antigens* 1993;41(1):1-13.
- 13- SHIMUZU Y, GERAGHTY DE, KOLLER BH, ORR HT, Demars R. Transfer and expression of three cloned human non-HLA-A,B,C class I major histocompatibility complex genes in mutant lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:227-31.
- 14- KOLLER BH, GERAGHTY DE, DeMARS et al. Chromosomal organization of the human major histocompatibility complex class I gene family. *J Exp Med* 1989;169:469-80.
- 15- STRACHAN T. Molecular genetics and polymorphism of class I HLA antigens. *Brit Med Bull* 1987;43:1-14.
- 16- GAKAMSKY DM, PECHT I. Does allosteric control assembly of MHC class I-encoded molecules?. *The Immunologist* 1997;5(2):47-51.
- 17- HWAI-CHEN G, JARDETZKY TS, GARRETT TP, LANE WS, STROMINGER JL, WILEY DC. Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature* 1992;360:364-369.
- 18- KLEIN J. Origin of the major histocompatibility complex the trans-species hypothesis. *Hum Immunol* 1987;19:155-62.

- 19- MATSAMURA M, FREMONT DH, PETERSON P, WILSON IA. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 1992;257:927-934.
- 20- PAUL W.N. *Fundamental Immunology*, 1993 3rd. Edition. Raven Press NY.
- 21- TROWSDALE J. Genetic polymorphism class II antigens. *Brit Med Bull* 1987;43:15-36.
- 22- HAMMER J, STURNIOLO T, SINIGAGUA F. HLA class II peptide binding specificity and autoimmunity. *Advances in Immunol.* 1997;66:67-100.
- 23- STERN LJ, BROWN JH, JARDETZKYTS, GORGA JC, URBAN RG, STROMINGER JL, WILLEY DC. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 1994;368:215-221.
- 24- REMONT DH, HENDRICKSON AW, MARRACK P, KAPPLER J. Structures of an MHC Class II molecules with covalently bound single peptides. *Science* 1996;272: 1001-1003.
- 25- BROWN JH, JARDETZKY T, GORGA JC, STERN LJ et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993;364:33-9.
- 26- WEENINK SM, GAUTAM AM. Antigen presentation by MHC class II molecules. *Immun. cell biology* 1997;75: 69-81.
- 27- BUSH R, MELLINS DE. Developing and shedding inhibitions: how MHC class II molecules reach maturity. *Current Opinion in Immunol.* 1996;8:51-58.
- 28- GOSH A, AMAYA M, MELLINS E, WILEY DC. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 1995;378:457-462.
- 29- RAGGOUSSIS J, MONACO A, MOCKRIDGE I, KENDALL E, CAMPBELL RD, TROWSDALE J. Cloning of the HLA class II region in yeast artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:3753-7.
- 30- HANSON IM, GORMAN P, LUI VCH, CHEA KSE, SOLOLON E, TROWSDALE J. The Human alpha 2(XI) collagen gene (COL11A2) maps to the centromeric border of the major histocompatibility complex on chromosome 6. *Genomics.* 1989;5:925-31.

- 31- SHOSKES DA, WOOD KJ. Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today* 1994;15(1): 32-38.
- 32- ANDERSEN LC, BEATY JS, NETTLES JW, SEYFRIED CE, NEPOM GT, NEPOM BS. Allelic polymorphism in transcriptional regulatory regions of HLA-DQB genes. *J. Exp. Med.* 1991;173:181-192.
- 33- BEGOVICH BA, McCLURE GR, SURAY VC, HELMUTH RC, FILDES N, BUGAWAN TL, ERLICH HA, KLITZ W. Polymorphism, recombination and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *J Immunol.* 1992; 148(1):249-258.
- 34- KWOK WW, THURTLIE P, NEPOM G. A genetically controlled pairing anomalies between HLA-DQA and HLA DQB chains. *J Immunol* 1989;143(11):3598-3601.
- 35- WHITE PC. Molecular genetics of the class III region of the HLA complex. In Dupont B ed. *Immunobiology of HLA. Immunogenetics and histocompatibility.* New York:Springer-Verlag;1989:62-9.
- 36- SPIES T, BLANCK G, BRESNAHAN M, SANDS J, STROMINGER JL. A new cluster of genes within the major histocompatibility complex. *Science.* 1989;243:214-17.
- 37- BENHAM A, TULP A and NEEFJES J. Synthesis and Assembly of MHC-peptide complexes. *Immunology Today* 1995;16(7): 359-362.
- 38- DEVERSON EV, GOW IR, COADWELL WJ, MONACO JJ, BUTCHER GW, HOWARD JC. MHC class II region encoding proteins related to multidrug resistance family of transmembrane transporters. *Nature* 1990;348:738-41.
- 39- TROWSDALE J, HANSON I, MOCKRIDGE I, BECK S, TOWNSEND A, KELLY S. Sequence encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature.* 1990;348:741-7.
- 40- VIDOVIC D, FALCIONI F, SIKLODI B, BELUNIS CJ, BOLIN DR, ITO K, NAGY ZA. Down regulation of class II major histocompatibility complex molecules on antigen presenting cells by antibody fragments. *Eur. J. Immunol.* 1995,25:3349-3355.

- 41- WUCHERPFENNING KW and STROMINGER JL. Selective binding of self peptides to disease-associated major histocompatibility complex (MHC) molecules. *Journal Exp Med.* 1995;181:1597-1601.
- 42- KWOK W.W, NEPOM GT and RAYMOND FC. HLA-DQ polymorphism are highly selective for peptide binding interactions. *J Immun* 1995;2468-76.
- 43- SOLID LM, MARKUSSEN G, EK J, GJERDE H, VARTDAL F and THORSBY E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med* 1989;169:345.
- 44- SALGAMEP, CONVIT J and BLOOM. Immunological suppression by human CD8+ T cells is receptor dependant and HLA-DQ restricted. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2598.
- 45- FISHER GF, PICKL-WF, FAE Y, ANEGY B, MITATA S, VOLC-PLATZER B. Association between chronic cutaneous lupus erythematosus and HLA class II alleles. *Hum. Immunol* 1994;41(4): 280-284.
- 46- NEPOM BS, NEPOM GT, COLEMAN M, KWOK WW. Critical contribution of beta chain residue 57 in peptide binding ability of both HLA-DR and DQ molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996;93(14) :7202-7206.
- 47- ALTMANN DM, SANSON D, MARSH SGE. What is the basis for HLA-DQ associations with autoimmune diseases?. *Immunol Today* 1991;12(8):267-270.
- 48- TIWARI J, TERASAKI P. HLA and Disease. New York:Spring-Verlag;1985.
- 49- FRONECK Z, TIMMERMAN LA, ALPER CA, LUIKA A, TIMMERMAN, CHESTER A, ALPER, BEVRA H, KALUNIAN HK, PETERLIN M and McDEVITT HO. Major Histocompatibility Complex genes and susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheum* 1990;33(10):1542-1553.
- 50- DAVIES EJ, HILLARBY MC, COOPER RG, HAY EM, GREEN JR, SHAH S, BERNSTEIN RM, HOLT P.JL, GRENNAN DM. HLA-DQ, DR and complement C4 variants in systemic lupus erythematosus. *Br. J. Rheumatol.* 1993;32(10):870-875.

- 51- DAWSON-SAUNDERS,B,TRAPP R. Basic and clinical bioestadistics. Norwalk, appleton and Lange, 1989;267.
- 52- HWANG SJ,BEATY TH,LIANG KY,CORESH J and KHOURY MJ. Minimum sample size estimation to detect gene-environment interaction in case-control designs. *Am J. Epidemiology*. 1994;140(11):1029-1037.
- 53- IVANY P. Immunogenetics of Spondyloarthritides. *Curr Opin Rheumatol* 1993; 5:436-445.
- 54- WEINREICH S, EULDERINK F, CAPKONA J et al. HLA-B-27 as relative risk factor in ankylosing entheropathy in transgenic mice. *Human Immunol* 1995;42:103-105.
- 55- KHAN MA. Ankylosing spondilitys and heterogeneity of HLA-B27. *Semin Arthritis Rheum*.1988;18:134-41.
- 56- NEPOM B,NEPOM GT,SCHALLER J,MICKELSON E,ANTONELLI P,HANSEN J. Characterization of specific HLA-DR4 associated histocompatibility molecules in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Clin Inv* 1984;74:287-91.
- 57- ARNETT FC,BIAS WB,REVEILLE JD. Genetic studies in Sjogren's syndrome and systemic lupus eruthematosus. *J Autoimmun*. 1989;2 (4):403-13.
- 58- NEPOM BS. The immunogenetics of juvenile rheumatoid arthritis. In: *Rheumatic Disease Clinics of North America*. Philadelphia:WB Saunders Co;1991;825-42.
- 59- LEWKONIA RM. The clinical genetics of lupus. *Lupus* 1992;1:55-62.
- 60- SKARSVAG S,HANSEN E,MOEN T & EGGEN BM. Distributions of HLA class II alleles in autoantibody subsets among Norweigian patients with systemic lupus erythematosus. *Scand. J immunol*. 1995; 42:564-571.
- 61- HARTUNG K, FONTANA M, KLOR M, KRIPPNER H, JORGENS K, LARG B, PITER HH, PICHLER WJ,SCHENDEL D,ROBIN-WINN M, DEICHER H. Association of class I,II and III MHC gene products with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 1989;9:137.

- 62- GOLDSTEIN R, SENGAR DPS. Comparative studies of the major histocompatibility complex in French Canadian and non-French Canadian Caucasians with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1993;36:1121-7.
- 63- COWLAND JB,ANDERSEN V,HALBERG P,MORLING N. DNA polymorphism of HLA classII genes in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1994;43(1):34-37.
- 64- PETRI M,WATSON R,WINKELSTEIN JA,McLEAN RH. Clinical expression of systemic lupus erythematosus in patients with C4A deficiency. *Medicine* 1993;72(4):236-244.
- 65- BRIGGS DC,SENALDI G,ISENBERG DA,WELSH KI, VERGAN D. Influence of C4 null alleles on C4 activation in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1991;58:251-254..
- 66- BEN-CHETRIT E. The molecular basis of the SSA-Ro antigens and the clinical significance of their autoantibodies. *British J. Rheum* 1993;32:396-402.
- 67- MEILOF JF, VELDHANEN CHA,SWAAK AJ,SMEENK RJ. Production of anti-Ro-SSA and anti-La-SSB autoantibodies is closely coordinated in systemic lupus erythemtosus and independant of anti-dsDNA production. *J. Autoimmunity* 1997;10:67
- 68- YAO Z, KIMURA A, HARTUNG K, HAAS PJ,VOLGGER A,BRÜNNLER G,BÖNISH J,ALBERT ED. Polymorphism of the DQA1 promoter region (QAP) and DRB1, QAP,DQA1,DQB1 haplotypes in systemic lupus erythematosus. SLE study Group members. *Immunogenetics* 1993;38:421-449
- 69- MEYER O. A critical appraisal of the classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheum* 1994;12 (suppl): S41-S44.
- 70- BARRON KS,SILVERMAN ED,GONZALES J and REVEILLE JD. Clinical serologic, and immunogenetic studies in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1993;36:348-354.
- 71- De JUAN D,MARTIN VILLA JM,GOMEZ REINO JJ,VICARIO JL,CORELI A,MARTINEZ LASO J,BENMAMMAR D,ARNAIZ VILLENA A. Differential contribution of C4 and HLA-DQ genes to systemic lupus erythematosus susceptibility. *Human Genet* 1993;91 (6):579-584.

- 72- CHEN C,NAGY Z,RADIC MZ,HARDY RR,HUSZAR D,CAMPER SA, WEIGHERT M. The site and stage of anti-DNA B cell deletion. *Nature* 1995; 373:252.
- 73- BASTEN A,BRINK R,PEAKE P,ADAMS E,CROSBIE J, HARTLEY S,GOODNOW CC. Self tolerance in the B cell repertoire. *Immunol. Rev.* 1991;122:5.
- 74- WHITMER KJ,ANSARI A,GERSHWIN ME. The pathogenesis of autoimmunity in New Zealand mice. *Seminars Clin Immunol* 1994;8:35-53.
- 75- CHENG J,ZHOU T,LIU C,SHAPIRO JP,BRAUER MJ, KIEFER MC,BARR PJ,MOUNTZ JD. Identification of a soluble form of the fas molecule that protects cells from fas-mediated apoptosis. *Science* 1994; 263:1759.
- 76- BOCKENSTEDT LK,GEE RJ and MAMULA MJ. Self-peptides in the initiation of lupus autoimmunity. *J Immunol* 1995; 154:94
- 77- VIDARD L, KEVACSOVICS-BANKOWSKI M, KRAEFT SK, CHEN LB, BENNACERRAF B, ROCK KL. Analysis of MHC class II presentations of particulate antigens by B lymphocytes. *J. Immunol.* 1996;156:2809-2818.
- 78- HESS EV, FARLEY Y. Etiology environmental relationships, epidemiology, and genetics of systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1995;7(5): 371-375.
- 79- KOTZIN BL. Systemic Lupus Erythematosus. *Cell* 1996;85:303-306.
- 80- ARIAS JA. Lupus Eritematoso Sistemico: manifestaciones clínicas y parametros inmunologicos. *Inflamación* 1996;7(1):11-21.
- 81- ARNETT FC. The genetic basis of Lupus Erythematosus. In: Dubois Lupus Erythematosus. Wallace, D.J., Hahn, B.H., Lea & Febiger. Philadelphia & London (1993):7:3516-3524.
- 82- BRIGGS DC, SENALDI G, ISENBERG DA, WELSH KI, VERGANI D. Influence of C4 null alleles on C4 activation in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1991;50:251-254.

- 83- BISHOP NA,WELCH TR,BEISHEL LS,CARSON D,DONELLY PA.DP polymorphism in HLA-A1,-B8,-DR3 extended haplotypes associated with membranoproliferative glomerulonephritis and systemic lupus erythematosus. *Pediatr Nephrol* 1993;7:243-246.
- 84- DAVIES EJ,HILLARBY MC,COOPER RG,HAY EM,GREEN JR,SHAH S,BERNSTEIN RM,HOLT PJ and GRENNAN DM. HLA-DQ,DR and complement C4 variants in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1993;32:870-875.
- 85- DEAPEN D,ESCALANTE A,WEINRIB L,HORWITZ D,BACHMAN B,ROY-BURMAN P,WALKER A and MACK TM. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1992;35:311-318.
- 86- SCHUR PH,MARCUS-BAGLEY D,AWDEH Z,YUNIS EJ,ALPER CA. The effect of ethnicity on major histocompatibility complex complement allotypes and extended haplotypes in patients with lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1990;33:985-92.
- 87- ALARCON-SEGOVIA D. & GRANADOS J. Immunogenetics of SLE in Mexicans. Proceedings of the 11 International conference on Systemic Lupus Erythematosus.Singapore 1989.
- 88- Mc CARTY D, MANZI S, MEDAGER T, RAMSEY-GOLDMAN R, LAPORTE R, KWOK C. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis & Rheum.* 1995;38(5): 1260-1270.
- 89- GRANADOS J,VARGAS-ALARCON G,ANDRADE F,MELIN-ALDANA H,ALCOCER-VARELA J, ALARCON-SEGOVIA D. The role of HLA-DR alleles and complotypes through the ethnic barrier in systemic lupus erythematosus in Mexicans. *Lupus* 1996;5:184-189.
- 93- WHITTINGHAM S. HLA and Gm genes in Systemic Lupus Erythematosus. *Rheum Dis Clin North America.* 1983 ;21:50-57.
- 94- BELL DA et al. HLA antigens in systemic lupus erythematosus: relationship to disease severity, age at onset and sex. *J Rheumatol* 1984;11:475'479.
- 95 - SHUR PH. Genetics of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1995;49:425-437.

- 96- BISHOP NA, WELCH TR, BEISHEL LS, CARSON D, DONNELLY PA. DP polymorphism in HLA-A1,B8,DR3 extended haplotype associated with membranoproliferative glomerulonephritis and systemic lupus erythematosus. *Pediatr. Nephrol.* 1993;7(3):243-246.
- 97- STOPPA-LYONNET D,GOUGEROT A,POIRIER JC,SCHMID M,BUSSON M,MARCELLI A. Familial studies of systemic lupus erythematosus. HLA markers and complotypes. *Pathol Biol* 1986;34(6):773-777.
- 98- HARTUNG K et al. MHC haplotypes and component C4 alleles in Systemic Lupus Erythematosus. Results of a multicenter study. *J Clin Invest* 1992;90:1346-1351.
- 99- STENSKY V,KOZMAN L,SZEGEDI G,FARID NR. Interplay of immunoglobulin G heavy chain markers (Gm) and HLA in predisposing to systemic lupus nephritis. *J Immunogenet* 1986;13(1):11-17.
- 100- SAVI M et al. HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies in Northern Italian systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum* 1988;31:1568-1570.
- 101- SKARSVAG S. Distribution of HLA class II alleles among Scandinavian patients with systemic lupus erythematosus (SLE): an increase risk of SLE among non [DRB1*03, DQA1*0501,DQB1*0201] class homozygotes? *Tissue Antigens* 1992;40: 128-133.
- 102- TSUCHIYA N, SHIOTA M, YAMAGUCHI A, ITO K. Elevated serum level of soluble HLA class I antigens in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996 ;39(5):792-796.
- 103- BENOVOLENSKAIA IL, IAKOVLEVA DB,FLOMEEVA OM. The importance of HLA antigens for the prognosis of the course and effect of treatment in systemic lupus erythematosus. *Vutr Boles* 1988;27:48'52.
- 104- BENOVOLENSKAIA LI,MIKOTKIN VA,IAKOVLEVA DB,FLOMEEVA OM. The HLA system and its contribution to the genetics of rheumatic diseases. *GenetiKa* 1986;22 (5);861-867.

- 105- REVEILLE JD ,ANDERON KL,SCHROENLOHER RE, ACTON RT, BARGER BO. Restriction Fragment length polymorphism analysis of HLA-DR,DQ,DP and C4 alleles in Caucasians with systemic lupus erythematosus. *J Rheum* 1991;18:14-18.
- 106- REVEILLE JA et al. HLA class II alleles and C4 null allele genes in Greeks with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1995;
- 107- 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.
- 108 MEHRA NK et al. Major histocompatibility complex genes and susceptibility to systemic lupus erythematosus in northern India. *Lupus* 1993;2:313-314.
- 109- CAMPS GARCIA MT et al. Class I and II HLA antigens in patients with systemic lupus erythematosus in the south of Spain. *Med Clin (Barc)* 1994;102:688-693.
- 110- TICKLY M, BURGIN S, MOHANLAL P, BELLINGAN A, GEORGE J. Autoantibodies in black South Africans with systemic lupus erythematosus: spectrum and clinical association. *Clinical Rheumatol* 1996;15(3):261-265.
- 111- CITERA G, WILSON WA. Ethnic and geographic perspectives in SLE. *Lupus* 1993;2:351-353.
- 112- DOHERTY DG, IRELAND R, DEMAINE AG, WANG F, VEERAPAN K, WELSH KI, VERGANI D. Major Histocompatibility complex genes and susceptibility to systemic lupus erythematosus in southern Chinese. *Arthritis Rheum* 1992;35(6):641-646.
- 113- YAMADA H et al. Lack of gene deletion for complement C4A deficiency in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol* 1990;17:1054-1057.
- 114- HANG GH et al. Association of complement C4 and HLA-DR alleles with systemic lupus erythematosus in Koreans. *J. Rheumatol* 1994;21:442-447.
- 115- HOWE HS et al. HLA DR antigens in Singapore Malay systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 1995;4:225.

- 116- REICHLIN M, HARLEY JB, LOCKSHIN MD. Serologic studies of monozygotic twins with SLE. *Arthritis Rheum* 1992;35:457.
- 117- DRAKE CG, ROZZO SJ, VYSE TJ, PALMER E, KOTZIN BL. Genetic contributions to lupus-like disease in (NZB xNZW) F1 mice. *Immunol Rev.* 1995;144:51-74.
- 118- TAN EM, COHEN AS, FRIES JF, MASI AT, McSHANE DJ, RUTH FIELD NF, SCHALLER JG, TALAL N, WINCHESTER RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatism* 1982; 25:1272-7.
- 119- WINCHESTER RJ. Genetic aspects. In: Shur Ph (ed). *Clinical Management of systemic lupus erythematosus*. Grune & Stratton: New York, 1983, pp 17-27.
- 120- WYSENBECK AJ, LEIBOVICI L, WEINBERGER A, GUEDJ D. Expression of systemic lupus erythematosus in various ethnic Jewish Israeli groups. *Ann Rheum Dis* 1993;52:268-271.
- 121- FERNANDEZ-VIÑA MA, GAO X, MORAES EM, MORAES JR, SALATIEL I, MILLER S, TSAI J, SUN Y, AN J, LAYRISSE Z, GAZIT E, BRAUTBAR C and STASTNY P. Alleles at four HLA class II loci determined by oligonucleotide hybridization and their associations in five ethnic groups. *Immunogenetics* 1991;32:299-312.
- 122- HART HH, GRIGOR RR, CAUGHEY DE. Ethnic difference in the prevalence of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1983;42:529-532.
- 123- JOHNSON AE, CAVALCANTI, GORDON C, NIVED O, PALMER RG, STURFELT G, VINER NJ and BACON PA. Cross-Sectional analysis of differences between patients with systemic lupus erythematosus in England, Brazil and Sweden. *Lupus* 1994;3:501-506.
- 124- BERG LJ, FRANK GD, DAVIS MM. The effects of MHC gene dosage and allelic variation on T cell receptor selection. *Cell* 1990;60:1043-1053.
- 125- OCAL L, RUSSELL K, BEYNON H, CRUICKSHANK K, LANCHBURY JS, WALPORT M, ISENBERG D, BRIGGS D. Genetic analysis of TAP2 in systemic lupus erythematosus patients from two ethnic groups. *Br. J. Rheumatol.* 1996;35(6):529-533.

- 126- WILSON AG,GORDON C,DI GIOVINE FS,VRIES N,PUTTE LBA,EMERY P,DUFF GW. A genetic association between systemic lupus erythematosus and tumor necrosis factor alpha. *Eur. J. Immunol.* 1994;24:191-195.
- 124- RUDWALEIT M, TICKLY M, GIBSON K, PILE I, WORDSWORTH P. HLA class II antigens associated with systemic lupus erythematosus in black South Africans. *Annals Rheum Diseases.* 1995;54 (8): 678-680.
- 125-SANCHEZ-GUERRERRO J, LEW RA,FOSEL AH, SCHUR PH. Utility of anti-Sm, anti-RNP,anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B (extractable nuclear antigens) detected by enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996;39 (6):1055-1061.
- 126- ARNETT FC, HAMILTON RG, REVEILLE JD, BIAS WB, HARLEY JB, REICHLIN M. Genetic studies of Ro (SS-A) and La (SS-B) autoantibodies in families with systemic lupus erythematosus and primary sjögren's syndrome. *Arthritis and Rheum* 1989; 32(4):413-419.
- 127- MILLER S.,SYKES D.,POLESKY H. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acid Res* 1988;16:1215.
- 128- INNIS A.M., GELFAND H.D.,SNISKY J.J. AND WHITE J.T.: PCR Protocols. (a guide to methods and applications). Ed. Academic Press INC. San Diego, California, Cap 32:261-271. 1990.
- 129- ERLICH H.A. ed: PCR Technology. (Principles and applications for DNA amplification). Ed. Stockton press 1989.
- 130- MICHELSON E, SMITH A, McKINNEY S, ANDERSEN G, HANSEN JA. A comparative study of HLA-DRB1 typing standard serology and hybridization of non-radioactive sequence-specific oligonucleotide probes to PCR amplified DNA. *Tissue Antigens* 1993;91(2):86-93.
- 131- SAMBROOK J.,FRISCH E.F.,MANIATIS T.:Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989).

- 132- HAMES B.D. & HIGGINS S.J. eds. *Nucleic acid hybridization, a practical approach* (1985) IRL Press Ltd., Oxford,U.K.
- 133- NEVVINY-STICKEL C, BETTINOTI M., HINZPETER M, MUHLEGGER K, SHMITZ G and ALBERT ED. Nonradioactive HLA Class II typing using polymerase chain reaction and Digoxigenin-112'-3'-dideoxy-Uridinetriphosphate-labeled oligonucleotide probes. *Human immunol* 1991;31:7-13.
- 134- MATHEWS DE, FAREWELL V. *Using and understanding medical statistics* New York: S. Karger 1985: 20-38.
- 135- SVEJGAARD A, RYDER LB. HLA and disease associations: detecting the strongest association. *Tissue Antigens*. 1994;43:18-27.
- 136- SKARSVAG S. The importance of C4A null genes in Norwegian patients with systemic lupus erythematosus. *Scand. J Immunol*. 1995;42:572-576.
- 137-DE LEO C, CASTELAN N, LOPEZ M, GONZALEZ N, WECKMANN AL,MELIN-ALDANA H, VARGAS-ALARCON G,BORDES J,ALARCON-SEGOVIA D, GRANADOS J,RAMIREZ E, LISKER R. Frequencies of Class I and Class II MHC antigens in Mexican Mestizos obtained from family studies. *Human Biology* (submitted for publication).
- 138-REVEILLE JD,MOULDS JM,ARNETT FC. Major Histocompatibility complex class II and C4 alleles in Mexican American with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* . 1995;45:91-97.
- 139- REVEILLE JD, MACLEOD MJ, WITTINGTON K,ARNETT FC. Specific amino acid residues in the second hypervariable region HLA-DQA1 and DQB1 chain genes promote the Ro/La (SS-B) autoantibody responses. *J immunol* 1991; 146: 3871-6.
- 140- BAKIMER R, KRAUSE Y, ABUD-SHAKRA M,TEPLIZKI-AMITAL H,ISENBERG DA,ALARCON-SEGOVIA D, VILLAREAL GM,SHOENFELD Y. The frequency of a common anti-DNA antibody idiotype (16/6) in different populations of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1991;18:1035-1037.

141- De LEO C, CASTELAN N, LOPEZ M, GONZALEZ N, WECKMAN AL, MELIN-ALDANA H. et. al. HLA class I and Class II alleles and haplotypes in Mexican mestizos established from serological typing of 50 families. *Human Biol* 1997; 69:809-18.

142- LONG J, WILLIAMS r, Mc AULEY J, MEDIS R, PARTEL R, TREGELLAS M. et.al. Genetic variation in Arizona Mexican Americans: estimation and interpretation of admixture proportions. *Am. J. Phys. Antropol* 1991; 84: 141-57.

XI- ANEXOS:

ANEXO A: TABLAS

TABLA 1. ASOCIACION DEL LEG CON ALELOS Y LOCI DEL MHC EN DIFERENTES PAISES.

PAISES	ALELOS	HAPLOTIPOS	REF
AUSTRALIA	B8,DR3 C4A	A1-B8-C4A0-DR3-DQw2	93
CANADIENSES	B8,DR3 C4A	A1-B8-C4A0-DR3-DQw2	94
CHECOLOVACOS	B8,DR3 C4A	A1-B8-C4A0-DR3-DQw2	95
INGLESES	B8,DR3 C4A	A1-B8-C4A0-DR3-DQw2	96,122
FRANCESES	B8,DR3 C4A	A1-B8-C4A0-DR3-DQw2	97
ALEMANES	B8,DR3 C4A	A1-B8-C4A0-DR3-DQw2	98
HUNGAROS	B8,DR3 C4A	A1-B8-C4A0-DR3-DQw2	99
ITALIANOS	B8,DR3 C4A	A1-B8-C4A0-DR3-DQw2	100
ESCANandinavos	B8,DR3 C4A	A1-B8-C4A0-DR3-DQw2	101
SUIZOS	B8,DR3 C4A	A1-B8-C4A0-DR3-DQw2	102,122
BULGAROS	DR2,DR3 C4A		103
RUSIA	DR2,DR3 C4A		104
USA	DR2,DR3 C4A		105
GRECIA	DR2		106
FRANCESES-CANADIENSES	DQ6		107
INDUES	DR4		108
ESPAÑOLES	B18-DR3		109
AFRO-AMERICANOS	DR2,DR3		110
CHINOS	DR2,DR3 C4A		111
JAPONESES	DR2 C4A		112
KOREANOS	DR2 C4A		113
SINGAPUR	DR2 C4A		114,115

MEXICANOS	DR3 C4A	87,89
-----------	---------	-------

TABLA 2°. SECUENCIA DE OLIGONUCLEOTIDOS PARA TIPIFICAR ALELOS DEL HLA-DRB		
OLIGONUCLEOTIDO	ESPECIFICIDAD	SECUENCIA
DRB 1001	DR1	TAAGTTTGAATGTCATTT
DRB1003	DR3+DRw11+DRw13+DRw14	
DRB 1004	DR4	GAGCAGGTTAAACATGAG
DRB 1005	DR5	AGAAATAACACTCACCCG
DRB 1006	DR7	TGGCAGGGTAAGTATAAG
DRB 1007	DR9	GAAGCAGGATAAGTTTGA
DRB 1008	DRw10	GAGGAGGTTAAGTTTGAG
DRB 1009	DR2 (DRB5)	CAGCAGGATAAGTATGAG
DRB 2801	DR1	CGGTTGCTGGAAAGATGC
DRB 2803	DR7	TGGAAAGACTCTTTCTATA
DRB 2804	DR9	GTATCTGCACAGAGGGCAT
DRB 2805	DR2(DRB5*0101)	GTTCTGCACAGAGACA

TABLA 2B SECUENCIA DE OLIGONUCLEOTIDOS PARA TIPIFICAR A LOS ALELOS DQA1 Y DQB1.

OLIGONUCLEOTIDO	ESPECIFICIDAD	SECUENCIA
DQA 2502	0103+0201+0601	TGGCCAGTTCACCCATGA
DQA 2503	0301	TGGGCAGTACAGCCATGA
DQA 3401	0101	GAGATGAGGAGTTCTACG
DQA 3402	0102+0103+0501	GAGATGCAGTTCTACG
DQA 3403	0401+0601	GAGACGAGCAGTTCTACG
DQA 4102	0103	ACCTGGAGAAGAAGGAGA
DQA 5501	0101+0102+0103	TCAGCAAATTTGGAGGTT
DQA 5502	0201	TCCACAGACTTAGATTTG
DQA 5503	0301	TCCGCAGATTTAGATTTG
DQA 5504	0401+0501+0601	TCAGACAATTTAGATTTG
DQA 6901	0101+0102+0103	ATGGCTGTGGCAAAACAC
DQA 6902	0201+0301	ATCGCTGTGCTAAAACAT
DQA 6903	0501	ATCGCTGTCCTAAAACAT
DQA 6904	0401+0501	ATCGCTGTCCTAAAACAT
DQA 7502	0201+0401+0601	CTTGAACATCCTGATTAAT
DQA 7504	0501	CTTGAACAGTCTGATTAA
DQB 3701	0501+0502+0503	AGGAGTACGTGCGCTTCG
DQB 3702	0601	AGCAGGACGTGCGCTTCG
DQB 4501	0301	GACGTGGACCTCTACCGG
DQB 4901	0501	GGTGTACCGGGCAGTGAC
DQB 5701	0501+0604+0604b	GCGGCCTGTTGCCGAGTA
DQB 5702	0502	GCGGCCTAGCGCCGAGTA

DQB 5703	0503+0601	GGCGGCCTGACGCCGACT
DQB 5704	0602+0603	GCGGCCTGATGCCGAGTA
DQB 5705	0201	GGCTGCCTGCCGCCGAGT
DQB 5706	0301+0303	GGCCGCCTGACGCCGAGT
DQB 5707	0302	GGCCGCCTGCCGCCGAGT
DQB 5708	0401+0402	GCGGCTTGACGCCGAGTA
DQB 7002	0601	GACCCGAGCGGAGTTGGA
DQB 7003	0602	GAGGGGACCCGGGCCGAG
DQB 7005	0201	GAAACGGGCCGGCGGTGGA

TABLA 3. CONDICIONES PARA AMPLIFICAR LAS REGIONES DRB,DQA Y DQB

Amplificación Genérica				
Gen Blanco		Condiciones		Tamaño del Producto
DRB		B		274 pares de base
DQA		A		229 pares de base
DQB		B		214 pares de base
Condiciones	Desnaturalización	Anillamiento	Extensión	MgCL ₂
A	92-94C 30 seg	58-55C 1min	70-72C 1-2min	1.5mM
B	94-96C 30 seg	58-55C 1min	70-72C 1-2min	1.5mM

TABLA 4. SECUENCIAS DE LOS INICIADORES UTILIZADOS EN LA AMPLIFICACIÓN DE DRB,DQA Y DQB

DRBAMP-A	5'-DRB GENERICO	CCCCACAGCACGTTTCTTG
DRBAMP-B Universal	3'-DRB GENERICO	CCGCTGCACTGTGAAGCTCT
DQAAMP-A	5'-DQA GENERICO	ATGGTGTAACCTGTACCAGT
DQAAMP-B	3'-DQA GENERICO	TTGGTAGCAGCGGTAGAGTTG
DQBAMP-A	5'-DQB GENERICO	CATGTGCTACTTCACCAACGG
DQBAMP-B	3'-DQB GENERICO	CTGGTAGTTGTGTCTGCACAC

*= Las secuencias fueron tomadas del XI Taller de Histocompatibilidad del protocolo de referencia. (Fukuoka, Japon).

Tabla 5. FRECUENCIA(%)DE ANTIGENOS DE LOS ALELOS HLA-DR EN PACIENTES MEXICANOS CON LEG.

	PACIENTES (n=58) n / %	CONTROLES (n=96) n / %	valor de p
DR			
DR4	23/39	57/57	0.017
DR2	17/29	15/15	0.03
DR6	14/24	14/14	NS
DR1	13/22	15/15	NS
DR3	11/19	13/13	NS
DR7	10/17	13/13	NS
DR8	7/15	19/19	NS
DR5	8/14	19/19	NS
DR9	1/2	4/4	NS
DR10	NE	4/4	NS

NS: No Significativo

NE: No Encontrado

TABLA 6. FENOTIPOS FRECUENTEMENTE ENCONTRADOS EN PACIENTES MEXICANOS CON LEG.

FENOTIPOS	PACIENTES		CONTROLS		valor de p
	n=58	f.a.	n=96	f.a.	
DR4/DR1	6	0.103	0	0.000	0.0013
/DR4	5	0.086	16	0.160	NS
/DR13	3	0.051	3	0.031	NS
/DR2	3	0.051	3	0.030	NS
/DR3	2	0.034	8	0.020	NS
DR2/DR7	4	0.068	3	0.030	NS
/DR3	3	0.051	1	0.010	NS
/DR8	2	0.034	2	0.020	NS
/DR1	2	0.034	1	0.010	NS
/DR11	2	0.034	3	0.030	NS

DR1-DQA1*0101-DQB1*0501

DR4-DQA1*03-DQB1*0302

NS:No Significativo

f.a.: frecuencia antigénica

Los homocigotos DR3,DR8 Y DR4 se encontraron presentes dos veces en pacientes Mexicanos con LEG.

TABLA 7. FRECUENCIAS ANTIGÉNICAS (%) DEL HLA-DQA1 Y DQB1 EN PACIENTES MEXICANOS CON LEG Y CONTROLES, COMPARADOS CON INDIVIDUOS NORUEGOS Y BRITANICOS.

	MEXICANOS		NORUEGOS			BRITANICOS			CTLS.
	PTS.	CTLS.	PTS. Ro/La	Sin Ro/La	CTLS.	PTS.	Ro/La	DNA	
	n=58 No. (%)	n=96 No. (%)	n=19 No. (%)	n=14 No. (%)	n=107 No. (%)	n=88 No. (%)	n=15 No. (%)	n=59 No. (%)	n=73 No. (%)
DQA1									
03	26(45)	32(33)	3(16)	4(29)	46(43)	ND			
*0501	25(43)	46(47)	16(84)	3(21)	27(25)	56(63.6)	14(93)	36(61)	19(26)
*0101	16(27)	28(29)	1(5)	6(43)	26(24)	9(10)	1(7)	7(12)	24(33)
*0102	12(20)	29(30)	7(37)	4(29)	50(47)	12(14)	8(14)	1(7)	1(7)
*0201	10(17)	15(15)	1(5)	2(14)	17(16)	ND			
*0401	7(12)	23(23)	0(0)	2(14)	9(8)	ND			
*0103	3(5)	10(10)	4(21)	3(21)	15(14)	ND			
*0601	0(0)	1(1)	0(0)	0(0)	1(1)	ND			
DQB1									
*0302	23(39)	44(45)	3(16)	4(29)	30(28)	ND			
*0201	20(34)	33(34)	14(74)	3(21)	36(34)	46(51)	34(57)	1(68)	32(43)
*0301	18(31)	42(43)	2(11)	2(14)	16(15)	ND			
*0501	16(27)	21(21)	6(43)	3(21)	27(25)	1(1)	1(2)	0(0)	21(28)
*0402	7(12)	19(19)	0(0)	2(14)	11(10)	ND			
*0602	7(12)	11(11)	3(16)	3(21)	33(31)	ND			
*0603	5(9)	8(8)	3(16)	4(29)	16(15)	11(12)	0(0)	5(8.3)	2(2.7)
*0604	3(5)	6(6)	5(26)	1(7)	22(21)	ND			
*0502	1(2)	6(6)	0(0)	0(0)	1(1)	ND			
*0503	0(0)	7(7)	1(5)	0(0)	3(3)	ND			
*0601	0(0)	2(2)	0(0)	0(0)	0(0)	ND			

*ND: No Disponible para comparación

TABLA 8. HAPLOTIPOS MAS FRECUENTES ENCONTRADOS EN PACIENTES MEXICANOS CON LEG.

DR-DQA-DQB	PTES n:	N=58 f.h.	CTLS n:	N=96 f.h	p value
1)DR4-03-0302	28	0.482	24	0.247	NS
2)DR1-0101-0501	13	0.224	6	0.061	0.0031
3)DR3-0501-0201	12	0.207	7	0.072	0.014
4)DR7-0201-0201	10	0.172	21	0.216	NS
5)DR11-0501-0301	9	0.155	12	0.123	NS
6)DR14-0501-0301	8	0.138	8	0.082	NS
7)DR8-0401-0402	7	0.120	29	0.299	0.009
8)DR2-0102-0602	6	0.103	9	0.093	NS
9)DR13-0102-0604	3	0.051	0	0.000	NS
10)DR2-0501-0501	4	0.068	0	0.000	NS

NS= No Significativo

f.h.: frecuencia de haplotipo

ANEXO B: MEZCLA DE REACTIVOS

B.1 Mezcla de Reactivos de PCR

DNA (5-10 microgramos).....	1.00µl
Buffer 10X.....	5.00µl
Cloruro de Magnesio (2mM).....	3.00µl
Mezcla de deoxinucleótidos a 2mM.....	5.00µl
Iniciador Universal (50pm).....	1.00µl
Iniciador Especifico (50pm).....	1.00µl
Agua ddH ₂ O.....	33.50µl
Taq Polimerasa 2U.....	5.00µl
Volumen Total	50µl

B.2 Mezcla de reactivos no isotópicos:

Cloruro de cobalto.....	4.00µl (25mM)
Buffer 5X.....	4.00µl
TdT	1.50µl
Dig-11-ddUTP.....	1.00 µl (1nmol/µl)
Oligonucleótido específico.....	9.50 µl (95pmoles)

ANEXO C: EQUIPO UTILIZADO EN EL PROYECTO

A. EQUIPO

1. Incubadora con movimiento continuo para las hibridaciones
2. Lugar aislado para las amplificaciones
3. Cámaras de electroforesis para correr geles de agarosa
4. Termociclador
5. Lámpara de rayos UV
6. Baños de agua
7. Cámara fotográfica
8. Máquina de revelado de películas
9. Autoclave
10. Refrigerador -20°C.
11. Minicentrífuga para tubos eppendorf.

B. Material:

1. Películas de rayos X KodaK X-Omat-AR
2. Tubos falcon de 50ml estériles
3. Pipetas Pasteur
4. Micropipetas Gilson de 20, 100, 200 y 1000µl.
5. Tubos Ependorf de 2.5ml y 0.5ml.
6. Recipiente de plástico de 10X10cm.
7. Películas KodaK 667 blanco y negro
8. Membranas de Nylon
9. Estuches de Rayos X

C. Reactivos

1. Agarosa al 1%
2. Amortiguador Tris-EDTA
3. Amortiguador Salino de Fosfatos
4. Amortiguador de Tris-Base 0.5M, pH 8.0
5. Alcohol etílico absoluto
6. Bromuro de etidio (10mg/ml)
7. Cloroformo
8. Conjugado de anti-digoxigenina-conjugado AP
9. Cloruro de Magnesio
10. CoCl 25mM
11. Deoxinucleótidos (ATP, CTP, GTP y TTP)
12. Digoxigenina (DIG-11-ddUTP) en concentración de 1nmol/ μ l
13. Dioxetano
14. Etanol al 100% y 70%
15. EDTA 0.2M pH=8.0
16. Fenol
17. Glicógeno
18. LiCl 4M
19. Luminógeno PPD
20. Iniciadores para las regiones DRB y DQB
21. NaOH 0.5M
22. NaCl 1.5M
23. Oligonucleótidos Específicos (OE) concentración de 30pmoles/ μ l
24. Proteinasa K (10mg/ml)
25. Solución de lisis (AKC) (NH₄CL 0.155M + K₂CO₃ 0.01M)

26. Solución RCB (NaCl 10mM + Tris-base 10mM + EDTA 25mM).
27. Solución de Duodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10%
28. Solución de Naranja G (10ml de Ficoll al 20%, 2gr de Tris- base).
29. Solución de Cloruro de tetrametil amonio 5M (TMAC)
30. Solución de Denhardt liofilizada: Ficol 400 al 2%.
31. Albúmina sérica bovina y PVP
32. Solución de hibridación, SSPE 6X, Solución Denhardt 5X, Lauril sarcosina de sodio al 0.1%, SDS al 0.02%
33. SSPE 30X: NaCl 4,5M, NaH₂PO₄ 0.3M, EDTA 30mM
34. Solución de detección quimioluminiscente I: Ac. Maleico 0.1M 35. NaCl 0.15M.
36. Solución de detección quimioluminiscente II: solución I más 0.3% de Tween 20.
37. Solución de detección quimioluminiscente III: Solución de bloqueo diluida 1:10 en solución I.
38. Solución de detección quimioluminiscente IV: Solución de bloqueo más el anticuerpo anti-digoxigenina (75mU/ml) en una dilución de 1:1000.
39. Solución Equilibrante V: Tris-Base 0.1M pH=9.5, NaCl 0.1M y MgCl₂ 50mM
40. Terminal transferasa (TdT)
41. Taq Polimerasa
42. Tris-base 0.5 M pH=7.4

Material Biológico:

20 ml de Sangre Periférica (SP) con 5ml EDTA

Haplotype Distribution of Class II MHC Genes in Mexican Patients with Systemic Lupus Erythematosus

G. Bekker-Mendez, J. K. Yamamoto-Furusho, G. Vargas-Alarcón, D. Iza-Ludlow, J. Alcocer-Varela, and J. Granados

Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

The objective of this project was to determine the association of the DQA1*0501 allele in the susceptibility to develop systemic lupus erythematosus (SLE) in Mexicans. Frequencies of generic MHC Class II genes (HLA-DR, DQA and DQB1) were determined by DNA typing in 58 Mexican mestizo SLE patients and 96 ethnically matched controls. Statistical analysis was performed by chi-square and Fisher's exact tests. The DQA1*0501 allele was found to be in linkage disequilibrium with HLA-DR3, DR11, and DR14. This explains the lack of association with the allele alone, and the evident strong association of SLE with the [HLA-DR3-DQA1*0501-DQB1*0201] and [HLA-DR1-DQA1*0101-DQB1*0501] haplotypes. It was also found a significant decrease (protection) of the [HLA-DR8-DQA1*0401-DQB1*0402] haplotype which is known to be a characteristic haplotype among the indigenous population of Mexico. These data shows that the susceptibility to SLE in Mexicans is more strongly influenced by the MHC haplotypes than by single alleles. The suggestion that these genes do not act alone but in combination, makes the identification of haplotypes mandatory.

Key words: class II MHC phenotypes, genetic susceptibility, susceptibility to SLE

Systemic lupus erythematosus is a clinically and genetically heterogeneous disease. The genes located within the MHC have strong influence on the susceptibility to develop it (1-3). This susceptibility varies between different ethnic groups and has been reviewed recently (4).

In Caucasians SLE has a strong association with HLA-DR3 and with the C4 deficiency (5). Whether the HLA-DR locus or the C4 locus is primarily involved is difficult to define because of the existing linkage disequilibrium between these two loci. More recently the HLA-DQA1*0501 allele has been found to have the strongest association in English patients with white European ancestry (6). In order to know if this also applies to a group with a relatively high prevalence of the disease we studied a group of Mexican mestizos. In the group we previously found an increase of HLA-DR3 and the C4 deletion (C4A or C4B) by using techniques at the protein level (7) causing the HLA-DQ locus polymorphism to be poorly defined.

Here, we studied with high resolution DNA techniques the class II MHC loci DQA and DQB1 and correlated them with generic DR typing.

Materials and methods

Patients and controls

A group of 58 Mexican mestizo patients meeting the American College of Rheumatology (ACR) criteria for SLE (8), and a group of 96 ethnically-matched

Mexican mestizo controls were included. The majority of patients were part of the previous study which showed the association with both HLA-DR3 and C4 null alleles. All the individuals from the group of controls were born in Mexico City as were their parents and grandparents.

DNA Typing for HLA class II alleles

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. Extraction was performed by standard methods (9). The sequences and specificity's of the DRB1, DQA1, and DQB1 oligonucleotide were synthesized by Bio-Synthesis (Lewisville, TX, USA) according to sequences from the Eleventh International Histocompatibility Workshop (10). HLA Class II genes (DRB1, DQA1, and DQB1) were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) (11-13). Two microliters of amplified DNA were loaded and electrophoresed in an agarose gel and then blotted onto nylon membranes positively charged (Boehringer, Mannheim, Germany) (14, 15). Hybridization was performed with 10 ml of hybridization solution containing 20 pmol of DIG-labeled probes, (Boehringer, Mannheim, Germany) (16). Dots were visualized after 1 hour exposure to Kodak-XAR5 film with intensifying screens. Since we performed family studies, HLA haplotypes were determined by segregation analysis.

Anti Ro/La autoantibodies were studied by an ELISA method as previously described (17).

Statistical analysis

Comparisons of HLA class II allele frequencies in patients with SLE and ethnically matched controls

Julio Granados. Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga #15, Talpan 14000, México D.F., México

Received 26 August 1997

Accepted 20 April 1998

Table I. Antigen frequencies of HLA-DQA1 and DQB1 in Mexican, Norwegian, and British SLE patients and controls.

HLA Locus	Mexican		Norwegian†			British‡		
	Patients	Controls	Patients		Controls	Patients		Controls
	n=58 n. (%)	n=96 n. (%)	Ro/La n=19 n. (%)	Without n=14 n. (%)	n=107 n. (%)	Ro/La n=15 n. (%)	Without n=88 n. (%)	n=73 n. (%)
DQA1								
*03	26 (45)	32 (33)	3 (16)	4 (29)	46 (43)	NA		
*0501	25 (43)	46 (47)	16 (84)	3 (21)	27 (25)	14 (93)	56 (63.6)	19 (26)
*0101	16 (27)	28 (29)	1 (5)	6 (43)	26 (24)	1 (7)	9 (10)	24 (33)
*0102	12 (20)	29 (30)	7 (37)	4 (29)	50 (47)	8 (14)	12 (14)	1 (7)
*0201	10 (17)	15 (15)	1 (5)	2 (14)	17 (16)	NA		
*0401	7 (12)	23 (23)	0 (0)	2 (14)	9 (8)	NA		
*0103	3 (5)	10 (10)	4 (21)	3 (21)	15 (14)	NA		
*0601	0 (0)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	NA		
DQB1								
*0302	23 (39)	44 (45)	3 (16)	4 (29)	30 (28)	NA		
*0201	20 (34)	33 (34)	14 (74)	3 (21)	36 (34)	34 (57)	46 (51)	32 (43)
*0301	18 (31)	42 (43)	2 (11)	2 (14)	16 (15)	NA		
*0501	16 (27)	21 (21)	6 (43)	3 (21)	27 (25)	1 (2)	1 (2)	21 (28)
*0402	7 (12)	19 (19)	0 (0)	2 (14)	11 (10)	NA		
*0602	7 (12)	11 (11)	3 (16)	3 (21)	33 (31)	NA		
*0603	5 (9)	8 (8)	3 (16)	4 (29)	16 (15)	0 (0)	11 (12)	2 (2.7)
*0604	3 (5)	6 (6)	5 (26)	1 (7)	22 (21)	NA		
*0502	1 (2)	6 (6)	0 (0)	0 (0)	1 (1)	NA		
*0503	0 (0)	7 (7)	1 (5)	0 (0)	3 (3)	NA		
*0601	0 (0)	2 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA		

NA: Not available for comparison

†Skarsvag S, Hansen KE, Moen T, Eggen BM. Distribution of HLA Class II alleles in autoantibody subsets among Norwegian patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 1995;42:564-71.

‡Davies EJ, Hillarby MC, Cooper RG, et al. HLA-DQ, DR and complement C4 variants in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1993;32:870-5.

were performed by chi-square analysis with Fisher's exact test of 2 X 2 tables using the EPIDAT statistical program. P values were corrected by the Bonferroni method multiplying it for the number of comparisons.

Results

Antigen frequencies of HLA-DQA1 and HLA-DQB1 alleles in Mexican SLE patients and controls are shown in table I. The frequencies are listed in ascending order according to the patients; as comparison, a British (18) and a Norwegian (19) study were also included. These studies were selected because they report direct participation of the HLA-DQA1 and HLA-DQB1 loci in the susceptibility to SLE.

It can be observed that the antigen frequencies of the HLA-DQA1 in Mexican patients are similar to the controls, compared to the Norwegians where the DQA1*0501 occurred in 84% of the patients with anti-Ro/La and 25% in controls ($p=0.00001$, $RR=15.8$). Unfortunately only four Mexican patients were positives for Anti Ro/La and only one of them was DQA1*0501 positive, making its

inclusion for comparison in table I superfluous. On the other hand in the British study, 63.6% of the patients showed the DQA1*0501 vs. 26% of the controls ($p=0.0001$, $RR=4.97$). In order of frequency the third allele in the Mexican patients was the DQA1*0101, which was equally distributed among patients and controls. Nevertheless, the frequencies among the Norwegian patients with anti-Ro/La were significantly decreased ($p=0.0293$, $RR=0.1$). This also occurred in the British patients, which was statistically significant when compared with controls. The remaining alleles at the DQA1 were equally distributed among Mexicans, Norwegians, and British individuals. At the DQB1 locus, the DQB1*0201 allele that it is known to be in linkage disequilibrium with, the DQA1*0501 showed similar frequencies among SLE patients and controls. However, in the Norwegian patients with anti-Ro/La antibodies, their frequency was 74% which was significantly increased compared to the controls ($p=0.0010$, $RR=5.5$); this difference was not observed in the British patients. According to the frequency the next allele was the DQB1*0301, this showed similar frequencies in all of the study groups.

Table II. More frequent HLA-DR-DQA-DQB haplotypes in the study population.

DR	DQA	DQB	SLE PTS. n=58 n	Frequency	Controls n=96 n	Frequency	pC† value
1) DR4	03	0302	28	0.482	24	0.247	0.031;
2) DR1	0101	0501	13	0.224	6	0.061	NS
3) DR3	0501	0201	12	0.207	7	0.072	NS
4) DR7	0201	0201	10	0.172	21	0.216	NS
5) DR11	0501	0301	9	0.155	12	0.123	NS
6) DR14	0501	0301	8	0.138	8	0.082	NS
7) DR8	0401	0402	7	0.120	29	0.299	0.09
8) DR2	0102	0602	6	0.103	9	0.093	NS
9) DR13	0102	0604	3	0.051	0	0.0	NS
10) DR2	0501	0501	4	0.068	0	0.0	NS

†pC: Corrected p value, ‡Odds Ratio: 2.8, Confidence Interval 95% = 1.3-5.9, NS: Not significant.

The fourth allele was the (DQB1*0501) allele which showed similar frequencies in Mexican and Norwegian cases and controls, in the British patients this allele was decreased among patients compared with the controls ($p < 0.0001$, $RR = 0.03$). The DQB1*0402 allele was found to be equally distributed among Mexican patients and controls. In the Norwegian patients this allele was not found, but was present in controls. Both studies made in Caucasians (Norwegians and British) showed association as well as protective alleles with SLE, that did not occur in the Mexican group.

We were interested in knowing if a genetic linkage disequilibrium was responsible for this effect in the Mexican group, therefore we analyzed the MHC haplotypes present among patients and controls. The frequencies of common haplotypes in Mexican SLE patients are shown in table II. Ten different haplotypes were found. The most frequent haplotype in the Mexican SLE patients and controls was [HLA-DR4-DQA1*03-DQB1*0302]. The second haplotype found in order of frequency was [HLA-DR1-DQA1*0101-DQB1*0501] with a frequency of 0.224 in patients and 0.061 ($p = 0.003$) in controls. The third haplotype found in patients was the [HLA-DR3-DQA1*0501-DQB1*0201] with a haplotype frequency of 0.207 in patients and a 0.072 haplotype frequency in controls, which was significantly increased ($p = 0.01$; $OR = 3.32$, $IC = 1.11 - 10.58$). The [HLA-DR8-DQA1*0401-DQB1*0402] haplotype found in patients was significantly decreased when compared to controls ($p = 0.009$). The remaining haplotypes were distributed equally among patients and controls.

Discussion

Here we report no direct association of the HLA-DQA*0501 allele with a group of Mexican SLE

patients, contrary to what has been reported in Caucasians (20). The HLA-DQA1*0501 allele has been associated with the production of autoantibodies anti-Ro/La (21), however in this study the frequency of DQA1*0501 was 43% in patients and yet positivity of anti Ro/La was too low for comparisons in table I (these findings are similar to other studies in the same ethnic group (22)). This would suggest that the mechanism of the autoantibody production differs from that of Caucasians. The allele frequencies in table I are in accordance with the haplotypes presented in table II, where the allele DQA1*0501 was found in four different haplotypes in patients. The most frequent haplotype was [DR3-DQA1*0501-DQB1*0201] where it was significantly increased as compared to controls. This shows that the DNA-segment in the haplotype is a better genetic marker for the susceptibility to SLE than the locus HLA-DQA by itself, at least in the Mexican individuals.

A few studies have been performed on Mexican SLE patients; in one of them, done on Mexican-Americans from Texas (23), significant association was found with HLA-DR8. Not only did we not prove this, but we found this allele to be protective. We interpret this differences as the result of significant genetic stratification in both control groups. Whether DR8 is decreased in the Mexican Americans or increased in individuals born in Mexico City is difficult to say but studies dealing with the normal population structure in Mexicans by our institution (24) and researchers from the University of Arizona (25) have shown that DR8 is the second most common DR allele in Mexicans only after DR4. This shows the relevance of selecting "cases" and "controls" in disease association studies even within the same ethnic group.

Finally, this study shows that susceptibility genes for SLE are located within the MHC; however,

identification of the relevant gene requires analysis of the MHC haplotypes rather than single genes.

Acknowledgements

This work was supported in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, Mexico, and the Programa Universitario en Investigación en Salud, Facultad de Medicina, UNAM, Mexico.

References

1. Reichlin M, Harley J, Lockshin M. Serologic studies of monozygotic twins with SLE. *Arthritis Rheum* 1992;35:457-64.
2. Reveille JD, Bias WB, Winkelstein JA, Provost TT, Dorsh CA, Arnett FC. Familial systemic lupus erythematosus: immunogenetic studies in eight families. *Medicine* 1983;62:21-35.
3. Arnett FC. The genetic basis of Lupus Erythematosus. In: Wallace DJ, Dubois Lupus Erythematosus. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993:13-36.
4. Schur PH. Genetics of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1994;4:425-37.
5. Fielder AHL, Walport MJ, Batchelor JR. Family study of the major Histocompatibility Complex in patients with systemic lupus erythematosus: Importance of null alleles of C4A and C4B in determining disease susceptibility. *Br Med J* 1983;286:425-8.
6. Davies EJ, Steers G, Ollier WER, et al. Relative contributions of HLA-DQA and complement C4A loci in determining susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1995;34:221-5.
7. 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 in Mexicans. *Lupus* 1996;5:184-9.
8. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7.
9. Miller S, Sykes D, Polesky H. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215-8.
10. Kumura A, Sasasuki T. Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA-DNA typing technique. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasasuki T, eds. *HLA 1991* Vol 1. Oxford: Oxford University Press, 1992:397-419.
11. Mullis KB, Fallona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-50.
12. Erlich HA, ed. *PCR technology (Principles and applications for DNA amplification)*. New York: Stockton Press, 1985.
13. Innis AM, Gelfand HD, Snisky JJ, White JT. *PCR protocols (a guide to methods and applications)* San Diego: Academic Press Inc, 1990.
14. Hames BD, Higgins SJ, eds. *Nucleic acid hybridization: a practical approach*. Oxford, IRL Press Ltd, 1985.
15. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
16. Nevny-Stickel C, Bettinotti D, Hinzpeter M, Muhlegger K, Schmitz G, Albert ED. Non radioactive HLA class II typing using Polymerase Chain Reaction and Digoxigenin-11-2,3'-dideoxy-uridinetriphosphate-labeled oligonucleotide probes. *Hum Immunol* 1991;31:7-13.
17. Isenberg DA, Shoenfeld Y, Madaio MP, Rauch J, Reichlin M, Stollar BD, et al. Anti-DNA antibody idiotypes in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1984;2:417-22.
18. Davies EJ, Hillarby MC, Cooper RG, et al. HLA-DQ, DR and complement C4 variants in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1993;32:870-5.
19. Skarsvag S, Hansen KE, Moen T, Eggen BM. Distribution of HLA Class II alleles in autoantibody subsets among Norwegian patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 1995;42:564-71.
20. Ben-Chetrit E. The molecular basis of the SSA/Ro antigens and the clinical significance of their autoantibodies. *Br J Rheumatol* 1993;32:396-402.
21. Reveille JD, Macleod MJ, Wittington K, Arnett FC. Specific amino acid residues in the second hypervariable region HLA-DQA1 and DQB1 chain genes promote the Ro₁ La (SS-B) autoantibody responses. *J Immunol* 1991;146:3871-6.
22. Bakimer R, Krause I, Abud-Shakra M, Teplizki-Arnatal H, Isenberg DA, Alarcón-Segovia D, et al. The frequency of a common anti-DNA antibody idotype (16/6) in different populations of patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1991;18:1035-7.
23. Reveille JD, Moulds J, Arnett F. Major histocompatibility complex class II and C4 alleles in Mexican Americans with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1995;45:91-7.
24. De Leo C, Castelan N, Lopez M, Gonzalez N, Weckmann AL, Melin-Aldana H, et al. HLA class I and class II alleles and haplotypes in Mexican mestizos established from serological typing of 50 families. *Hum Biol* 1997;69:809-13.
25. Long J, Williams R, McAuley J, Medis R, Partel R, Tregallas M, et al. Genetic variation in Arizona Mexican Americans: estimation and interpretation of admixture proportions. *Am J Phys Anthropol* 1991;84:141-57.

ANEXO D
PUBLICACIONES EN RELACION AL TEMA PRINCIPAL

PROCEEDING
EDITOR

Sequence-specific oligonucleotide typing in Shona patients with rheumatoid arthritis and healthy controls from Zimbabwe

S. Cutbush, I. C. Chikanza, P. A. Biro, C. Bekker, M. Stein, S. Lutalo, J. M. Garcia-Pacheco, D. S. McCloskey, J. S. Lanchbury, J. A. Sachs.
Sequence-specific oligonucleotide typing in Shona patients with rheumatoid arthritis and healthy controls from Zimbabwe.
Tissue Antigens 1993; 41: 169-172. © Munksgaard, 1993

Abstract: Seventy-two patients with rheumatoid arthritis (RA) and 82 controls have been typed with the XI Histocompatibility Workshop DRB1 and DQB1 sequence-specific oligonucleotide probes. The increase of DRB1*04 corresponds to an increase of the serologically defined DR4, previously found in a small group of Zimbabwean RA patients and we now show that this increase is due to the subtype DRB1*0405 in association with DQB1*0302. In addition there is a clearcut increase of DRB1*1001 equivalent to the serologically defined DR10. There was no increase amongst RA patients of DRB1*0102 which was the predominant DR1 sub-type amongst controls. In the course of our investigation, we observed a DRB1*04 variant which corresponds to DRB1*0412, newly defined in the XIth Histocompatibility Workshop.

S. Cutbush¹, I. C. Chikanza²,
P. A. Biro¹, C. Bekker¹, M. Stein¹,
S. Lutalo², J. M. Garcia-Pacheco¹,
D. S. McCloskey¹, J. S. Lanchbury²
and J. A. Sachs¹

¹Dept. of Immunology, The London Hospital Medical College, London, ²Rheumatology Unit, Division of Medicine, UMDS Guys Hospital, London, U.K., ³Department of Pharmacology, Medical School, Harare, Zimbabwe

Key words: RA - SSOs - Shona

Received 27 August, revised, accepted for publication 14 December 1992

Introduction

The association of RA with HLA DR4 is now well-established in most population groups whereas its association with DR1 and DR10 is more variable. By the use of HLA-Dw cellular typing, RFLP analysis and oligonucleotide typing with sequence-specific probes in Caucasoid populations it has been established that the DRB1*0401, *0404 and *0405 subtypes are RA susceptibility alleles whereas DRB1*0402 and *0403 are not (1, 2, 3, 4). Several reports on Black RA patients from Southern Africa have indicated that the serologically defined DR4 alone is increased. In the Zulu population of Natal (5), DR4 is present in 44% of RA patients compared to 10% controls. In small samples from two other ethnic groups, the Sotho from the Transvaal (6) and the Xhosa from the Cape (7), DR4 was also increased: 56% vs 9% and 38% vs 13% respectively. The Shona populate an area of Southern Africa made up of the central and northern parts of Zimbabwe. In a preliminary study (8), a low frequency of DR4 was found in

the controls similar to that in the other three ethnic groups. In none of these was DR1 and/or DR10 significantly increased.

One function of HLA Class II molecules is to present antigen to T-cell receptors by means of peptides bound in the groove formed by the DRA, and DRB chains. According to the shared epitope hypothesis, polymorphism of amino acid residues 70, 71 and 86 of the 3rd hypervariable region determines susceptibility or resistance to RA (9, 4). Thus in DRB1*0402 which does not appear to confer susceptibility to RA, aspartic acid and glutamic acid substitute for the neutral glutamine and basic lysine found a positions 70/71 of the DRB1*0401 which confers susceptibility to RA. Little is known about the association of the DRB1*01 subtypes with RA susceptibility.

Recently, in the XI International Histocompatibility Workshop sequence-specific oligonucleotides were used to determine DRB1 polymorphisms as well as inter alia the DRB1*01 and DRB1*04 subtypes in different ethnic populations. In this study we present the distribution of the

DRB1 and DQB1 polymorphisms as well as the DRB1*01 and DRB1*04 subtypes in a substantial group of RA Shona patients from Zimbabwe and compare them with a healthy control group (which formed part of the XI Histocompatibility Workshop).

Materials and Methods

Seventy-two Zimbabwean Shona patients with classical or definite RA and 82 Shona controls were studied. Blood samples from the patients anticoagulated with EDTA were shipped to the UK in dry ice whereas lymphocytes were a source of DNA from controls. The method of DNA extraction and sequence-specific oligotyping were similar to those applied to the Workshop and have been described in detail (10).

Statistics

The presence or absence of a particular polymorphism in each individual was counted. Comparisons were tested by 2 x 2 Contingency Tables and where appropriate Yates correction was applied. The p values were not corrected for the number of comparisons since associations were consistent with those found previously in other populations.

Results

DRB1 distribution in RA patients and controls

The frequencies of the DRB1 polymorphisms using the DRB1 generic primers and probes are given in Table 1. DRB1*04 and DRB1*1001 were significantly increased in the RA patient compared to controls (29% vs 4% $p < 0.001$; 19% vs 2% $p < 0.002$) while DRB1*01 was not (16% in RA patients vs 7% in controls). No patients or control had both DRE1*04 and DRB1*1001 so that 48% of the patients had one or the other, compared to 7% of controls ($p < 0.001$). No DRB1 allele was significantly decreased in the RA group. The subtypes of DRB1*01 and DRB1*04 were determined using appropriate primers and probes of the XIth Histocompatibility Workshop.

DRB1*01 subtypes

Of the 14 DRB1*01 controls, 9 were DRB1*0102 and 5 could not be tested. Of the 12 DRB1*01 patients with RA, 7 were DRB1*0102, 2 were *0101, 1 was *0103 and 2 could not be tested. The 7 DRB1*01 individuals were not subtyped as their DNA failed to amplify with the primers in the PCR.

Table 1.
Distribution of DRB1 oligotypes in RA patients and controls

DRB1*	RA n=69 (%)	Controls n=82 (%)
01	12 (17)	14 (17)
0101	2 (3)	0 (0)
0102	7 (10)	9 (11)
0103	1 (1)	0 (0)
No result†	2 (2)	5 (7)
02	12 (17)	21 (26)
03	9 (13)	
0301	6 (7)	13 (16)
0302	3 (4)	9 (11)
04	20 (29)	3 (4)†
0401	1 (1)	0 (0)
0405	15 (22)	3 (4)*
0412	2 (2)	0 (0)
No result	2 (2)	0 (0)
11	21 (30)	33 (40)
12	12 (16)	5 (7)
13	12 (17)	16 (19)
14	0	0
07	3 (4)	12 (15)
08	5 (7)	10 (12)
09	3 (4)	0 (0)
1001	13 (19)	2 (2)*
04 or 10	33 (48)	5 (7)†

RA vs Controls * $p < 0.002$.

† $p < 0.001$.

† No PCR amplification.

Table 2.
Critical 3rd hypervariable region residues for DRB1*0412

Allele	SSO*		Residues†		
	5	7			
	7	0			
	0	0	57	71	74
	2	6			
DRB1*0403	-	+	D	R	E
DRB1*0405	+	-	S	R	A
DRB1*0412	+	+	S	R	E

* SSO = sequence-specific oligonucleotide probe.

† DRB1 amino acid residue.

DRB1*04 subtypes

The subtype of all 3 DRB1*04 controls was DRB1*0405 and 15/20 DRB1*04 RA patients were also DRB1*0405; the DNA from 2 did not amplify with the primers and 1 was DRB1*0401. The remaining 2 gave an unusual pattern in that they reacted with probe 5702 that defined DRB1*0405 as well as with probe 7006 that defined DRB1*0403. The second DRB1 allele in one individual was *0302 and in the other was *0200. Based

Table 3.
Distribution of DQB1 oligotypes in RA patients and controls

DQB1	RA n=66 (%)	Controls n=82 (%)
0201	11 (17)	23 (28)
0301	16 (24)	17 (21)
0302	15 (23)	3 (4)†
0401	0	0
0402	8 (12)	9 (11)
0501	28 (42)	32 (39)
0602	13 (20)	40 (49)‡
0603	3 (4)	9 (11)
0604	3 (5)	3 (4)
0605	2 (3)	2 (2)

RA vs Controls †p=0.001.
‡p=0.0005.

Table 4.
Distribution of selected assumed haplotypes in RA patients and controls

DRB1-DQB1	RA n=64 (%)	Controls n=67 (%)
01-0501	7 (11)	10 (15)
02-0602	9 (14)	20 (30)†
04-0302	15 (23)	3 (4)††
11-0301	11 (17)	14 (21)
10-0501	12 (19)	2 (3)‡
11-0602	3 (5)	15 (22)‡

RA vs Controls †p < 0.05.
‡p < 0.01.
††p < 0.005.

on its reactivity with the two probes, the sequence of this oligotype would correspond to serine at position 57, arginine at position 71 and glutamic acid at position 74 (Table 2).

DQB1 polymorphism in RA patients and controls

The distribution of the DQB1 polymorphisms in RA patients and controls is given in Table 3. DQB1*0302 is increased in the patient group (23% vs 4% p=0.001) whereas DQB1*0602 is decreased (20% vs 49%, p<0.005). The DRB1-DQB1 associations based on previously established population and family segregation studies are given in Table 4. DRB1*0405 was associated with DRB1*0302 in all 3 controls and 12/15 RA patients whose DRB1*04 subtype had been defined. Five (25%) of the 20 patients with DRB1*04 associated with DQB1*0301 of which 4 were DRB1*0405 and the other could not be determined.

Discussion

We have found a highly significant increase in the frequency of the *0405 subtype of DRB1*04 and of DRB1*1001 in Shona RA patients when com-

pared to a control population. No increase in DRB1*01 was demonstrated. In a previous small sample only the serological equivalent of DRB1*04 was increased (8). The increase of DRB1*0405 indicates that this subtype in the Zimbabwean Black population is also an RA susceptibility allele as has been shown for Mediterranean (11, 12) and Japanese (13) RA patients. In the Zimbabwean population DRB1*0405 associates with DQB1*0302 implying linkage disequilibrium between the two alleles. Similar findings have been reported in English (14) and Spanish (15) populations but the DRB1*0405-DQB1*0302 haplotypes differ at DQ from the DRB1*0405-DQB1*0401 haplotype found in the Japanese (13).

We have also identified the DRB1*04 subtype *0412 newly defined in the XIst Histocompatibility workshop based on the presence of a serine at position 57 (identified by probe 7002) and a glutamic acid at position 74 (probe 7006) (16). Since only 2 patients and no controls possessed this oligotype its clinical significance in RA susceptibility cannot yet be assessed.

Acknowledgements

We wish to thank the Arthritis and Rheumatism Council (SC), for financial support and Mr Richard Brown who helped in collecting samples from the controls. JMP-G was supported by a Fellowship from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain and CB was supported by World University Service (UK).

References

- Zochke D, Segall M. Dw subtypes of DR4 in rheumatoid arthritis: Evidence for a preferential association with Dw4. *Human Immunology* 1986; 15: 118-24.
- Wordsworth BP, Lanchbury JSS, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS, Bell JI. HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA Class II region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 10049-53.
- Nepom GT, Byers P, Seyfried C, et al. HLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 15-21.
- Gao X, Olsen NJ, Pincus T, Stastny P. HLA-DR alleles with naturally occurring amino acid substitutions and risk for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 939-46.
- Mody GM, Hammond MG, Naidoo PD. HLA associations with rheumatoid arthritis in African blacks. *J Rheum* 1989; 16: 1326-8.
- Pile KD, Tikly M, Wordsworth BP. HLA-DR association with rheumatoid arthritis in three black South African groups: A study of ethnic groups. *Br J Rheumatology* 1992; 31: suppl. 1: 12.

7. Martelli LW, DuToit ED, Lalla AA, Meyers OL. Association of rheumatoid arthritis with HLA in three South African populations - whites, blacks and a population of mixed ancestry. *SAMJ* 1989; 76: 189-90.
8. Martelli LW, Stein M, Davis P, West G, Emmanuel E, DuToit ED. The association between HLA and rheumatoid arthritis in Zimbabwean blacks. *Tissue Antigens* 1990; 36: 125-6.
9. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1205-13.
10. Garcia-Pacheco JM, Herbut B, Cutbush S, et al. The distribution of HLA-DQA1, DQB1 and DRB1 alleles in black IDDM patients and control from Zimbabwe. *Tissue Antigens* 1992; 40: 145-9.
11. Boki KA, Vaughan RW, Drosos AA, Moutsopoulos HM, Panayi GS, Lanchbury JS. HLA class II sequence polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in Greeks. The HLA DR β shared-epitope hypothesis accounts for the disease in a minority of Greek patients. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 749-55.
12. Gao X, Brautbar C, Gazit E, et al. A variant of HLA-DR4 determines susceptibility to rheumatoid arthritis in a subset of Israeli Jews. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 547-51.
13. Watanabe Y, Tokunga K, Matsuki K, et al. Putative amino acid sequence of HLA-DRB chain contributing to rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1989; 169: 2263-8.
14. Lanchbury JSS, Hall MA, Welsh KI, Panayi GS. Sequence Analysis of HLA-DRB1 Subtypes: Additional First Domain Variability is Detected by Oligonucleotide Hybridization and Nucleotide Sequencing. *Human Immunol* 1990; 27: 136-44.
15. Sanchez B, Moreno I, Magarino M, et al. HLA-DRW10 confers the highest susceptibility to rheumatoid arthritis in a Spanish population. *Tissue Antigens* 1990; 36: 174-6.
16. Stastny P, Kimura A. DNA typing analysis of the DR4 group 1991. Oxford: Oxford University Press, 1992: 465-9.

Address:

Dr. J. A. Sachs
Research Laboratories
Department of Immunology
The London Hospital Med. Col
56 Ashfield Street
London E1 2AD London UK

CONCISE COMMUNICATIONS

Association of HLA-DR5 (possibly DRB1*1201) with the primary antiphospholipid syndrome in Mexican patients

Primary antiphospholipid syndrome is a condition manifested by thromboses and hemocytopenias in patients who have high titers of antiphospholipid antibodies (aPL) but no evidence of an associated autoimmune or infectious disease that might explain their presence (1). The same aPL-associated manifestations can occur in systemic lupus erythematosus (SLE) as a secondary antiphospholipid syndrome (2). Associations between class II major histocompatibility complex (MHC) antigens and aPL on the one hand, and between antiphospholipid syndrome (whether primary or secondary) and SLE on the other, have been described. Reported specific associations have included an increased frequency of HLA-DR4 in English SLE patients with anticardiolipin antibodies (3) and an increased frequency of HLA-DQ7 in North American patients with lupus anticoagulant (4). Savi and coworkers (5) reported a high frequency of HLA-DR7 in northern Italian patients with the antiphospholipid syndrome secondary to SLE, and Asherson et al (6) reported an increased frequency of HLA-DR4 in English patients with the primary antiphospholipid syndrome. Using restriction fragment length polymorphism analysis and sequence-specific oligonucleotides, the latter authors found that 12 of their 13 primary antiphospholipid syndrome patients expressed the supertypic antigen DR53.

We studied the MHC genes (classes I, II and III) in Mexican patients with the primary antiphospholipid syndrome, using serologic and molecular techniques. Twenty-one patients who fulfilled criteria for definite primary antiphospholipid syndrome and had no evidence of another disorder after a followup period of at least 3 years were studied. All had anticardiolipin antibodies at levels 5 or more standard deviations above the mean in 100 normal controls studied by an enzyme-linked immunosorbent assay method as previously described (7). Normal controls for HLA typing consisted of 100 ethnically and geographically matched subjects. Class I and II antigens were determined by standard microlymphocytotoxicity testing, and class III antigens by agarose gel electrophoresis and immunofixation. HLA-DRB and DQB alleles were studied by sequence-specific oligonucleotide typing, after amplification of their respective genes using methods and reagents described previously (8), with minor modifications. For statistical comparisons, 2×2 tables and χ^2 testing (Fisher's exact test when necessary) were used. *P* values were corrected by multiplying by the number of comparisons. Relative risks (RR) were determined by the method described by Woolf (9).

Significant differences in phenotype frequencies between patients and controls were found to be limited to the class II region of the MHC. Thus, HLA-DR5 was expressed in 11 of 17 patients with the primary antiphospholipid syndrome, compared with 19 of 100 controls ($P_{\text{corr}} = 0.001$, $RR = 7.8$) (Table 1). To define the order of the alleles within

Table 1. Frequencies (%) of selected class II major histocompatibility complex alleles (determined by serologic and molecular techniques) in primary antiphospholipid syndrome patients and normal controls*

	Patients	Controls
Serologic typing (n = 17 patients, 100 controls)†		
DR2	7 (41.1)	15 (15.0)
DR3	3 (17.6)	13 (13.0)
DR5	11 (64.7)‡	19 (19.0)
DR52	15 (88.2)	64 (64.0)
DR53	7 (41.1)	67 (67.0)
DQ1	9 (52.9)	38 (38.0)
DQ2	3 (17.6)	23 (23.0)
DQ3	13 (76.4)	84 (84.0)
Oligonucleotide typing (n = 21 patients, 25 controls)		
DRB1*0101	1 (4.7)	3 (12.0)
DRB1*1501	7 (33.3)	3 (12.0)
DRB1*1101	2 (9.5)	2 (8.0)
DRB1*1102	2 (9.5)	2 (8.0)
DRB1*1201	9 (42.8)§	1 (4.0)
DRB1*0701	0 (0.0)	7 (28.0)
DRB1*0801	6 (28.5)	7 (28.0)
DRB1*1001	2 (9.5)	1 (4.0)
DQB1*0201	3 (14.2)	6 (24.0)
DQB1*0501	3 (14.2)	2 (8.0)
DQB1*0502	1 (4.7)	1 (4.0)
DQB1*0503	2 (9.5)	1 (4.0)
DQB1*0602	3 (14.2)	2 (8.0)
DQB1*0604	2 (9.5)	1 (4.0)
DQB1*0301	13 (61.9)	12 (48.0)
DQB1*0302	8 (38.0)	12 (48.0)
DQB1*0303	1 (4.7)	0 (0.0)

* Values are the number (%).

† Only alleles of interest (i.e., with notable differences in frequency between the 2 populations) are shown.

‡ P_{corr} (corrected for 22 comparisons) = 0.001 versus controls, relative risk (RR) = 7.8.

§ P_{corr} (corrected for 20 comparisons) = 0.08 versus controls, $RR = 18.0$.

the chromosomes, we also studied 90 first-degree relatives of the primary antiphospholipid syndrome patients. All DR5 haplotypes also expressed DQ7 and DR52 alleles, inherited as a haplotype within the families. One patient was DR5 homozygous. Of the 6 patients who did not express the HLA-DR5 allele, 2 were positive for HLA-DR2, 2 for HLA-DR3, and 2 expressed HLA-DR8. Oligotyping analysis showed an increased frequency of the DRB1*1201 allele ($P_{\text{corr}} = 0.08$, $RR = 18.0$) (Table 1). The distribution of the DQB alleles was similar in patients and normal controls.

Thus, we found a significant association between the primary antiphospholipid syndrome and HLA-DR5 in Mexican patients, but no association of the primary antiphospholipid syndrome with DQ alleles was found. The relevant HLA-DR5 subtype seemed to be DRB1*1201. This, however, might represent just a trend rather than a true associ-

ation, since the corrected *P* value was not significant. In contrast to the decreased frequency of DR52 found in English patients with primary antiphospholipid syndrome (6), we found a higher frequency of this antigen in our patients. Another difference between English and Mexican patients is that 92% of the English patients were positive for the supertypic antigen HLA-DR53, whereas in Mexicans the frequency of this antigen was similar in patients and controls. Comparable findings were noted with the HLA-DR4 antigen, which had a frequency of 76.9% in English patients whereas it was found in only 35% of our Mexican patients and 42% of Mexican controls (results not shown). Regarding the HLA-DQ region, Arnett et al (4) reported that HLA-DQ7 is associated with the presence of lupus anticoagulant, a related aPL, in black and white SLE patients in the US. We found no association with HLA-DQ7 in our primary antiphospholipid syndrome patients, all of whom had aPL, but found that all DRB1*1101 or DRB1*1201 positive patients in whom DQ variants were detected were also DQB1*0301 positive. In Italian SLE patients, an association between anticardiolipin antibodies and HLA-DR7 was found (5). We did not identify such an association in our primary antiphospholipid syndrome patients, although we did find it in our Mexican SLE patients with secondary antiphospholipid syndrome (Vargas-Alarcon G et al: unpublished results). This difference between patients with the primary and those with the secondary antiphospholipid syndrome supports the notion that the primary antiphospholipid syndrome is a distinct entity and not merely a phase in the course of SLE.

Two of our 6 DR5 negative primary antiphospholipid syndrome patients had DR8 and 2 had DR3. The DR5 allele has the coded sequence of the DRB1 region with marked homology with DR8 and DR3 alleles, which is in accord with the notion that all 3 alleles belong to the DR52 family. The DR3 and DR5 alleles share amino acids 9-13 of the first hypervariable region from the DRB1 gene (Glu, Tyr, Ser, Thr, Ser), whereas the DR8 allele differs only at position number 13 (10,11). This sequence could be crucial in the antigen recognition that leads to the production of aPL, since it is located on the floor of the antigen-recognition site of the MHC molecule (12). The finding that 19 of 21 Mexican patients with primary antiphospholipid syndrome had alleles belonging to the DR52 family, while a similar proportion of English patients had alleles belonging to the DR53 family, suggests that they result from different point mutations. It also suggests that the development of aPL in primary antiphospholipid syndrome may be antigen driven, whereas in SLE these autoantibodies may be genetically determined, since, in at least 2 different ethnic groups, they were associated with HLA-DR7.

Our findings indicate an association of DR5 (DRB1*1201) with susceptibility to primary antiphospholipid syndrome in Mexicans. The relevant gene appears to be located near the DRB1 gene and to belong to the DR52 family, whose related alleles share a sequence that could be relevant to the antigen recognition site. Additional sequence analysis of the HLA-DQ alleles could help define their role

in the primary antiphospholipid syndrome in Mexican patients.

Supported in part by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico, and the Programa Universitario de Investigación en Salud, Universidad Nacional Autónoma, México.

Gilberto Vargas-Alarcon, PhD
 Julio Granados, MD
 Carolina Bekker, MSc
 Jorge Alcocer-Varela, MD
 Donato Alarcón-Segovia, MD
 Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán
 Mexico City, Mexico

1. Alarcón-Segovia D, Sánchez-Guerrero J: Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 16:482-488, 1989
2. Alarcón-Segovia D, Pérez-Vázquez ME, Villa A, Drenkard C, Cabiedes J: Characterization of, and preliminary criteria for the antiphospholipid syndrome occurring within systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 21:275-286, 1992
3. McHugh NJ, Maddison PJ: HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus (letter). *Arthritis Rheum* 32:1623-1624, 1989
4. Arnett FC, Olsen ML, Anderson KL, Reveille JD: Molecular analysis of major histocompatibility complex alleles associated with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 87:1490-1495, 1991
5. Savi M, Ferraccioli GF, Neri TM, Zanelli P, Dall'Aglio PP, Tincani A, Balestrieri G, Carella G, Cattaneo R: HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies in northern Italian systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 31:1568-1570, 1988
6. Asherson RA, Doherty DG, Vergani D, Khamashta MA, Hughes GRV: Major histocompatibility complex associations with primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 35:124-125, 1992
7. Delezé M, Alarcón-Segovia D, Oriá CV, Sánchez-Guerrero J, Fernández-Domínguez L, Gómez-Pacheco L, Ponce de León S: Hemocytopenia in systemic lupus erythematosus: relationship to antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 16:926-930, 1989
8. Kimura A, Sasazuki T: Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA DNA-typing technique. In: HLA 1991. Edited by K Tsuji, M Aizawa, T Sasazuki. Volume 1. Oxford, UK, Oxford Scientific Publications, 1992
9. Woolf B: On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 19:251-253, 1955
10. Bell JI, Denny D Jr, Foster L, Todd JA, McDevitt HO: Allelic variation in the DR subregion of the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:6234-6238, 1987
11. Tieber VL, Abruozzi LF, Didier DK, Swartz BD, Rotweun P: Complete characterization of sequence of an HLA class II DR beta chain cDNA from the DR5 haplotype. *J Biol Chem* 261:2738-2742, 1986
12. Brown JH, Jardetzky T, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC: Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DRI. *Nature* 364:33-39, 1993

Cytarabine therapy for refractory cutaneous lupus

Treatments for cutaneous lupus include antimalarials, topical and systemic corticosteroids, azathioprine, methotrexate and cyclophosphamide, and occasionally, dap-

Brief Communication

Molecular analysis of HLA-DQ and -DP genes in caucasoid patients with Hashimoto's thyroiditis

Z. Wu, H. A. F. Stephens, J. A. Sachs, P. A. Biro, S. Cutbush, M. M. A. Magzoub, C. Becker, G. Schwartz, G. F. Bottazzo. Molecular analysis of HLA-DQ and -DP genes in caucasoid patients with Hashimoto's thyroiditis.

Tissue Antigens 1994; 43: 116-119. © Munksgaard 1994

Zhonglin Wu^{1,2},
Henry A. F. Stephens^{1,2},
John A. Sachs¹, P. Andrew Biro¹,
Shirley Cutbush¹,
Mubarak M. A. Magzoub¹,
Carolina Becker¹, Giselle Schwartz¹
and Gian F. Bottazzo¹

¹Department of Immunology, The London Hospital Medical College, London, England.

²Department of Medicine, University of Miami School of Medicine, Miami, Florida, USA.

³Department of Transfusion Medicine, Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand

Key words: caucasian - oligotyping - HLA-DQ-DP polymorphism - Hashimoto's thyroiditis

Received 27 July, revised, accepted for publication 13 October 1993

One way of improving our understanding of the etiology and pathogenesis of autoimmune disease is to identify genetic markers that predispose or protect individuals from these disorders. At present, the most significant disease associations occur with alleles of the HLA class II region (1), the products of which are essential for the presentation of antigenic peptides to the immune system.

Hashimoto's thyroiditis (HT), the most common endocrine disease, is primarily a subclinical disorder and is now recognized to be the leading cause of hypothyroidism (2). It has been widely accepted that autoimmune mechanisms are involved in the pathogenesis of HT, which is characterized by thyroid enlargement, lymphocyte infiltration, high microsomal-specific antibody titers and the prevalence of hypothyroidism (3). The observation that HT can be found in several members of a family (4) suggests an influence of genetic factors in thyroid autoimmunity.

Serological analysis of class II allele frequencies in HT patients has revealed associations with DR4 and DR5 in caucasoids (5), DR9 in Chinese (6), and DRw53 in Japanese (7). Using Southern blot analysis with DRB and DQB probes, we have previously demonstrated an association between HT and DQw7 (DQB1*0301) in caucasoids (8). However, there is preliminary evidence that susceptibility to HT is not associated with DQw7 in Japanese patients (9). In this study, we have tested a large number of ethnically-matched, well-defined HT patients and controls from within London. Using the 11th International HLA Workshop (11WS) sequence-specific oligonucleotides (SSOs), primers and protocols (10, 11), we have analyzed the DQA1, DQB1, DPA1 and DPB1 gene loci to evaluate our previous observation and determined whether other alleles and haplotypes are associated with HT.

Forty-nine caucasoid patients with HT, and 64

healthy caucasoid controls with no clinical evidence or family history of thyroid or any other endocrine disease were recruited for this study. All patients had firm diffuse goitres, microsome-specific antibodies (titer > 1:1600), patchy uptake on thyroid screening and no previous history of hyperthyroidism. DQB1-specific amplification and SSO analysis of 47 patients and 50 controls revealed a significant increase of the DQB1*0301 allele in the patient group (59.6%) when compared to the controls (24.0%) (Table 1). Six patients were scored as being homozygous for DQB1*0301, in comparison to only 1 control (data not shown). The increased frequency of DQB1*0301 in the patient group was accompanied by a reduction of other DQB1 alleles with the exception of DQB1*0402, *0503 and *0605, although the differences from the controls were not significant. The reduced frequency of

DQB1*0602 in the patients was significant ($p < 0.05$), when compared to the control group. Similar analysis of the DQA1 gene loci in 48 patients and 59 controls, also presented in Table 1, revealed an increased frequency of the DQA1*0301/2 allele in the patient group (50%) when compared to the control group (30.5%, $p < 0.05$).

The presence or absence of DQA1*0301/2, DQB1*0301 assumed haplotypes, based on previous associates, is given in both patients and controls in Table 2 (3 patients and 5 controls used in Table 1 have been excluded because of the absence of one or the other). An increased frequency of the DQA1*0301/2, DQB1*0301 haplotype was observed in the patient group (compared to controls: 18/46 versus 3/47, $p < 0.0005$). Thus, of the 23 DQA1*0301/2 genotypes detected in the patients, 18 (78.3%) were DQA1*0301/2, DQB1*0301 whereas in only 3/13 (23.1%) of the DQA1*0301/2 haplotypes recorded in the controls included the DQB1*0301 allele ($p < 0.01$).

DPA1 and DPB1 exon-specific amplification and analysis with the 11WS DP-specific SSOs in both the patient and control groups revealed an apparent reduced frequency of the DPB1*0201 allele in the patient group (Table 3, $p < 0.05$), although this failed to reach significance after correction. No other differences in DPA1 or DPB1 allele frequencies were detected between patient and control groups. Furthermore, no association was observed between any class II allele identified in the HT patients with the measurable presence of microsome-, thyroglobulin-, gastric-, or pancreatic islet cell-specific antibodies also detected in these patients (data not shown).

Previous genetic evidence derived from Southern blot analysis of the DR and DQ gene loci has led to the notion that the DQB1*0301 (DQw7) allele is a class II susceptibility determinant in Hashimoto's thyroiditis (8). Using DQB1-specific PCR and SSO analysis, we have been able to confirm this association in 22 of the London patients used in the

Table 1.
Phenotype (PF) and gene frequency (GF) of DQA1 and DQB1 alleles in HT patients and controls

	Patients (n=48)		Controls (n=59)	
	PF %	GF	PF %	GF
DQA1*0101	25.0	0.135	22.0	0.119
*0102	20.8	0.115	35.6	0.178
*0103	8.3	0.042	15.3	0.076
*0201	18.8	0.094	25.4	0.136
*0301/2 ^a	50.0 ^{ab}	0.271	30.5	0.169
*03012	-	-	1.7	0.008
*0401	4.2	0.021	3.4	0.017
*0501	58.3	0.313	45.8	0.297
*0601	2.1	0.010	-	-

	Patients (n=47)		Controls (n=50)	
	PF %	GF	PF %	GF
DQB1*0201	38.3	0.223	50.0	0.330
*0301	59.6 ^{ac}	0.362 ^{ad}	24.0	0.130
*0302	10.6	0.053	14.0	0.070
*03032	6.4	0.043	8.0	0.040
*0402	6.4	0.032	2.0	0.010
*0501	17.0	0.096	18.0	0.120
*0502	2.1	0.011	4.0	0.020
*05031	6.4	0.032	-	-
*0601	2.1	0.011	-	-
*0602	12.8 ^{ae}	0.074 ^{af}	32.0	0.180
*0603	4.3	0.032	14.0	0.020
*0604	2.1	0.011	4.0	0.020
*0605	4.3	0.021	2.0	0.010

^a Phenotype and genotype frequencies associated with HT when compared to controls. ^b chi square=4.21, $p < 0.05$. ^c chi square=12.7, $p = 4.0 \times 10^{-4}$ ($p = 6.0 \times 10^{-3}$ corrected). ^d chi square=14.2, $p = 2.0 \times 10^{-4}$ ($p = 3.0 \times 10^{-3}$ corrected). ^e chi square=5.1, $p = 2.4 \times 10^{-2}$. ^f chi square=4.8, $p = 2.8 \times 10^{-2}$. Statistical analysis was performed using the chi square test, with Yates correction applied when necessary. p values have not been corrected where significance has been reported previously. ^g 11WS SSO hybridization protocol does not distinguish between DQA1*03011 and DQA1*0302 alleles, which in this study have been given the DQA1*0301/2 designation.

Table 2.
The presence of DQA1*0301/2 and DQB1*0301 haplotypes in HT patients and controls

DQA1*0301/2	DQB1*0301	Patients n=46 (%)	Controls (n=47 (%))
+	+	18 (39) [*]	3 (6) [*]
+	-	5 (11)	10 (21)
-	+	14 (30)	9 (19)
-	-	19 (41)	25 (53)

^{*} Chi square=12.45, $p < 0.0005$ (Yates correction). The numbers refer to the presence or absence of the alleles in the individual - one patient was homozygous for DQA1*0301/2, DQB1*0301.

Table 3.
Phenotype (PF) and gene frequencies (GF) of DQA1 and DPB1 alleles in HT patients and controls

	Patients (n=47)		Controls (n=61)	
	PF %	GF	PF %	GF
DQA1*0101/2/3+	97.9	0.809	96.7	0.803
*0201	36.2	0.191	36.1	0.197
	Patients (n=49)		Controls (n=62)	
	PF %	GF	PF %	GF
DPB1*0101	6.1 ^a	0.031	14.5	0.081
*0201	12.2 ^{ab}	0.061 ^{ac}	30.6	0.153
*0202	4.1	0.020	-	-
*0301	14.3	0.071	16.1	0.081
*0401	73.5	0.531	71.0	0.435
*0402	28.6	0.143	21.0	0.105
*0501	-	-	4.8	0.024
*0601	2.0	0.010	1.6	0.008
*0901	-	-	4.8	0.024
*1001	4.1	0.020	1.6	0.008
*1101	8.2	0.051	6.5	0.032
*1301	4.1	0.020	1.6	0.008
*1401	2.0	0.010	1.6	0.008
*1501	2.0	0.010	3.2	0.016
*1701	4.1	0.020	1.6	0.008
*1801	-	-	1.6	0.008

^a Allele negatively associated with HT when compared to controls. ^b chi square=4.3, $p=3.8 \times 10^{-2}$ (not significant after correction). ^c chi square=3.8, $p > 0.05$. +11WS protocol does not distinguish between the DQA1*0101, *102 and *0103 alleles.

study of Badenhop et al. (8), in addition to 25 caucasoid patients also recruited in London. DQB1*0301 was also increased in a group of HT patients in Newfoundland (12). Preliminary analysis of class II allele frequencies in non-caucasoid HT patients and controls has revealed an apparent reduction of DQB1*0602 in Japanese patients (9). This was also evident in our analysis of caucasoid patients (Table 1), indicating that DQB1*0602 may confer some degree of protection against disease in two distinct ethnic groups. The data from our control panel does not suggest that DQB1*0602 and DPB1*0201 (see above) are in linkage disequilibrium. Of the 16 controls who are DQB1*0602, 5 (31%) were DPB1*0201, similar to the overall frequency of DPB1*0201 in the controls, i.e., 19/62 (31%). We now extend these observations to include a role for the DQB heterodimer composed of the products of the DQA1*0301/2 and DQB1*0301 genes in the pathology of HT in some patients (Table 2). There are, in contrast, alternative studies with caucasoid HT patients that have revealed disease associations with the DQB1*0201 allele (12, 13). Such apparent discrepancies have been reconciled by Farid (14), who has postulated

the development HT to be influenced by numerous gene loci, with a variety of environmental factors differing between locales, initiating disease in different populations at risk.

Together with previous analysis of the DR and DQ loci in HT patients (8, 12, 13), our analysis of both the DQ and DP region would confirm that the class II association with HT is with the products of the DQ and not the DP locus.

Comparison of the first protein domain amino-acid sequence of all known DQB1 alleles (15) reveals that DQB1*0301 encodes a unique negatively charged glutamic acid at position 45. According to the model of the class II antigen-binding cleft (16), DQB1 position 45 is located on a loop of the beta-pleated sheet outside of the presumed peptide-binding regions. However, DQB1 position 45 is part of a hydrophobic cluster and the presence of a charged glutamic acid in this position might disrupt the cluster. The observation that a glutamic acid at DQB1 position 45 can functionally influence recognition by allo-reactive T-cell clones has led to suggestions that this position probably effects the overall configuration of the DQ molecule (17), which in turn may play a role in the immunological mechanisms underlying the development of autoimmune disease in some HT patients.

In summary, the DQB1*0301, DQA1*0301/2 alleles and the DQA1*0301/2, DQB1*0301 haplotype were significantly increased in the HT patients compared to the controls, whereas DQB1*0602 was significantly decreased. Our results indicated that the class II association with HT is with the products of the DQ locus, especially with certain DQ heterodimers, and that a glutamic acid at DQB1 position 45 may play a role in the immunological mechanisms in some HT patients.

Acknowledgments

We are gratefully indebted to Dr. R. Mirakian, W. Moore and A. Miles for assistance in sample collection, and Mrs. M. Sanchez for typing the manuscript. We also wish to thank Drs. E. A. M. Gale (St Bartholomew's Hospital) and J. M. Garcia (London Hospital) for helpful discussions, as well as Professor E. Thorsby (National Hospital, Oslo) for communicating unpublished observations. ZW is in receipt of an Overseas Research Student Award.

References

- Todd J, Acha-Orbea H, Bell JI, et al. A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity. *Science* 1988; 240: 1003-1009.
- Rapoport B. Pathophysiology of Hashimoto's thyroiditis and hypothyroidism. *Ann Rev Med* 1991; 42: 91-96.

3. Walfish PG, Farid NR. The immunogenetic basis of autoimmune thyroid diseases. In: Walfish PG, Wall JR, Volpe R, eds. Autoimmunity and the thyroid. Orlando, San Diego, New York, London, Toronto, Sydney, Tokyo: Academic Press, 1985: 9-36.
4. Tamai H, Uno H, Hirota Y, et al. Immunogenetics of Hashimoto's and Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60: 62-66.
5. Farid NR. Immunogenetics of autoimmune thyroid disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1987; 16: 229-245.
6. Hawkins BR, Lam KSL, Ma JTC, Wag C, Yeung RTT. Strong association between HLA DRw9 and Hashimoto's thyroiditis in southern Chinese. *Acta Endocrinol (Copenh.)* 1987; 114: 543-546.
7. Honda k, Tamai H, Morita T, Kuma K, Nishimura Y, Sasazuki T. Hashimoto's thyroiditis and HLA in Japanese. *J Endocrinol Metab* 1989; 69: 1268-1273.
8. Badenhoop K, Schwartz G, Walfish PG, Drummond V, Usadel KH, Bottazzo GF. Susceptibility to thyroid autoimmune disease: molecular analysis of HLA-D region genes identifies new markers for goitrous Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 1131-1137.
9. Tamai H, Kimura A, Mukuta T, et al. HLA DQ genotypes in autoimmune thyroid diseases. *Thyroid* 1991; 1: (Suppl. 1), 30 (Abstr).
10. Magzoub MMA, Stephens HAF, Sachs JA, et al. HLA-DP polymorphism in Sudanese controls and patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Tissue Antigens* 1992; 40: 64-68.
11. Garcia-Pacheco JM, Herbut B, Cutbush S, et al. Distribution of HLA-DQA1, -DQB1 and DRB1 alleles in black IDDM patients and controls from Zimbabwe. *Tissue Antigens* 1992; 40: 145-149.
12. Shi Y, Zou M, Robb D, Farid NR. Typing for MHC class II antigens in thyroid tissue blocks: Association of Hashimoto's thyroiditis with HLA-DQA1*0301 and *DQB1*0201 alleles. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 943-946.
13. Tandon N, Zhang L, Wheatman AP. HLA associations with Hashimoto's thyroiditis. *Clin Endocrinol* 1991; 34: 383-386.
14. Farid NR. Are the immune response to endocrine autoantigens genetically restricted? *Autoimmunity* 1989; 3: 47.
15. Bodmer JG, Albert ED, Bodmer WF, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1990. *Immunogenetics* 1991; 33: 301-309.
16. Brown JH, Jardetzky T, Saper MA, Samraoui B, Bjorkman PJ, Wiley DC. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988; 332: 845-850.
17. Gjertsen HA, Lundin KEA, Kwok WW, Nepom GT, Thorsby E. Allelrecognition of HLA-DQw8 molecules: Influence of single amino acid substitutions. *Tissue Antigens* 1992; 39: 95-98.

Address:

Professor G. F. Bottazzo
 Department of Immunology
 The London Hospital Medical College
 56-76 Ashfield Street
 London
 E1 2AJ, UK
 FAX: 071-790-3033



ANEXO D
PUBLICACIONES EN RELACION AL TEMA PRINCIPAL

CONCISE COMMUNICATIONS

Association of HLA-DR5 (possibly DRB1*1201) with the primary antiphospholipid syndrome in Mexican patients

Primary antiphospholipid syndrome is a condition manifested by thromboses and hemocytopenias in patients who have high titers of antiphospholipid antibodies (aPL) but no evidence of an associated autoimmune or infectious disease that might explain their presence (1). The same aPL-associated manifestations can occur in systemic lupus erythematosus (SLE) as a secondary antiphospholipid syndrome (2). Associations between class II major histocompatibility complex (MHC) antigens and aPL on the one hand, and between antiphospholipid syndrome (whether primary or secondary) and SLE on the other, have been described. Reported specific associations have included an increased frequency of HLA-DR4 in English SLE patients with anticardiolipin antibodies (3) and an increased frequency of HLA-DQ7 in North American patients with lupus anticoagulant (4). Savi and coworkers (5) reported a high frequency of HLA-DR7 in northern Italian patients with the antiphospholipid syndrome secondary to SLE, and Asherson et al (6) reported an increased frequency of HLA-DR4 in English patients with the primary antiphospholipid syndrome. Using restriction fragment length polymorphism analysis and sequence-specific oligonucleotides, the latter authors found that 12 of their 13 primary antiphospholipid syndrome patients expressed the supertypic antigen DR53.

We studied the MHC genes (classes I, II and III) in Mexican patients with the primary antiphospholipid syndrome, using serologic and molecular techniques. Twenty-one patients who fulfilled criteria for definite primary antiphospholipid syndrome and had no evidence of another disorder after a followup period of at least 3 years were studied. All had anticardiolipin antibodies at levels 5 or more standard deviations above the mean in 100 normal controls studied by an enzyme-linked immunosorbent assay method as previously described (7). Normal controls for HLA typing consisted of 100 ethnically and geographically matched subjects. Class I and II antigens were determined by standard microlymphocytotoxicity testing, and class III antigens by agarose gel electrophoresis and immunofixation. HLA-DRB and DQB alleles were studied by sequence-specific oligonucleotide typing, after amplification of their respective genes using methods and reagents described previously (8), with minor modifications. For statistical comparisons, 2 x 2 tables and χ^2 testing (Fisher's exact test when necessary) were used. *P* values were corrected by multiplying by the number of comparisons. Relative risks (RR) were determined by the method described by Woolf (9).

Significant differences in phenotype frequencies between patients and controls were found to be limited to the class II region of the MHC. Thus, HLA-DR5 was expressed in 11 of 17 patients with the primary antiphospholipid syndrome, compared with 19 of 100 controls ($P_{\text{corr}} = 0.001$, $RR = 7.8$) (Table 1). To define the order of the alleles within

Table 1. Frequencies (%) of selected class II major histocompatibility complex alleles (determined by serologic and molecular techniques) in primary antiphospholipid syndrome patients and normal controls*

	Patients	Controls
Serologic typing (n = 17 patients, 100 controls)†		
DR2	7 (41.1)	15 (15.0)
DR3	3 (17.6)	13 (13.0)
DR5	11 (64.7)‡	19 (19.0)
DR52	15 (88.2)	64 (64.0)
DR53	7 (41.1)	67 (67.0)
DQ1	9 (52.9)	38 (38.0)
DQ2	3 (17.6)	23 (23.0)
DQ3	13 (76.4)	84 (84.0)
Oligonucleotide typing (n = 21 patients, 25 controls)		
DRB1*0101	1 (4.7)	3 (12.0)
DRB1*1501	7 (33.3)	3 (12.0)
DRB1*1101	2 (9.5)	2 (8.0)
DRB1*1102	2 (9.5)	2 (8.0)
DRB1*1201	9 (42.8)§	1 (4.0)
DRB1*0701	0 (0.0)	7 (28.0)
DRB1*0801	6 (28.5)	7 (28.0)
DRB1*1001	2 (9.5)	1 (4.0)
DQB1*0201	3 (14.2)	6 (24.0)
DQB1*0501	3 (14.2)	2 (8.0)
DQB1*0502	1 (4.7)	1 (4.0)
DQB1*0503	2 (9.5)	1 (4.0)
DQB1*0602	3 (14.2)	2 (8.0)
DQB1*0604	2 (9.5)	1 (4.0)
DQB1*0301	13 (61.9)	12 (48.0)
DQB1*0302	8 (38.0)	12 (48.0)
DQB1*0303	1 (4.7)	0 (0.0)

* Values are the number (%).

† Only alleles of interest (i.e., with notable differences in frequency between the 2 populations) are shown.

‡ P_{corr} (corrected for 22 comparisons) = 0.001 versus controls, relative risk (RR) = 7.8.

§ P_{corr} (corrected for 20 comparisons) = 0.08 versus controls, RR = 18.0.

the chromosomes, we also studied 90 first-degree relatives of the primary antiphospholipid syndrome patients. All DR5 haplotypes also expressed DQ7 and DR52 alleles, inherited as a haplotype within the families. One patient was DR5 homozygous. Of the 6 patients who did not express the HLA-DR5 allele, 2 were positive for HLA-DR2, 2 for HLA-DR3, and 2 expressed HLA-DR8. Oligotyping analysis showed an increased frequency of the DRB1*1201 allele ($P_{\text{corr}} = 0.08$, $RR = 18.0$) (Table 1). The distribution of the DQB alleles was similar in patients and normal controls.

Thus, we found a significant association between the primary antiphospholipid syndrome and HLA-DR5 in Mexican patients, but no association of the primary antiphospholipid syndrome with DQ alleles was found. The relevant HLA-DR5 subtype seemed to be DRB1*1201. This, however, might represent just a trend rather than a true associ-

ation, since the corrected *P* value was not significant. In contrast to the decreased frequency of DR52 found in English patients with primary antiphospholipid syndrome (6), we found a higher frequency of this antigen in our patients. Another difference between English and Mexican patients is that 92% of the English patients were positive for the supertypic antigen HLA-DR53, whereas in Mexicans the frequency of this antigen was similar in patients and controls. Comparable findings were noted with the HLA-DR4 antigen, which had a frequency of 76.9% in English patients whereas it was found in only 35% of our Mexican patients and 42% of Mexican controls (results not shown). Regarding the HLA-DQ region, Arnett et al (4) reported that HLA-DQ7 is associated with the presence of lupus anticoagulant, a related aPL, in black and white SLE patients in the US. We found no association with HLA-DQ7 in our primary antiphospholipid syndrome patients, all of whom had aPL, but found that all DRB1*1101 or DRB1*1201 positive patients in whom DQ variants were detected were also DQB1*0301 positive. In Italian SLE patients, an association between anticardiolipin antibodies and HLA-DR7 was found (5). We did not identify such an association in our primary antiphospholipid syndrome patients, although we did find it in our Mexican SLE patients with secondary antiphospholipid syndrome (Vargas-Alarcon G et al: unpublished results). This difference between patients with the primary and those with the secondary antiphospholipid syndrome supports the notion that the primary antiphospholipid syndrome is a distinct entity and not merely a phase in the course of SLE.

Two of our 6 DR5 negative primary antiphospholipid syndrome patients had DR8 and 2 had DR3. The DR5 allele has the coded sequence of the DRB1 region with marked homology with DR8 and DR3 alleles, which is in accord with the notion that all 3 alleles belong to the DR52 family. The DR3 and DR5 alleles share amino acids 9-13 of the first hypervariable region from the DRB1 gene (Glu, Tyr, Ser, Thr, Ser), whereas the DR8 allele differs only at position number 13 (10,11). This sequence could be crucial in the antigen recognition that leads to the production of aPL, since it is located on the floor of the antigen-recognition site of the MHC molecule (12). The finding that 19 of 21 Mexican patients with primary antiphospholipid syndrome had alleles belonging to the DR52 family, while a similar proportion of English patients had alleles belonging to the DR53 family, suggests that they result from different point mutations. It also suggests that the development of aPL in primary antiphospholipid syndrome may be antigen driven, whereas in SLE these autoantibodies may be genetically determined, since, in at least 2 different ethnic groups, they were associated with HLA-DR7.

Our findings indicate an association of DR5 (DRB1*1201) with susceptibility to primary antiphospholipid syndrome in Mexicans. The relevant gene appears to be located near the DRB1 gene and to belong to the DR52 family, whose related alleles share a sequence that could be relevant to the antigen recognition site. Additional sequence analysis of the HLA-DQ alleles could help define their role

in the primary antiphospholipid syndrome in Mexican patients.

Supported in part by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico, and the Programa Universitario de Investigación en Salud, Universidad Nacional Autónoma, Mexico.

Gilberto Vargas-Alarcon, PhD
 Julio Granados, MD
 Carolina Bekker, MSc
 Jorge Alcocer-Varela, MD
 Donato Alarcón-Segovia, MD
 Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán
 Mexico City, Mexico

- Alarcón-Segovia D, Sánchez-Guerrero J: Primary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 16:482-488, 1989
- Alarcón-Segovia D, Pérez-Vázquez ME, Villa A, Drenkard C, Cabiedes J: Characterization of, and preliminary criteria for the antiphospholipid syndrome occurring within systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 21:275-286, 1992
- McHugh NJ, Maddison PJ: HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies in patients with systemic lupus erythematosus (letter). *Arthritis Rheum* 32:1623-1624, 1989
- Arnett FC, Olsen ML, Anderson KL, Reveille JD: Molecular analysis of major histocompatibility complex alleles associated with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 87:1490-1495, 1991
- Savi M, Ferraccioli GF, Neri TM, Zanelli P, Dall'Aglio PP, Tincani A, Balestrieri G, Carella G, Cattaneo R: HLA-DR antigens and anticardiolipin antibodies in northern Italian systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 31:1568-1570, 1988
- Asherson RA, Doherty DG, Vergani D, Khamashta MA, Hughes GRV: Major histocompatibility complex associations with primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 35:124-125, 1992
- Delezé M, Alarcón-Segovia D, Oria CV, Sánchez-Guerrero J, Fernández-Domínguez L, Gómez-Pacheco L, Ponce de León S: Hemocytopenia in systemic lupus erythematosus: relationship to antiphospholipid antibodies. *J Rheumatol* 16:926-930, 1989
- Kimura A, Sasazuki T: Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA DNA-typing technique. In: *HLA 1991*. Edited by K Tsuji, M Aizawa, T Sasazuki. Volume 1. Oxford, UK, Oxford Scientific Publications, 1992
- Woolf B: On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 19:251-253, 1955
- Bell JI, Denny D Jr, Foster L, Todd JA, McDevitt HO: Allelic variation in the DR subregion of the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:6234-6238, 1987
- Tieber VL, Abruozzi LF, Didier DK, Swartz BD, Rotweun P: Complete characterization of sequence of an HLA class II DR beta chain cDNA from the DR5 haplotype. *J Biol Chem* 261:2738-2742, 1986
- Brown JH, Jardetzky T, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC: Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33-39, 1993

Cytarabine therapy for refractory cutaneous lupus

Treatments for cutaneous lupus include antimalarials, topical and systemic corticosteroids, azathioprine, methotrexate and cyclophosphamide, and occasionally, dap-

Brief Communication

Molecular analysis of HLA-DQ and -DP genes in caucasoid patients with Hashimoto's thyroiditis

Z. Wu, H. A. F. Stephens, J. A. Sachs, P. A. Biro, S. Cutbush, M. M. A. Magzoub, C. Becker, G. Schwartz, G. F. Bottazzo. Molecular analysis of HLA-DQ and -DP genes in caucasoid patients with Hashimoto's thyroiditis.

Tissue Antigens 1994; 43: 116-119. © Munksgaard 1994

Zhonglin Wu^{1,2},
Henry A. F. Stephens^{1,2},
John A. Sachs¹, P. Andrew Biro¹,
Shirley Cutbush¹,
Mubarak M. A. Magzoub¹,
Carolina Becker¹, Giselle Schwartz¹
and Gian F. Bottazzo¹

¹Department of Immunology, The London Hospital Medical College, London, England.

²Department of Medicine, University of Miami School of Medicine, Miami, Florida, USA.

³Department of Transfusion Medicine, Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand

Key words: caucasian - oligotyping - HLA-DQ-DP polymorphism - Hashimoto's thyroiditis

Received 27 July, revised, accepted for publication 13 October 1993

One way of improving our understanding of the etiology and pathogenesis of autoimmune disease is to identify genetic markers that predispose or protect individuals from these disorders. At present, the most significant disease associations occur with alleles of the HLA class II region (1), the products of which are essential for the presentation of antigenic peptides to the immune system.

Hashimoto's thyroiditis (HT), the most common endocrine disease, is primarily a subclinical disorder and is now recognized to be the leading cause of hypothyroidism (2). It has been widely accepted that autoimmune mechanisms are involved in the pathogenesis of HT, which is characterized by thyroid enlargement, lymphocyte infiltration, high microsomal-specific antibody titers and the prevalence of hypothyroidism (3). The observation that HT can be found in several members of a family (4) suggests an influence of genetic factors in thyroid autoimmunity.

Serological analysis of class II allele frequencies in HT patients has revealed associations with DR4 and DR5 in caucasoids (5), DR9 in Chinese (6), and DRw53 in Japanese (7). Using Southern blot analysis with DRB and DQB probes, we have previously demonstrated an association between HT and DQw7 (DQB1*0301) in caucasoids (8). However, there is preliminary evidence that susceptibility to HT is not associated with DQw7 in Japanese patients (9). In this study, we have tested a large number of ethnically-matched, well-defined HT patients and controls from within London. Using the 11th International HLA Workshop (11WS) sequence-specific oligonucleotides (SSOs), primers and protocols (10, 11), we have analyzed the DQA1, DQB1, DPA1 and DPB1 gene loci to evaluate our previous observation and determined whether other alleles and haplotypes are associated with HT.

Forty-nine caucasoid patients with HT, and 64

healthy caucasoid controls with no clinical evidence or family history of thyroid or any other endocrine disease were recruited for this study. All patients had firm diffuse goitres, microsome-specific antibodies (titer >1:1600), patchy uptake on thyroid screening and no previous history of hyperthyroidism. DQB1-specific amplification and SSO analysis of 47 patients and 50 controls revealed a significant increase of the DQB1*0301 allele in the patient group (59.6%) when compared to the controls (24.0%) (Table 1). Six patients were scored as being homozygous for DQB1*0301, in comparison to only 1 control (data not shown). The increased frequency of DQB1*0301 in the patient group was accompanied by a reduction of other DQB1 alleles with the exception of DQB1*0402, *0503 and *0605, although the differences from the controls were not significant. The reduced frequency of

DQB1*0602 in the patients was significant ($p < 0.05$), when compared to the control group. Similar analysis of the DQA1 gene loci in 48 patients and 59 controls, also presented in Table 1, revealed an increased frequency of the DQA1*0301/2 allele in the patient group (50%) when compared to the control group (30.5%, $p < 0.05$).

The presence or absence of DQA1*0301/2, DQB1*0301 assumed haplotypes, based on previous associates, is given in both patients and controls in Table 2 (3 patients and 5 controls used in Table 1 have been excluded because of the absence of one or the other). An increased frequency of the DQA1*0301/2, DQB1*0301 haplotype was observed in the patient group (compared to controls: 18/46 versus 3/47, $p < 0.0005$). Thus, of the 23 DQA1*0301/2 genotypes detected in the patients, 18 (78.3%) were DQA1*0301/2, DQB1*0301 whereas in only 3/13 (23.1%) of the DQA1*0301/2 haplotypes recorded in the controls included the DQB1*0301 allele ($p < 0.01$).

DPA1 and DPB1 exon-specific amplification and analysis with the 11WS DP-specific SSOs in both the patient and control groups revealed an apparent reduced frequency of the DPB1*0201 allele in the patient group (Table 3, $p < 0.05$), although this failed to reach significance after correction. No other differences in DPA1 or DPB1 allele frequencies were detected between patient and control groups. Furthermore, no association was observed between any class II allele identified in the HT patients with the measurable presence of microsome-, thyroglobulin-, gastric-, or pancreatic islet cell-specific antibodies also detected in these patients (data not shown).

Previous genetic evidence derived from Southern blot analysis of the DR and DQ gene loci has led to the notion that the DQB1*0301 (DQw7) allele is a class II susceptibility determinant in Hashimoto's thyroiditis (8). Using DQB1-specific PCR and SSO analysis, we have been able to confirm this association in 22 of the London patients used in the

Table 1. Phenotype (PF) and gene frequency (GF) of DQA1 and DQB1 alleles in HT patients and controls

	Patients (n=48)		Controls (n=59)	
	PF %	GF	PF %	GF
DQA1*0101	25.0	0.135	22.0	0.119
*0102	20.8	0.115	35.6	0.178
*0103	8.3	0.042	15.3	0.076
*0201	18.8	0.094	25.4	0.136
*0301/2 ^a	50.0 ^{ab}	0.271	30.5	0.169
*03012	-	-	1.7	0.008
*0401	4.2	0.021	3.4	0.017
*0501	58.3	0.313	45.8	0.297
*0601	2.1	0.010	-	-

	Patients (n=47)		Controls (n=50)	
	PF %	GF	PF %	GF
DQB1*0201	38.3	0.223	50.0	0.330
*0301	59.6 ^{cd}	0.362 ^{cd}	24.0	0.130
*0302	10.6	0.053	14.0	0.070
*03032	6.4	0.043	8.0	0.040
*0402	6.4	0.032	2.0	0.010
*0501	17.0	0.096	18.0	0.120
*0502	2.1	0.011	4.0	0.020
*05031	6.4	0.032	-	-
*0601	2.1	0.011	-	-
*0602	12.8 ^{de}	0.074 ^f	32.0	0.180
*0603	4.3	0.032	14.0	0.020
*0604	2.1	0.011	4.0	0.020
*0605	4.3	0.021	2.0	0.010

^a Phenotype and genotype frequencies associated with HT when compared to controls. ^b chi square=4.21, $p < 0.05$. ^c chi square=12.7, $p = 4.0 \times 10^{-4}$ ($p = 6.0 \times 10^{-3}$ corrected). ^d chi square=14.2, $p = 2.0 \times 10^{-4}$ ($p = 3.0 \times 10^{-3}$ corrected). ^e chi square=5.1, $p = 2.4 \times 10^{-2}$. ^f chi square=4.8, $p = 2.8 \times 10^{-2}$. Statistical analysis was performed using the chi square test, with Yates correction applied when necessary. p values have not been corrected where significance has been reported previously. ^g 11WS SSO hybridization protocol does not distinguish between DQA1*03011 and DQA1*0302 alleles, which in this study have been given the DQA1*0301/2 designation.

Table 2.

The presence of DQA1*0301/2 and DQB1*0301 haplotypes in HT patients and controls

DQA1*0301/2	DQB1*0301	Patients n=46 (%)	Controls (n=47 (%))
+	+	18 (39) [*]	3 (6) [*]
+	-	5 (11)	10 (21)
-	+	14 (30)	9 (19)
-	-	19 (41)	25 (53)

^{*} Chi square=12.45, $p < 0.0005$ (Yates correction). The numbers refer to the presence or absence of the alleles in the individual - one patient was homozygous for DQA1*0301/2, DQB1*0301.

Table 3.
Phenotype (PF) and gene frequencies (GF) of DQA1 and DPB1 alleles in HT patients and controls

	Patients (n=47)		Controls (n=61)	
	PF %	GF	PF %	GF
DQA1*0101/2/3+	97.9	0.809	96.7	0.803
*0201	36.2	0.191	36.1	0.197

	Patients (n=49)		Controls (n=62)	
	PF %	GF	PF %	GF
DPB1*0101	6.1 ^a	0.031	14.5	0.081
*0201	12.2 ^{ab}	0.061 ^{ac}	30.6	0.153
*0202	4.1	0.020	-	-
*0301	14.3	0.071	16.1	0.081
*0401	73.5	0.531	71.0	0.435
*0402	28.6	0.143	21.0	0.105
*0501	-	-	4.8	0.024
*0601	2.0	0.010	1.6	0.008
*0901	-	-	4.8	0.024
*1001	4.1	0.020	1.6	0.008
*1101	8.2	0.051	6.5	0.032
*1301	4.1	0.020	1.6	0.008
*1431	2.0	0.010	1.6	0.008
*1501	2.0	0.010	3.2	0.016
*1701	4.1	0.020	1.6	0.008
*1801	-	-	1.6	0.008

^a Allele negatively associated with HT when compared to controls. ^b chi square=4.3, $p=3.8 \times 10^{-2}$ (not significant after correction). ^c chi square=3.8, $p>0.05$. +11WS protocol does not distinguish between the DQA1*0101, *102 and *0103 alleles.

study of Badenhop et al. (8), in addition to 25 caucasoid patients also recruited in London. DQB1*0301 was also increased in a group of HT patients in Newfoundland (12). Preliminary analysis of class II allele frequencies in non-caucasoid HT patients and controls has revealed an apparent reduction of DQB1*0602 in Japanese patients (9). This was also evident in our analysis of caucasoid patients (Table 1), indicating that DQB1*0602 may confer some degree of protection against disease in two distinct ethnic groups. The data from our control panel does not suggest that DQB1*0602 and DPB1*0201 (see above) are in linkage disequilibrium. Of the 16 controls who are DQB1*0602, 5 (31%) were DPB1*0201, similar to the overall frequency of DPB1*0201 in the controls, i.e., 19/62 (31%). We now extend these observations to include a role for the DQB heterodimer composed of the products of the DQA1*0301/2 and DQB1*0301 genes in the pathology of HT in some patients (Table 2). There are, in contrast, alternative studies with caucasoid HT patients that have revealed disease associations with the DQB1*0201 allele (12, 13). Such apparent discrepancies have been reconciled by Farid (14), who has postulated

the development HT to be influenced by numerous gene loci, with a variety of environmental factors differing between locales, initiating disease in different populations at risk.

Together with previous analysis of the DR and DQ loci in HT patients (8, 12, 13), our analysis of both the DQ and DP region would confirm that the class II association with HT is with the products of the DQ and not the DP locus.

Comparison of the first protein domain amino acid sequence of all known DQB1 alleles (15) reveals that DQB1*0301 encodes a unique negatively charged glutamic acid at position 45. According to the model of the class II antigen-binding cleft (16), DQB1 position 45 is located on a loop of the beta-pleated sheet outside of the presumed peptide-binding regions. However, DQB1 position 45 is part of a hydrophobic cluster and the presence of a charged glutamic acid in this position might disrupt the cluster. The observation that a glutamic acid at DQB1 position 45 can functionally influence recognition by allo-reactive T-cell clones has led to suggestions that this position probably effects the overall configuration of the DQ molecule (17), which in turn may play a role in the immunological mechanisms underlying the development of autoimmune disease in some HT patients.

In summary, the DQB1*0301, DQA1*0301/2 alleles and the DQA1*0301/2, DQB1*0301 haplotype were significantly increased in the HT patients compared to the controls, whereas DQB1*0602 was significantly decreased. Our results indicated that the class II association with HT is with the products of the DQ locus, especially with certain DQ heterodimers, and that a glutamic acid at DQB1 position 45 may play a role in the immunological mechanisms in some HT patients.

Acknowledgments

We are gratefully indebted to Dr. R. Mirakian, W. Moore and A. Miles for assistance in sample collection, and Mrs. M. Sanchez for typing the manuscript. We also wish to thank Drs. E. A. M. Gale (St Bartholomew's Hospital) and J. M. Garcia (London Hospital) for helpful discussions, as well as Professor E. Thorsby (National Hospital, Oslo) for communicating unpublished observations. ZW is in receipt of an Overseas Research Student Award.

References

- Todd J, Acha-Orbea H, Bell JI, et al. A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity. *Science* 1988; 240: 1003-1009.
- Rapoport B. Pathophysiology of Hashimoto's thyroiditis and hypothyroidism. *Ann Rev Med* 1991; 42: 91-96.

3. Walfish PG, Farid NR. The immunogenetic basis of autoimmune thyroid diseases. In: Walfish PG, Wall JR, Volpe R, eds. *Autoimmunity and the thyroid*. Orlando, San Diego, New York, London, Toronto, Sydney, Tokyo: Academic Press, 1985: 9-36.
4. Tamai H, Uno H, Hirota Y, et al. Immunogenetics of Hashimoto's and Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60: 62-66.
5. Farid NR. Immunogenetics of autoimmune thyroid disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1987; 16: 229-245.
6. Hawkins BR, Lam KSL, Ma JTC, Wag C, Yeung RTT. Strong association between HLA DRw9 and Hashimoto's thyroiditis in southern Chinese. *Acta Endocrinol (Copenh.)* 1987; 114: 543-546.
7. Honda k, Tamai H, Morita T, Kuma K, Nishimura Y, Sasazuki T. Hashimoto's thyroiditis and HLA in Japanese. *J Endocrinol Metab* 1989; 69: 1268-1273.
8. Badenhoop K, Schwartz G, Walfish PG, Drummond V, Usadel KH, Bottazzo GF. Susceptibility to thyroid autoimmune disease: molecular analysis of HLA-D region genes identifies new markers for goitrous Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 1131-1137.
9. Tamai H, Kimura A, Mukuta T, et al. HLA DQ genotypes in autoimmune thyroid diseases. *Thyroid* 1991; 1: (Suppl. 1), 30 (Abstr).
10. Magzoub MMA, Stephens HAF, Sachs JA, et al. HLA-DP polymorphism in Sudanese controls and patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Tissue Antigens* 1992; 40: 64-68.
11. Garcia-Pacheco JM, Herbut B, Cutbush S, et al. Distribution of HLA-DQA1, -DQB1 and DRB1 alleles in black IDDM patients and controls from Zimbabwe. *Tissue Antigens* 1992; 40: 145-149.
12. Shi Y, Zou M, Robb D, Farid NR. Typing for MHC class II antigens in thyroid tissue blocks: Association of Hashimoto's thyroiditis with HLA-DQA1*0301 and *DQB1*0201 alleles. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 943-946.
13. Tandon N, Zhang L, Wheatman AP. HLA associations with Hashimoto's thyroiditis. *Clin Endocrinol* 1991; 34: 383-386.
14. Farid NR. Are the immune response to endocrine autoantigens genetically restricted? *Autoimmunity* 1989; 3: 47.
15. Bodmer JG, Albert ED, Bodmer WF, et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1990. *Immunogenetics* 1991; 33: 301-309.
16. Brown JH, Jardetzky T, Saper MA, Samraoui B, Bjorkman PI, Wiley DC. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988; 332: 845-850.
17. Gjertsen HA, Lundin KEA, Kwok WW, Nepom GT, Thorsby E. Allorecognition of HLA-DQw8 molecules: Influence of single amino acid substitutions. *Tissue Antigens* 1992; 39: 95-98.

Address:

Professor G. F. Bottazzo
 Department of Immunology
 The London Hospital Medical College
 56-76 Ashfield Street
 London
 E1 2AJ, UK
 FAX: 071-790-3033



PROCEEDING
EDITOR

Sequence-specific oligonucleotide typing in Shona patients with rheumatoid arthritis and healthy controls from Zimbabwe

S. Cutbush, I. C. Chikanza, P. A. Biro, C. Bekker, M. Stein, S. Lutalo, J. M. Garcia-Pacheco, D. S. McCloskey, J. S. Lanchbury, J. A. Sachs.
Sequence-specific oligonucleotide typing in Shona patients with rheumatoid arthritis and healthy controls from Zimbabwe.
Tissue Antigens 1993; 41: 169-172. © Munksgaard, 1993

Abstract: Seventy-two patients with rheumatoid arthritis (RA) and 82 controls have been typed with the XI Histocompatibility Workshop DRB1 and DQB1 sequence-specific oligonucleotide probes. The increase of DRB1*04 corresponds to an increase of the serologically defined DR4, previously found in a small group of Zimbabwean RA patients and we now show that this increase is due to the subtype DRB1*0405 in association with DQB1*0302. In addition there is a clearcut increase of DRB1*1001 equivalent to the serologically defined DR10. There was no increase amongst RA patients of DRB1*0102 which was the predominant DR1 sub-type amongst controls. In the course of our investigation, we observed a DRB1*04 variant which corresponds to DRB1*0412, newly defined in the XIth Histocompatibility Workshop.

S. Cutbush¹, I. C. Chikanza²,
P. A. Biro¹, C. Bekker¹, M. Stein²,
S. Lutalo², J. M. Garcia-Pacheco¹,
D. S. McCloskey¹, J. S. Lanchbury²
and J. A. Sachs¹

¹Dept. of Immunology, The London Hospital Medical College, London, ²Rheumatology Unit, Division of Medicine, UMDS Guys Hospital, London, U.K., ³Department of Pharmacology, Medical School, Harare, Zimbabwe

Key words: RA - SSOs - Shona

Received 27 August, revised, accepted for publication 14 December 1992

Introduction

The association of RA with HLA DR4 is now well-established in most population groups whereas its association with DR1 and DR10 is more variable. By the use of HLA-Dw cellular typing, RFLP analysis and oligonucleotide typing with sequence-specific probes in Caucasoid populations it has been established that the DRB1*0401, *0404 and *0405 subtypes are RA susceptibility alleles whereas DRB1*0402 and *0403 are not (1, 2, 3, 4). Several reports on Black RA patients from Southern Africa have indicated that the serologically defined DR4 alone is increased. In the Zulu population of Natal (5), DR4 is present in 44% of RA patients compared to 10% controls. In small samples from two other ethnic groups, the Sotho from the Transvaal (6) and the Xhosa from the Cape (7), DR4 was also increased: 56% vs 9% and 38% vs 13% respectively. The Shona populate an area of Southern Africa made up of the central and northern parts of Zimbabwe. In a preliminary study (8), a low frequency of DR4 was found in

the controls similar to that in the other three ethnic groups. In none of these was DR1 and/or DR10 significantly increased.

One function of HLA Class II molecules is to present antigen to T-cell receptors by means of peptides bound in the groove formed by the DRA and DRB chains. According to the shared epitope hypothesis, polymorphism of amino acid residues 70, 71 and 86 of the 3rd hypervariable region determines susceptibility or resistance to RA (9, 4). Thus in DRB1*0402 which does not appear to confer susceptibility to RA, aspartic acid and glutamic acid substitute for the neutral glutamine and basic lysine found at positions 70/71 of the DRB1*0401 which confers susceptibility to RA. Little is known about the association of the DRB1*01 subtypes with RA susceptibility.

Recently, in the XI International Histocompatibility Workshop sequence-specific oligonucleotides were used to determine DRB1 polymorphisms as well as inter alia the DRB1*01 and DRB1*04 subtypes in different ethnic populations. In this study we present the distribution of the

DRB1 and DQB1 polymorphisms as well as the DRB1*01 and DRB1*04 subtypes in a substantial group of RA Shona patients from Zimbabwe and compare them with a healthy control group (which formed part of the XI Histocompatibility Workshop).

Materials and Methods

Seventy-two Zimbabwean Shona patients with classical or definite RA and 82 Shona controls were studied. Blood samples from the patients anticoagulated with EDTA were shipped to the UK in dry ice whereas lymphocytes were a source of DNA from controls. The method of DNA extraction and sequence-specific oligotyping were similar to those applied to the Workshop and have been described in detail (10).

Statistics

The presence or absence of a particular polymorphism in each individual was counted. Comparisons were tested by 2 x 2 Contingency Tables and where appropriate Yates correction was applied. The *p* values were not corrected for the number of comparisons since associations were consistent with those found previously in other populations.

Results

DRB1 distribution in RA patients and controls

The frequencies of the DRB1 polymorphisms using the DRB1 generic primers and probes are given in Table 1. DRB1*04 and DRB1*1001 were significantly increased in the RA patient compared to controls (29% vs 4% *p* < 0.001; 19% vs 2% *p* < 0.002) while DRB1*01 was not (16% in RA patients vs 17% in controls). No patients or control had both DRB1*04 and DRB1*1001 so that 48% of the patients had one or the other, compared to 7% of controls (*p* < 0.001). No DRB1 allele was significantly decreased in the RA group. The subtypes of DRB1*01 and DRB1*04 were determined using appropriate primers and probes of the XIth Histocompatibility Workshop.

DRB1*01 subtypes

Of the 14 DRB1*01 controls, 9 were DRB1*0102 and 5 could not be tested. Of the 12 DRB1*01 patients with RA, 7 were DRB1*0102, 2 were *0101, 1 was *0103 and 2 could not be tested. The 7 DRB1*01 individuals were not subtyped as their DNA failed to amplify with the primers in the PCR.

Table 1.
Distribution of DRB1 oligotypes in RA patients and controls

DRB1*	RA n=69 (%)	Controls n=82 (%)
01	12 (17)	14 (17)
0101	2 (3)	0 (0)
0102	7 (10)	9 (11)
0103	1 (1)	0 (0)
No result†	2 (2)	5 (7)
02	12 (17)	21 (26)
03	9 (13)	
0301	6 (7)	13 (16)
0302	3 (4)	9 (11)
04	20 (29)	3 (4)‡
0401	1 (1)	0 (0)
0405	15 (22)	3 (4)*
0412	2 (2)	0 (0)
No result	2 (2)	0 (0)
11	21 (30)	33 (40)
12	12 (16)	5 (7)
13	12 (17)	16 (19)
14	0	0
07	3 (4)	12 (15)
08	5 (7)	10 (12)
09	3 (4)	0 (0)
1001	13 (19)	2 (2)*
04 or 10	33 (48)	5 (7)‡

RA vs Controls **p* < 0.002.

‡*p* < 0.001.

† No PCR amplification.

Table 2.
Critical 3rd hypervariable region residues for DRB1*0412

Allele	SSO*		Residues†		
	5	7			
	7	0			
	0	0	57	71	74
	2	6			
DRB1*0403	-	+	D	R	E
DRB1*0405	+	-	S	R	A
DRB1*0412	+	+	S	R	E

* SSO = sequence-specific oligonucleotide probe.

† DRB1 amino acid residue.

DRB1*04 subtypes

The subtype of all 3 DRB1*04 controls was DRB1*0405 and 15/20 DRB1*04 RA patients were also DRB1*0405; the DNA from 2 did not amplify with the primers and 1 was DRB1*0401. The remaining 2 gave an unusual pattern in that they reacted with probe 5702 that defined DRB1*0405 as well as with probe 7006 that defined DRB1*0403. The second DRB1 allele in one individual was *0302 and in the other was *0200. Based

Table 3.
Distribution of DQB1 oligotypes in RA patients and controls

DQB1	RA n=66 (%)	Controls n=82 (%)
0201	11 (17)	23 (28)
0301	16 (24)	17 (21)
0302	15 (23)	3 (4)†
0401	0	0
0402	8 (12)	9 (11)
0501	28 (42)	32 (39)
0602	13 (20)	40 (49)‡
0603	3 (4)	9 (11)
0604	3 (5)	3 (4)
0605	2 (3)	2 (2)

RA vs Controls †p=0.001.
‡p=0.0005.

Table 4.
Distribution of selected assumed haplotypes in RA patients and controls

DRB1-DQB1	RA n=64 (%)	Controls n=67 (%)
01-0501	7 (11)	10 (15)
02-0602	9 (14)	20 (30)†
04-0302	15 (23)	3 (4)††
11-0301	11 (17)	14 (21)
10-0501	12 (19)	2 (3)‡
11-0602	3 (5)	15 (22)‡

RA vs Controls †p<0.05.
‡p<0.01.
††p<0.005.

on its reactivity with the two probes, the sequence of this oligotype would correspond to serine at position 57, arginine at position 71 and glutamic acid at position 74 (Table 2).

DQB1 polymorphism in RA patients and controls

The distribution of the DQB1 polymorphisms in RA patients and controls is given in Table 3. DQB1*0302 is increased in the patient group (23% vs 4% p=0.001) whereas DQB1*0602 is decreased (20% vs 49%, p<0.005). The DRB1-DQB1 associations based on previously established population and family segregation studies are given in Table 4. DRB1*0405 was associated with DRB1*0302 in all 3 controls and 12/15 RA patients whose DRB1*04 subtype had been defined. Five (25%) of the 20 patients with DRB1*04 associated with DQB1*0301 of which 4 were DRB1*0405 and the other could not be determined.

Discussion

We have found a highly significant increase in the frequency of the *0405 subtype of DRB1*04 and of DRB1*1001 in Shona RA patients when com-

pared to a control population. No increase in DRB1*01 was demonstrated. In a previous small sample only the serological equivalent of DRB1*04 was increased (8). The increase of DRB1*0405 indicates that this subtype in the Zimbabwean Black population is also an RA susceptibility allele as has been shown for Mediterranean (11, 12) and Japanese (13) RA patients. In the Zimbabwean population DRB1*0405 associates with DQB1*0302 implying linkage disequilibrium between the two alleles. Similar findings have been reported in English (14) and Spanish (15) populations but the DRB1*0405-DQB1*0302 haplotypes differ at DQ from the DRB1*0405-DQB1*0401 haplotype found in the Japanese (13).

We have also identified the DRB1*04 subtype *0412 newly defined in the XIst Histocompatibility workshop based on the presence of a serine at position 57 (identified by probe 7002) and a glutamic acid at position 74 (probe 7006) (16). Since only 2 patients and no controls possessed this oligotype its clinical significance in RA susceptibility cannot yet be assessed.

Acknowledgements

We wish to thank the Arthritis and Rheumatism Council (SC), for financial support and Mr Richard Brown who helped in collecting samples from the controls. JMP-G was supported by a Fellowship from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain and CB was supported by World University Service (UK).

References

- Zoschke D, Segall M. Dw subtypes of DR4 in rheumatoid arthritis: Evidence for a preferential association with Dw4. *Human Immunology* 1986; 15: 118-24.
- Wordsworth BP, Lanchbury JSS, Sakkas LI, Welsh KI, Panayi GS, Bell JI. HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA Class II region. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 10049-53.
- Nepom GT, Byers P, Seyfried C, et al. HLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 15-21.
- Gao X, Olsen NJ, Pincus T, Stastny P. HLA-DR alleles with naturally occurring amino acid substitutions and risk for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 939-46.
- Mody GM, Hammond MG, Naidoo PD. HLA associations with rheumatoid arthritis in African blacks. *J Rheum* 1989; 16: 1326-8.
- Pile KD, Tikly M, Wordsworth BP. HLA-DR association with rheumatoid arthritis in three black South African groups: A study of ethnic groups. *Br J Rheumatology* 1992; 31: suppl. 1: 12.

7. Martell LW, DuToit ED, Lalla AA, Meyers OL. Association of rheumatoid arthritis with HLA in three South African populations - whites, blacks and a population of mixed ancestry. *SAMJ* 1989; 76: 189-90.
8. Martell LW, Stein M, Davis P, West G, Emmanuel E, DuToit ED. The association between HLA and rheumatoid arthritis in Zimbabwean blacks. *Tissue Antigens* 1990; 36: 125-6.
9. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1205-13.
10. Garcia-Pacheco JM, Herbut B, Cutbush S, et al. The distribution of HLA-DQA1, DQB1 and DRB1 alleles in black IDDM patients and control from Zimbabwe. *Tissue Antigens* 1992; 40: 145-9.
11. Boki KA, Vaughan RW, Drosos AA, Moutsopoulos HM, Panayi GS, Lanchbury JS. HLA class II sequence polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis in Greeks. The HLA DR β shared-epitope hypothesis accounts for the disease in a minority of Greek patients. *Arthritis Rheum* 1992; 35: 749-55.
12. Gao X, Brautbar C, Gazit E, et al. A variant of HLA-DR4 determines susceptibility to rheumatoid arthritis in a subset of Israeli Jews. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 547-51.
13. Watanabe Y, Tokunga K, Matsuki K, et al. Putative amino acid sequence of HLA-DRB chain contributing to rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1989; 169: 2263-8.
14. Lanchbury JSS, Hall MA, Welsh KI, Panayi GS. Sequence Analysis of HLA-DRB1 Subtypes: Additional First Domain Variability is Detected by Oligonucleotide Hybridization and Nucleotide Sequencing. *Human Immunol* 1990; 27: 136-44.
15. Sanchez B, Moreno I, Magarino M, et al. HLA-DRW10 confers the highest susceptibility to rheumatoid arthritis in a Spanish population. *Tissue Antigens* 1990; 36: 174-6.
16. Stastny P, Kimura A. DNA typing analysis of the DR4 group 1991. Oxford: Oxford University Press, 1992: 465-9.

Address:

Dr. J. A. Sachs
Research Laboratories
Department of Immunology
The London Hospital Med. Col
56 Ashfield Street
London E1 2AD London UK