

11281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE MEDICINA

Polimorfismos de genes clase II (HLA-DRB1 y DQB1) y de genes de clase III (TNF-alfa y HSP-70) del complejo principal de histocompatibilidad en pacientes mestizos mexicanos con artritis reumatoide.

T E S I S

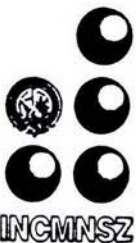
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :

JORGE ALBERTO RUIZ MORALES

TUTOR: DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA



2005

m 343363



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS.

Primeramente quiero agradecer a Dios por contar siempre con su bendición.

A la memoria de mi padre Primitivo Ruiz Villanueva y de mis abuelos Jesús Morales Núñez y María de Jesús Orozco Suárez.

A las dos personas más importantes en mi vida, mi madre María del Carmen Morales Orozco y mi abuela Amelia Villanueva Vargas, por brindarme todo su amor y apoyo incondicional.

A mis hermanos Patricia y José Manuel, por su cariño y apoyo en todo momento.

A mis sobrinos: Mayra Ivonne, Fernanda, Adrián y Diana, por alegrar mi vida con cada momento maravilloso compartido. Los AMO.

A mis tíos Martín Eduardo, Jesús y Anita Morales Orozco, por contar con ellos en todo momento

Al Dr. Julio Granados Arriola,
por permitirme realizar el Doctorado bajo su tutoría,
por su amistad , tolerancia y enseñanzas.

A los Drs. Pedro O. Flores Villanueva, Mario H. Cardiel Ríos
y Gilberto Vargas Alarcón,
por su amistad y apoyo.

A mis amigos: Eusebio Sánchez, Manuel Torres,
Marcos Galván, Alfonso Ramos, Gabriela Ponce,
Beatriz Ponce, Claudia de Leo,
José Manuel Rodríguez y Nonanzit Pérez,
por brindarme su amistad.

A los Drs. Fabio Salamanca Gómez,
Edgar Zenteno Galindo,
Luis Enrique Eguiarte Fruns,
Luis Llorente Peters,
Marco Antonio Cerbon Cervantes
y Emilio Rojas del Castillo,
por revisar la tesis.

INDICE	Pagina
1. RESUMEN EN ESPAÑOL.....	5
2. RESUMEN EN INGLES.....	8
3. INTRODUCCIÓN.....	10
a. Región del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC).....	10
a.1 Organización genómica del MHC.....	10
a.2 Inmunobiología de las moléculas HLA clase I y II.....	14
a.3 Mecanismos de susceptibilidad a enfermedad y MHC.....	18
a.4 Artritis reumatoide y susceptibilidad genética.....	20
a.5 Población de mestizos mexicanos.....	25
4. JUSTIFICACIÓN.....	30
5. HIPÓTESIS.....	32
6. OBJETIVOS.....	33
7. MATERIALES Y METODOS.....	34
8. RESULTADOS.....	39
a. Características demográficas y clínicas.....	39
b. Asociación del locus HLA-DRB1 con susceptibilidad a desarrollar artritis reumatoide.....	39
c. Protección del locus HLA-DRB1 para el desarrollo AR.....	49
d. HLA-DQB1 y susceptibilidad al desarrollo de artritis reumatoide.....	51
e. La asociación de susceptibilidad de los loci HLA-DRB1 y DQB1 para el desarrollo de AR es independiente.....	56
f. HLA-DQB1 y características clínicas.....	60
g. Región de clase III del complejo principal de histocompatibilidad y su asociación con artritis reumatoide.....	62
9. DISCUSIÓN.....	66
10. CONCLUSIONES.....	76
11. BIBLIOGRAFÍA.....	78
ANEXO 1. Criterios para la clasificación de la AR de 1987.....	95
ANEXO 2. Técnicas.....	96

ANEXO 3. Pruebas estadísticas.....	102
ANEXO 4. Artículo publicado.....	106

1. RESUMEN EN ESPAÑOL.

Introducción.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune de origen multifactorial, donde intervienen factores ambientales y genéticos. La región *clase II* del MHC, es la región que más se ha asociado con riesgo a desarrollar AR, dentro de esta región el locus HLA-DRB1 es el más importante. Varios alelos del locus HLA-DRB1 se han asociado con riesgo para desarrollar AR. Sin embargo, el alelo asociado varía de acuerdo al grupo étnico estudiado. Los alelos asociados comparten una secuencia de aminoácidos, localizada en la cadena polipeptídica DRB1 de la molécula HLA-DR, ésta secuencia es conocida como "epitope compartido" (EC). Adicionalmente, el locus HLA-DQB1 (*clase II*) y los loci TNF- α y HSP-70 *hom* (*clase III*) se han asociado con AR. En el presente trabajo, se investigó la asociación de los genes HLA-DRB1, DQB1, TNF- α (-238, -308) y HSP-70 *hom* con riesgo a desarrollar artritis reumatoide en una población de mestizos mexicanos.

MATERIALES Y METODOS.

Se incluyeron 84 pacientes mestizos mexicanos no relacionados con AR y 99 controles sanos. Se analizaron variables demográficas, clínicas, el índice HAQ (que evalúa capacidad funcional), y el índice DAS (que evalúa actividad de la enfermedad). Se obtuvieron leucocitos de sangre periférica para la obtención de ADN. La tipificación genérica del locus HLA-DRB1 y de DQB1 se realizó por PCR-SSO, y la tipificación por alta resolución de los diferentes alelos HLA-DRB1 se realizó por PCR-SSP. Para la tipificación de los polimorfismos en los genes TNF- α (-238 y -308) y HSP-70 *hom*, se

utilizó PCR-RFLP. El análisis de los datos se realizó con el software STATA7 y con el software para análisis genéticos Alerquin v 1.1.

RESULTADOS.

Se detectó un incremento en la proporción de pacientes con AR que presentaron por lo menos un alelo HLA-DRB1 que codifica para el epítipo compartido ($p_c = 0.0002$, $RM = 4.1$ IC 95% = 2.2 – 7.7). El alelo HLA-DRB1*0404 fue el más frecuente dentro de los alelos que codifican para el epítipo compartido ($p_c = 0.006$, $RM = 4.02$, IC95% = 1.76 – 9.99). Adicionalmente, la proporción de pacientes con AR que presento por lo menos un alelo HLA-DRB1 que codifica para el EC fue mayor entre el grupo de pacientes con niveles elevados de FR ($p = 0.005$). Por otro lado, la proporción de individuos con al menos un alelo HLA-DRB1 que codifican para ácido aspártico en la posición β (D^{70+}), se encontró disminuida en los pacientes vs controles ($p_c = 0.001$, $RM = 0.4$, IC 95% = 0.2 – 0.7). Además, se detectó un incremento en la frecuencia del HLA-QB1*0302 entre los pacientes con AR vs. controles ($p_c = 0.03$, $RM = 1.97$, IC 95% = 1.23 – 3.17), y se asoció con inicio de la enfermedad a más temprana edad. El alelo HLA-DRB1*0404 se encontró en desequilibrio de unión con el alelo HLA-DQB1*0302, y la frecuencia de éste haplotipo fue mayor en los pacientes vs controles ($p_c = 0.006$, $RM = 4.2$, IC 95 % = 1.85 – 10.45). El análisis de Mantel-Haenszel, reveló que la asociación del locus HLA-DRB1 es independiente de la asociación del locus HLA-DQB1. El alelo TNF238A se asoció con los valores más bajos del índice de actividad DAS.

CONCLUSIONES.

Los alelos HLA-DRB1 que codifican para el EC se asocian con riesgo para desarrollar AR, el alelo más frecuente fue el HLA-DRB1*0404. Adicionalmente, el alelo HLA-DQB1*0302

se asocia con riesgo a desarrollar AR. La asociación del locus HLA-DRB1 y del locus DQB1 es independiente, y afectan diferentes características clínicas. Por otro lado, existe un efecto protector para el desarrollo de AR de los alelos que codifican para el D⁷⁰⁺.

2. RESUMEN EN INGLES.

INTRODUCTION.

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease of multifactorial etiology, but in this disease both genetic and environmental factors play an important role in its pathogenesis. The best-studied genetic association in RA is that of the major histocompatibility complex (MHC) *class II* alleles. Several alleles of the HLA-DRB1 locus (*class II*) have been associated with the predisposition to develop RA; however, the associated allele varies among different ethnic group. All of these alleles share a common sequence of amino acids of the DRB1 polypeptide chain of the HLA-DR molecule and, is called "shared epitope" (SE). Furthermore, the HLA-DQB1 locus (*MHC class II*), and *class III* loci (TNF- α , HSP-70 *hom*) have been associated with RA. In this study was tested the association of the genes HLA-DRB1, DQB1, TNF- α (-238, -308), and HSP-70 *hom* with risk to develop rheumatoid arthritis in mexican mestizo patients.

PATIENTS AND METHODS.

In the present study, were included 84 unrelated mexican mestizo patients with RA, and 99 unrelated controls. Demographic and clinical details were recorded, as well as functional capacity (HAQ questionnaire), and disease activity score (DAS). Genomic DNA was extracted from whole blood samples. Generic HLA typing was done by PCR-SSO, and high resolution typing was done by PCR-SSP. The polymorphisms TNF- α -238, -308, and HSP-70 *hom* were detected by PCR-RFLP. Data analysis was performed using both the STATA7 statistical package, and the Arlequin v 1.1. genetic software.

RESULTS.

In this study the proportion of individuals carrying at least one HLA-DRB1 allele encoding SE was significantly increased in RA cases as compared to controls ($p_c = 0.0002$, OR = 4.1, 95% CI = 2.2 – 7.7). The most frequently occurring allele was HLA-DRB1*0404 ($p_c = 0.006$, OR = 4.02, 95% CI = 1.76 – 9.99). Moreover, was observed a significantly increased proportion of HLA-DRB1 SE+ cases with RF titers above the median ($p = 0.005$). Conversely, the proportion of individuals carrying at least one HLA-DRB1 allele encoding the D⁷⁰⁺ was significantly decreased among RA patients compared with controls. ($p_c = 0.001$, OR = 0.4, 95% CI = 0.2 – 0.7). Additionally, the HLA-DQB1*0302 was associated with risk to develop RA ($p_c = 0.03$, OR =1.97, 95% CI = 1.23 – 3.17) and with younger disease onset. Linkage disequilibrium (LD) was detected between the alleles HLA-DRB1*0404 and DQB1*0302, and the haplotype HLA-DRB1*0404-DQB1*0302 was significantly increased in RA cases as compared to controls ($p_c = 0.006$, OR = 4.2, 95% CI = 1.85 – 10.45). The Mantel-Haenszel test showed that the association of HLA-DRB1 locus with RA was independently of the HLA-DQB1 locus. The TNF238A allele was associated with the lower DAS values. Neither the TNF- α -308 nor HSP-70 *hom* were associated with RA.

CONCLUSION.

The HLA-DRB1 alleles encoding the SE are associated with risk to develop RA, as well as the HLA-DQB1*0302. Both the HLA-DRB1 locus and the HLA-DQB1 locus are associated independently, and the effect of each locus on disease expression is different. On the other hand, the HLA-DRB1 alleles encoding the D⁷⁰⁺ are associated with protection to develop RA.

3. INTRODUCCIÓN

a. Región del Complejo Principal de Histocompatibilidad

a.1 Organización genómica del MHC.

El complejo principal de histocompatibilidad del ser humano (MHC, del inglés, Major Histocompatibility Complex) abarca aproximadamente 4 Mb (Megabases) de ADN (~0.1 % del genoma humano) y se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 en la banda 6p21.3. Mas de 220 genes han sido localizados en la región del MHC y aproximadamente el 10 % de éstos están relacionados con la respuesta inmune¹⁻³. El MHC se divide en tres regiones llamadas *clase I*, *clase II* y *clase III* (Figura 1).

Región de clase I. La región de *clase I* es telomérica y se extiende 2 Mb de ADN conteniendo 3 principales loci, los cuales son altamente polimórficos y codifican para las moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-C que se expresan en la mayoría de las células nucleadas. En la misma región se localizan otros tres genes llamados no clásicos de *clase I* que codifican para las moléculas HLA-E, HLA-F y HLA-G; son menos polimórficos y se expresan en un número limitado de células.

Las moléculas HLA *clase I* están formadas por una cadena α y una cadena β . El gen de la cadena α está formado por 6 o 7 exones. El exon 1 contiene la región 5' no traducida (5'UTR) del mRNA y codifica para la secuencia del péptido líder. Los exones 2, 3 y 4 codifican para tres dominios llamados $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, respectivamente (Figura 2)⁴; los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ contienen los sitios polimórficos de unión a los péptidos antigénicos, que son procesados y presentados por las células presentadoras de antígeno (CPA) y son llamados dominios de unión al péptido. El dominio $\alpha 3$ es conocido como dominio similar a la familia de las inmunoglobulinas. El exon 5 codifica para el péptido de conexión y para

la región transmembranal (Figura 2). El exon 6 codifica para la región citoplasmática y el exon 7 contiene la región 3' no traducida (3'UTR). El gen de la cadena β se localiza en el cromosoma 15 y codifica la β_2 -microglobulina (β_2m).

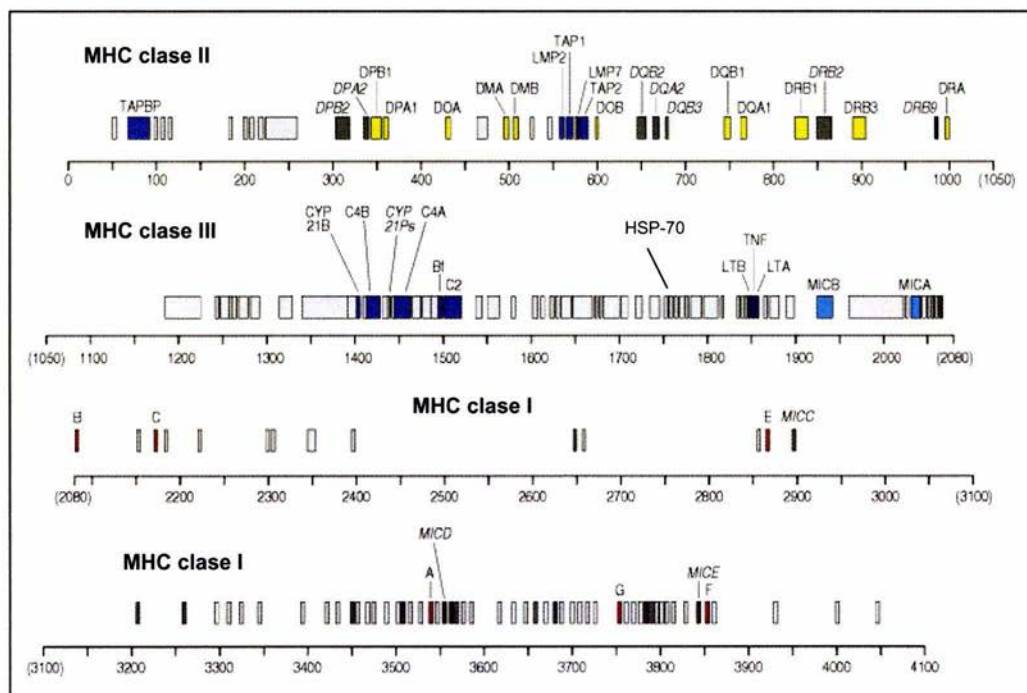


Figura 1. Mapa del MHC

Región clase II. La región de *clase II* es centromérica y se extiende 0.8 Mb. En esta región se localizan 5 loci que codifican para las siguientes moléculas de HLA: HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM y HLA-DO, así como otros 4 loci de genes que participan en el procesamiento de antígenos que son presentados por moléculas de clase I; éstos son los genes LMP2 y LMP7 que codifican para sub-unidades del proteosoma y los genes TAP1 y TAP2 que codifican para proteínas de la familia de los transportadores ABC. Las

moléculas de HLA clase II están formadas por 2 cadenas polipeptídicas α y β que se expresan en las células presentadoras de antígenos, las cadenas polipeptídicas son codificadas por dos genes diferentes HLA-DRB1 y HLA-DRA1, formados por 6 y 5 exones, respectivamente. El exon 1 de ambos genes contiene la región 5'UTR y codifica para el péptido señal; el exon 2 de cada gen codifica para el dominio $\alpha 1$ y $\beta 1$, este último formando la región polimórfica de las moléculas HLA-DR. En el caso de las moléculas HLA-DQ ambos dominios contribuyen al amplio polimorfismo de estas moléculas. El exon 3 codifica para el dominio similar a las inmunoglobulinas en ambas cadenas y el resto de los exones codifican para las regiones transmembranal, péptidos de conexión, cola citoplasmática, y la región 3'UTR se localiza en el último exon (Figura 3)⁴.

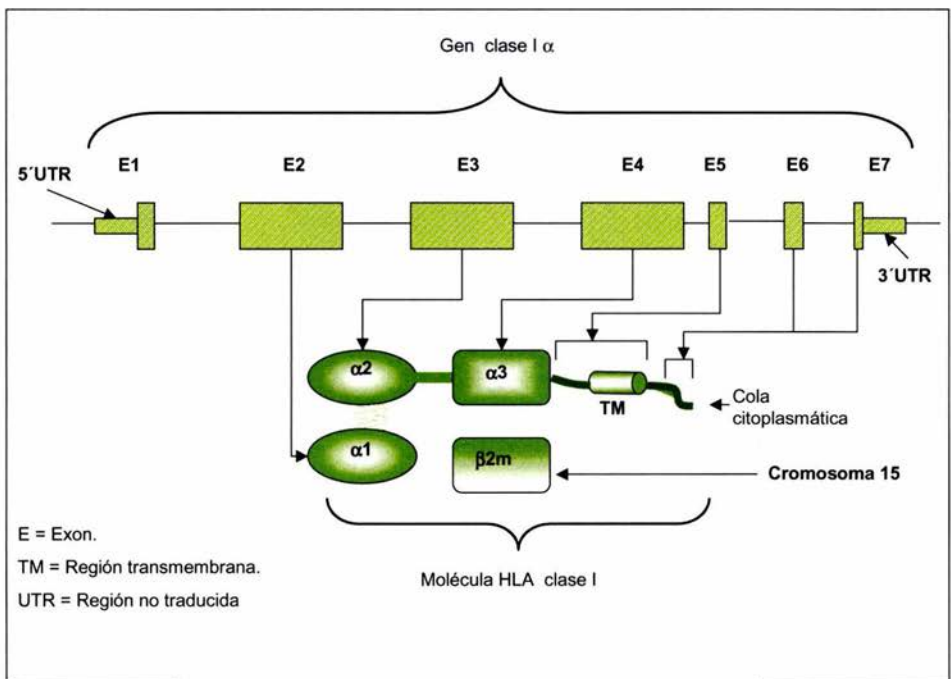


Figura 2. Relación de los exones 1 a 7 del gen clase I α con la molécula de HLA de clase I.

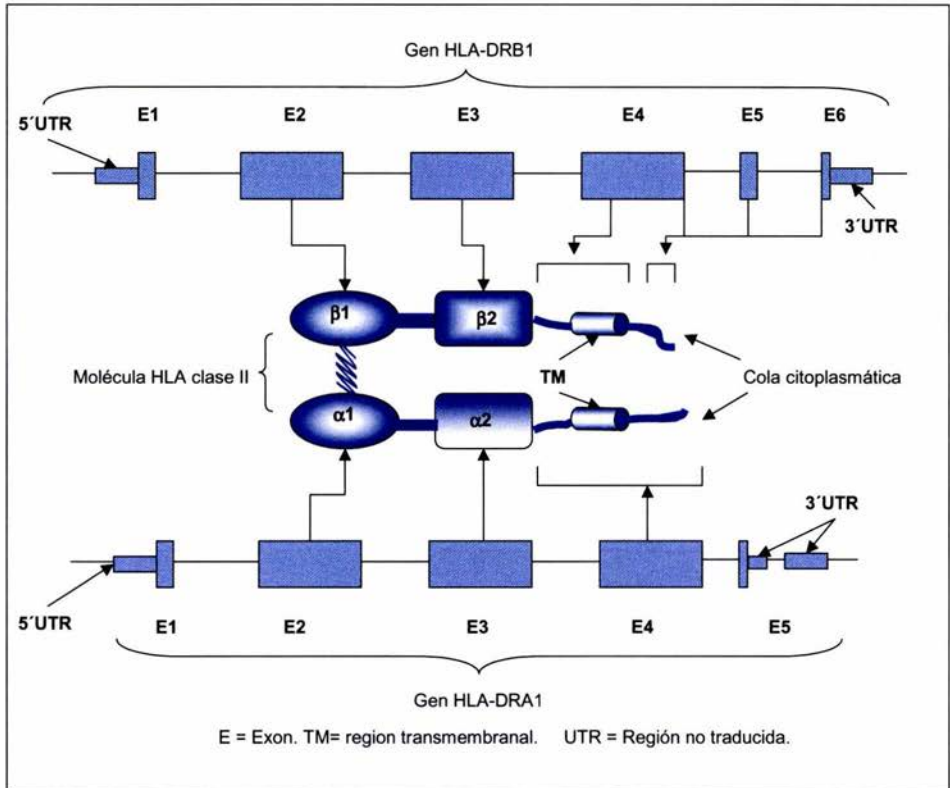


Figura 3. Relación de los exones E1 a E5 de los genes HLA-DRA1 y HLA-DRB1 con la molécula HLA-DR

Región de clase III. La región de *clase III* o región central abarca un segmento de aproximadamente 700 kb (kilobases) localizada entre la región de *clase I* y *II*; contiene más de 60 genes, por lo cual es considerada una de las regiones más densas del genoma humano. A diferencia de las regiones *clase I* y *clase II*, los genes de *clase III* no participan en la degradación y presentación de antígenos, pero sí contiene genes que participan en los procesos inflamatorios. Dentro de los genes de *clase III* que participan en la respuesta inflamatoria se encuentran los que codifican para proteínas que están

involucradas en la activación del complemento (*C2*, *factor B [FB]* y *C4*), el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), linfotóxina β , proteínas de choque térmico de 70 Kd (*HSP70-1*, *HSP70-2* y *HSP70-hom*), *Tenascin (TNX)* proteína relacionada con la organización de la matriz extracelular, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (*1C7*, *G6f*, y *G6b*), así como la enzima 21-hidroxilasa (*CYP21*) que participa en la síntesis de esteroides ¹⁻³.

a.2 Inmunobiología de las moléculas HLA clase I y clase II

Durante la respuesta inmune contra los patógenos, las moléculas HLA son importantes para distinguir si un antígeno durante su procesamiento viene del citosol (*clase I*) o de un compartimiento vesicular (*clase II*).

HLA clase I. Las moléculas HLA *clase I* presentan antígenos originados en el citosol. Los antígenos virales son el prototipo de antígenos presentados por HLA *clase I*. Durante la infección viral, el virus es detectado por un receptor en las células presentadoras de antígenos y es introducido por medio de endocitosis formándose la vesícula endocítica. Una vez que el virus está dentro del endosoma, el ADN viral es liberado de la cápside (cubierta proteica que protege el ADN viral) para ser liberado al citosol. Del citosol pasa al núcleo para integrarse al ADN del huésped, dando lugar a la replicación viral. Una vez insertado el ADN viral, se inicia la transcripción y síntesis de las proteínas virales en el citosol. Las proteínas virales del citosol son cortadas en péptidos por el complejo proteico llamado proteosoma del cual forman parte las moléculas de bajo peso molecular LMP2 y LMP7 (del inglés, Low Molecular Weight Proteins o Large Multifunctional Proteasés). Los péptidos originados en el proteosoma son transportados al retículo endoplásmico

rugoso (RER) por las moléculas llamadas transportadores, asociados con el procesamiento de antígenos TAP (del inglés, Transporters associated with Antigen Processing). Dentro del RER, los péptidos se unen a las recién formadas moléculas HLA clase I. Así, el péptido antigénico, unido a la molécula de HLA, sale de RER pasa a través del aparato de Golgi, para finalmente expresarse en la superficie de la CPA. La CPA presenta el antígeno al receptor de células T (TCR) de los linfocitos CD8⁺, dicho reconocimiento desencadena una respuesta citotóxica contra las células blanco^{6,7}.

HLA clase II. Las bacterias son el ejemplo de la clase de antígenos que son presentados por las moléculas de clase II. Los receptores extracelulares de las CPA reconocen las proteínas bacterianas y son interiorizadas, dando lugar a la formación del endosoma primario, el cual se fusiona con los lisosomas primarios del RER. Del lisosoma se liberan las enzimas líticas que degradan el péptido bacteriano, formándose el endosoma tardío. Las moléculas HLA clase II son sintetizadas en el RER, en el caso de HLA-DR, ésta se forma como un dímero formado por las cadenas α y β . A este dímero, dentro del RER, se le une otra cadena polipeptídica llamada cadena invariable (*Ii*) dando lugar a un trímero, el cual sale del RER y pasa al citoplasma a través del aparato de Golgi en un compartimiento especializado llamado MIIC (MIIC, del inglés MHC class II Compartment). La unión del endosoma tardío con MIIC favorece la degradación de la cadena invariable, quedando sólo un pequeño péptido unido al surco de unión al péptido de la molécula HLA-DR y recibe el nombre de péptido de la cadena invariable asociado a clase II (CLIP, del inglés Class II-associated invariant chain Peptide). En el RER se forma el dímero HLA-DM, el cual en el citoplasma se fusiona con MIIC; de esta forma, la molécula HLA-DM libera el CLIP de la molécula HLA-DR. La ausencia de CLIP favorece la unión

del péptido bacteriano al surco de unión al péptido de la molécula HLA-DR y posteriormente, el HLA-DR, con el péptido unido, es expresado por las células presentadoras de antígeno^{8,9}. Las moléculas de HLA *clase II* expresadas en las CPA presentan los antígenos al TCR de los linfocitos CD4⁺ para desencadenar una respuesta inmune contra los patógenos. La respuesta inmune puede ser de tipo Th1 o Th2, dependiendo de las características del complejo HLA-DR–antígeno–TCR¹⁰.

La respuesta inmune a los antígenos controlada por la región del MHC fue demostrada hace más de tres décadas^{11,12}. Se han postulado tres mecanismos que explican cómo la región del MHC participa en el control de la respuesta inmune:

(i) **Selección de péptidos por el MHC.** Este fenómeno está determinado principalmente por las características estructurales del surco de unión al péptido en la molécula HLA, lo que resalta la importancia de los polimorfismos en los genes HLA *clase I* y *II*, ya que las secuencias de los exones 2 y 3 de los genes HLA *clase I* determinan las características de los sitios de unión al péptido en las moléculas de HLA *clase I*, mientras que el exon 2 del gen HLA-DRB1 determina las características de los sitios de unión al péptido en las moléculas de *clase II* (Figuras 4a y 4b). Los sitios de unión a los péptidos en las moléculas HLA son conocidos como “pockets” (P)^{13,14}.

(ii) **Existencia de huecos en el repertorio de células T.** Este fenómeno postula que en la presencia de un haplotipo en particular, no existe TCR en las células CD4⁺ o CD8⁺ específico que puedan responder a cierto antígeno presentado por una molécula de HLA correspondiente a dicho haplotipo. Al no existir un TCR específico para un antígeno presentado por las moléculas de HLA durante la selección positiva y negativa de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en el timo, origina el escape clonal de células T autorreactivas¹⁵.

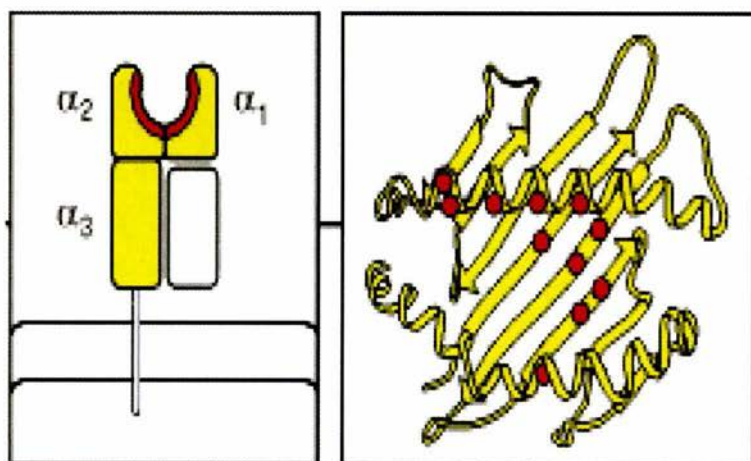


Figura 4a. Sitios de unión al péptido en las moléculas de clase I determinados por los dominios α_1 y α_2 .

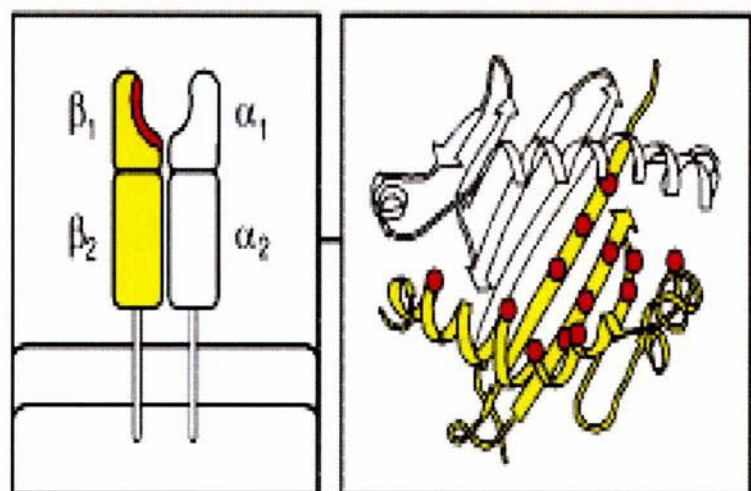


Figura 4b. Sitios de unión al péptido en las moléculas de clase II determinados por el dominio β_1 .

(iii) **Supresión de células T.** Las clonas de células T autorreactivas que escapan del timo se controlan en la periferia por varios mecanismos, como por ejemplo: apoptosis de

células T autorreactivas a través de la interacción Fas-FasL (ligando Fas) y anergia clonal de células T CD4⁺ y CD8⁺ autorreactivas. La existencia de células T supresoras es un mecanismo adicional para el control de células T autorreactivas en la periferia ^{16,17}; este mecanismo es básicamente debido a la presencia de un subgrupo de células CD8⁺. El subgrupo de células T CD8⁺ supresoras reconoce antígenos (exógenos o propios) presentados por moléculas HLA-E expresadas en CPA o CD4⁺, desencadenando un circuito de regulación entre células T CD8⁺ y CD4^{+18,19}.

a.3 Mecanismos de susceptibilidad a enfermedad y MHC.

Los mecanismos por los cuales el MHC influye en la susceptibilidad genética a las enfermedades, se pueden dividir en aquellos que están relacionados con las moléculas de HLA (presentación antigénica) y los asociados con genes no-HLA, es decir, con genes que codifican proteínas que participan durante el proceso inflamatorio y que básicamente son aquellos localizados en la región clase III del MHC. En la Tabla 1 se muestran algunas enfermedades autoinmunes que se han asociado con genes del MHC.

Moléculas HLA. Como ya se comentó, las moléculas de HLA *clase I* y *II* son altamente polimórficas, lo cual influye en el tipo de péptido que se une a una molécula de HLA en particular. Así por ejemplo, la diabetes mellitus tipo I se ha asociado con los alelos HLA-DQB1*0201 y*0302, estos alelos codifican para un polipéptido DQβ1 que comparte una secuencia en el sitio de unión al péptido y que la distingue de otros alelos DQB1 que no se asocian con diabetes mellitus tipo I ²⁰. La enfermedad de Goodpasture es otro ejemplo de cómo el polimorfismo influye en la susceptibilidad a la enfermedad; los alelos asociados con Goodpasture son DRB1*1501 y DRB1*0401, que comparten una secuencia que

altera las características estructurales de la molécula HLA-DR a nivel de P4 en el surco de unión al péptido y, por lo tanto, el tipo de antígeno que se une²¹.

Tabla 1. HLA y enfermedades autoinmunes

Enfermedad	Alelo o Haplotipo
Lupus eritematoso generalizado	HLA-B8-DR3
Espondilitis anquilosante	HLA-B*2702 HLA-B*2704
Miastenia gravis	HLA-B8-DR3
Diabetes mellitus tipo I	HLA-DQB1*0302-DQA1*0301-DRB1*0401 HLA-DQB1*0201-DQA1*0501-DRB1*03
Artritis reumatoide	HLA-DRB1*0401-DRB1*0404-DRB1*0101
Esclerosis múltiple	HLA-DQB1*0602-DQA1*0102-DRB1*1501

Durante la selección positiva y negativa de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, la interacción del complejo molecular compuesto por el HLA-péptido-TCR es determinante en el control del escape de células T autorreactivas. Estudios en ratones han demostrado que las moléculas de HLA favorecen re-arreglo de los genes que codifican para el TCR específico para el antígeno que está siendo presentado por la molécula de HLA. Así la ausencia de moléculas HLA favorece el escape de clonal de células T autorreactivas durante el proceso de selección positiva y negativa en el timo²². El mimetismo molecular es otro mecanismo que puede desencadenar una respuesta autoinmune, donde ciertas moléculas HLA presentan un antígeno extraño a las células T, desencadenando una respuesta

inmune (reacción cruzada) en contra proteínas propias del organismo. La reacción cruzada se desencadena debido a la similitud entre el antígeno y la proteína propia (mimetismo molecular)²³. La esclerosis múltiple es un ejemplo de mimetismo molecular y enfermedad, donde hay una reacción cruzada entre algunos virus (coronavirus) y tejido del sistema nervioso central²⁴.

La asociación de la región clase III del MHC. Los genes de las proteínas C2 y C4 del complemento se codifican en la región *clase III* del MHC. Aproximadamente el 75 % de los pacientes con lupus eritematoso generalizado son homocigotos deficientes de C4, mientras que los homocigotos deficientes en C2 se presentan en aproximadamente 33% de los pacientes con lupus eritematoso generalizado²⁵. El polimorfismo -308 de la región promotora del TNF- α se ha asociado con colitis ulcerosa crónica inespecífica (enfermedad inflamatoria intestinal), que es una enfermedad de tipo autoinmune²⁶.

a.4 Artritis reumatoide y susceptibilidad genética.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica que, aunque afecta principalmente las articulaciones con membrana sinovial puede cursar también con manifestaciones extraarticulares, tales como: nódulos reumatoides, vasculitis y síndrome de Felty. Se sabe que la etiología de la AR es multifactorial y en ella se requiere de un huésped susceptible desde el punto de vista genético, quién en presencia de un factor ambiental desencadena una respuesta inflamatoria crónica en la membrana sinovial.

La incidencia de AR es mayor en los gemelos monocigotos que los gemelos heterocigotos y que en la población general, sugiriendo la existencia de un componente genético en la susceptibilidad al desarrollo de artritis reumatoide (AR)^{27,28}. La región del MHC es la que

se ha asociado más con la susceptibilidad al desarrollo de AR en los diferentes estudios genéticos²⁹.

En 1976, Stastny³⁰ reportó por primera vez la asociación de AR con el antígeno HLA-DR4. A partir de entonces se ha reportado la asociación de HLA-DR4 con AR en la mayoría de las poblaciones estudiadas; al analizar el subtipo molecular de HLA-DR4, se han encontrado diferencias de subtipo dependiendo del grupo étnico, por ejemplo los alelos HLA-DRB1*0401 y HLA-DRB1*0404 son los más frecuentes en pacientes de Norte América³¹ y Europa³². El alelo DRB1*0405 es el más común en Japón³³, China³⁴, Korea³⁵, y España³⁶. Por otro lado, los alelos DRB1*0102 se asocian en pacientes de Israel³⁷, DRB1*1010 en pacientes vascos³⁸ y DRB1*1402 se asocia en indígenas de América³⁹. Estos alelos se caracterizan por compartir una secuencia de nucleótidos que codifican para el "epítoto compartido o epítoto reumatoide"⁴⁰ (Tabla 2), el cual se localiza en la tercera región hipervariable de la molécula de HLA, ocupando la posición del aminoácido 70 al 74 de la α hélice de la cadena DR β .

En la patogénesis de la AR, el primer evento es un proceso inflamatorio en la membrana sinovial que frecuentemente lleva a la destrucción del cartílago y hueso. En la membrana sinovial existen dos tipos de sinoviocitos: sinoviocito tipo A, que es similar a los macrófagos, y el sinoviocito tipo B, que es similar a los fibroblastos⁴¹. En el proceso inflamatorio ocurre infiltración de monocitos, linfocitos T CD4⁺ y linfocitos B (LB), formando agregados linfoides con centros germinales⁴².

Durante el proceso inflamatorio en la membrana sinovial, las CPA (sinoviocitos tipo A o macrófagos) presentan antígenos a los linfocitos T CD4⁺; esta presentación de antígenos es restringida por las moléculas HLA *clase II*. La participación de las moléculas HLA

clase II durante la presentación antigénica en la membrana sinovial refuerza los estudios en los que se han asociado los alelos HLA-DRB1 (HLA-DRB1*0401) con susceptibilidad al desarrollo de AR, más aun las moléculas HLA-DR codificadas por un alelo HLA-DRB1 de susceptibilidad unen péptidos considerados como autoantígenos en la patogénesis de la AR⁴³.

Tabla 2. Secuencia del epítopo compartido de acuerdo al alelo HLA-DRB1

Alelo HLA-DRB1	Posición del Aminoácido				
	70	71	72	73	74
*0101	Q	R	R	A	A
*0102	Q	R	R	A	A
*0104	Q	R	R	A	A
*0401	Q	K	R	A	A
*0404	Q	R	R	A	A
*0405	Q	R	R	A	A
*0408	Q	R	R	A	A
*0409	Q	K	R	A	A
*0410	Q	R	R	A	A
*0413	Q	K	R	A	A
*0416	Q	K	R	A	A
*0419	Q	R	R	A	A
*0421	Q	K	R	A	A
*1402	Q	R	R	A	A
*1406	Q	R	R	A	A
*1001	R	R	R	A	A

Q = glutamina, R = arginina, K = lisina, A = alanina.

La noción de que los linfocitos T CD4⁺ participan en la patogénesis de la AR se sustenta de las observaciones hechas en modelos animales para investigar los mecanismos de sinovitis. Por ejemplo, los modelos de ratón donde se usa colágena para inducir artritis

reumatoide, muestran que la respuesta es claramente dependiente de las células T⁴⁴. Además, ensayos de estimulación *in vitro* utilizando linfocitos T de pacientes con AR, han demostrado la existencia de reactividad (proliferación) contra diferentes autoantígenos (colágeno Tipo II, proteoglicanos, glicoproteína-39, agreganos y proteínas de choque térmico)^{45,46}. Asimismo se han detectado autoanticuerpos contra los autoantígenos para los cuales los linfocitos T obtenidos de pacientes con AR son autorreactivos^{47,48}.

Bajo condiciones fisiológicas en el tejido conjuntivo de la sinovia, las citocinas y los factores de crecimiento forman una red que mantiene el balance entre el depósito y la degradación de la matriz extracelular. Sin embargo, en la AR se presenta una mayor producción de citocinas proinflamatorias, originando una alteración en el balance de depósito y degradación de la matriz extracelular, manifestándose como una destrucción excesiva de los componentes de la sinovia. Entre los factores que participan en la fisiopatogénea de la AR se encuentran la IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TGF- β , el GM-CSF, y TNF- α . El TNF- α es una citocina muy importante en patogénesis de la AR, ya que además de favorecer la degradación de los componentes de la sinovia, estimula la proliferación de los sinoviocitos tipo B o semejantes a fibroblastos y la síntesis de IL-6, IL-8 y TGF- β 1 por estas células, lo que incrementa la proliferación de las células endoteliales, traduciéndose en aumento de la angiogénesis⁴⁹. Por otro lado, se ha observado que ratones transgénicos que producen niveles elevados de TNF desarrollan una enfermedad similar a la AR⁵⁰. Finalmente, el tratamiento de pacientes con AR utilizando agentes biológicos diseñados para interferir con la acción del TNF- α ha demostrado eficacia en estudios clínicos^{51,52}. El TNF- α es una citocina inducible; la principal fuente de producción son los monocitos y macrófagos activados, aunque

también puede ser producido por células endoteliales, células NK, linfocitos T y B⁵³. Se ha observado que individuos que son HLA-DR2 producen niveles bajos de TNF- α , mientras los individuos que son HLA-DR3 producen niveles elevados de esta citocina⁵⁴. Se han descrito sitios polimórficos en la región promotora del gen estructural TNF- α . El primer polimorfismo se encuentra en la posición -308, la cual es una mutación puntual en la que la presencia de guanina define el alelo TNF1 o TNF308G y la presencia de adenina define el alelo TNF2 o TNF308A. Se ha demostrado que el alelo TNF2 tiene una mayor actividad transcripcional que el alelo TNF1⁵⁵. El segundo polimorfismo radica en la posición -238, donde existe un cambio de una guanina por una adenina, definiendo los alelos TNFG y TNFA, respectivamente⁵⁶. En pacientes anglosajones con AR, la frecuencia del alelo TNF2 es 3 veces mayor que en la población que se utiliza como control (individuos sin AR) y es secundario a la presencia del antígeno HLA-DR3⁵⁷, ya que se ha demostrado que el alelo TNF2 forma parte del haplotipo extendido HLA-A1-B8-DR3-DQ2.

Tres genes de HSP70 han sido mapeados dentro de la región de clase III: HSP70-1, HSP70-2 y HSP70-Hom^{58,59}. La expresión de los 2 primeros es inducida por estadios de choque térmico (estrés celular), mientras que la última es constitutiva⁶⁰. Los productos de estos genes tienen un papel importante en el transporte de péptidos intracelulares y en la conformación de proteínas. Dada su función de chaperonas durante la presentación antigénica de las moléculas HLA y a que forman parte de los autoantígenos que se han asociado con AR, estos genes son candidatos para estudios genéticos de susceptibilidad a la AR.

a.5 Población de Mestizos Mexicanos.

Se define como mestizo mexicano a aquel individuo que ha nacido en México, así como sus dos últimas generaciones. Además, no debe pertenecer a ningún grupo indígena Mesoamericano de acuerdo a la clasificación lingüística de Swadesh⁶¹, en la que se describen cinco grandes grupos lingüísticos: el tarasco, el macromaya, el macromixteco, el macronahua y el macroyuma.

Los mestizos mexicanos son el resultado de la hibridación de grupos indígenas mesoamericanos de México con españoles posterior a la conquista de México en el siglo XVI, así como con africanos que ingresaron a México como esclavos después de la conquista.

Realizar estudios de casos y controles en mestizos mexicanos para identificar un factor genético asociado con susceptibilidad y/o resistencia a desarrollar una enfermedad, requiere de conocer el grado de mestizaje que existe en los mestizos mexicanos. Varios estudios utilizando marcadores de grupos sanguíneos (ABO, Rh, MN) y de proteínas séricas (haptoglobina y factor B de del complemento), han demostrado que el porcentaje de genes amerindios, españoles y africanos en la población de mestizos mexicanos, varía dependiendo de la región geográfica estudiada. En el Distrito Federal: ~56 % de genes amerindios, ~40 % españoles y ~4 % africanos. En Tlaxcala: ~76 % genes amerindios, ~16 % genes españoles y ~8 % de genes africanos⁶²⁻⁶⁴. En un estudio reciente, realizado en tres grupos de mestizos mexicanos muestreados del Distrito Federal, Nuevo León y Jalisco, se analizaron dos loci a nivel molecular (HLA-DQA1 y D1S80) para identificar el grado de mestizaje. En la población de Nuevo León el mestizaje fue como sigue: 36.99 ± 5.05 % genes amerindios, 59.99 ± 5.94 % españoles y 3.02 ± 2.76 % africanos; en la

población de Jalisco: 43.03 ± 6.43 % de genes amerindios, 56.03 ± 7.87 % españoles y 0.94 ± 4.41 % de genes africanos; en la población del Distrito Federal: 49.03 ± 3.76 % de genes amerindios, 50.03 ± 4.11 % españoles y 0.94 ± 1.27 % africanos⁶⁵.

Otro punto a considerar en los estudios de casos y controles para identificar un factor genético asociado con susceptibilidad y/o resistencia a desarrollar una enfermedad; es si los loci analizados se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) en la población control. Así, si la población control esta en equilibrio de HW se puede evitar establecer asociaciones espurias con algún locus analizado⁶⁶.

En los estudios donde se analizan varios loci, es importante estudiar la existencia de desequilibrio de unión (LD, del inglés, Linkage Disequilibrium) entre los loci. El LD define situación en la cual existe asociación, no al azar, de alelos entre diferentes loci de un gameto. Las fuerzas evolutivas de selección, flujo génico (mestizaje), deriva génica y mutación influyen en el grado de LD entre los loci. Adicionalmente, la recombinación entre los loci es otro factor importante que influye en el grado de LD. Así, si existe mayor recombinación entre dos loci, el grado de LD será menor y si existe menor recombinación, el grado de LD será mayor⁶⁷. Debido a las funciones inmunológicas de los genes HLA, la selección natural es un mecanismo importante que opera en ellos.

Los genes del MHC que codifican para las moléculas HLA *clase I* y *II* son altamente polimórficos. La mutación, recombinación y microrecombinación, son los mecanismos más importantes para la generación de polimorfismos en los genes HLA *clase I* y *II*^{68,69}. La participación de estos mecanismos en la generación de polimorfismos varía de un locus a otro. En el gen HLA-A (*clase I*) el mecanismo de mutación es el principal generador de polimorfismos, mientras que en el gen HLA-B (*clase I*), la recombinación es

el principal mecanismo. En los genes DQA y DQB (*clase II*), la mutación es el más importante, y en gen DRB1 (*clase II*) es una mezcla de mutación y recombinación^{68,69}.

El alto grado de polimorfismo existente en los loci HLA *clase I* (~1150 alelos) y *II* (~470 alelos)⁷⁰, favorece la existencia de una amplia variedad de moléculas HLA *clase I* y *II* dentro de una población, lo que permite que ésta la pueda responder de una manera más adecuada ante la invasión de diferentes microorganismos, de tal manera que, dentro del amplio repertorio de alelos *clase I* y *II* que existen en una población, son seleccionados aquellos alelos que codifican moléculas HLA que generan una respuesta inmune más adecuada ante la invasión de los patógenos, por lo que la selección es una fuerza evolutiva importante para mantener alelos HLA *clase I* y *II*, mediante la selección positiva ante la presión ejercida por diferentes microorganismos. Este puede ser el caso del alelo HLA-B53 que protege contra casos graves de malaria en algunas comunidades africanas⁷¹. La existencia de un número elevado de alelos HLA *clase I* y *II*, si bien incrementa la diversidad de moléculas HLA para responder a los diferentes patógenos, también aumenta la posibilidad de un fenómeno de autoinmunidad. Al incrementar el número de moléculas HLA, aumenta la posibilidad de una reacción cruzada entre antígenos propios y antígenos extraños (péptidos virales o bacterianos)⁷².

El gran número de alelos HLA *clase I* y *II*, la elevada heterocigosis, y el hecho de que el número de sustituciones no-sinónimas sea mayor que las sustituciones sinónimas en los sitios de reconocimiento al antígeno en las moléculas de HLA *clase I* y *II*^{73,74}, son fenómenos que indican que la selección natural es un mecanismo evolutivo importante que opera en los genes HLA *clase I* y *II*.

Los individuos están constantemente expuestos a patógenos, las moléculas de HLA garantizan que se monte una respuesta inmune adecuada contra los diferentes patógenos, mediada por moléculas *HLA clase I* (infecciones virales) o *HLA clase II* (infecciones bacterianas). Así, los haplotipos (*HLA clase I*–*HLA clase II*) que responden adecuadamente ante la agresión de patógenos, son favorecidos por la selección positiva para permanecer dentro de una población, indicando que esta selección también actúa a nivel de haplotipos^{75,76}. La presión que se ejerce por los diferentes patógenos varía en tiempo y parece fluctuar entre las diferentes poblaciones, lo cual podría explicar porque los patrones de LD difieren entre los diferentes grupos étnicos estudiados⁷⁷.

La selección positiva sobre un alelo origina la permanencia de otros alelos que se encuentran flanqueando al locus, lo que origina LD entre el locus bajo selección positiva y genes adyacentes, fenómeno conocido como “hitchhiking”⁶⁷. Se ha demostrado que el fenómeno de hitchhiking contribuye a aumentar la gran diversidad dentro de la región del MHC, sobre todo en los genes no HLA^{75,78,79}.

En la región del MHC se han descrito varios haplotipos ancestrales o extendidos, que se han conservado a través de generaciones y se extienden desde los genes de *clase I* hasta los genes de *clase II*^{80,81}. Dentro de la región del MHC el sitio de mayor recombinación se encuentra en la región central, lo que ha originado la existencia de bloques que pueden estar formados por genes MHC *clase III* y *clase I* o genes MHC *clase III* y *clase II*. Otros tipos de bloques son los formados sólo por genes de *clase I* (HLA-B y HLA-A), y los formados sólo por genes *clase II* (DRB1 y DP o DQB1). En la región de *clase II* que abarca del locus HLA-DRB1 al locus DPB2 (Figura 1), la recombinación varía, siendo mayor a nivel del locus TAP2 (aproximadamente a la mitad

entre los loci DRB1 y DPA2) que la que existe en el bloque de DRB1-DQB1. El alto grado de recombinación a nivel del locus TAP2 es debido a la existencia de "hot-spots" (sitios donde la recombinación es muy alta)^{82,83}.

El flujo génico (mestizaje) entre dos poblaciones puede causar LD. En una población mestiza, donde la hibridación ha sido reciente, la diferencia en las frecuencias alélicas entre las dos poblaciones puede generar LD⁸⁴. Sin embargo, el LD disminuye con el apareamiento al azar a una proporción de $1-c$ (c = valor de recombinación) por generación⁶⁷.

4. JUSTIFICACIÓN.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica de etiología multifactorial, donde se requiere de un huésped susceptible desde el punto de vista genético, quién en presencia de un factor ambiental desencadena una respuesta inflamatoria crónica en la membrana sinovial.

Durante el proceso inflamatorio en la membrana sinovial, las CPA presentan antígenos (propios o extraños) al TCR de los linfocitos T CD4⁺; esta presentación de antígenos es restringida por las moléculas HLA *clase II*, lo que forma un complejo HLA-antígeno-TCR. Así, los genes de la *región clase II* del MHC que determinan las características estructurales de las moléculas HLA *clase II*, son importantes en la susceptibilidad o protección al desarrollo de la AR. En diferentes poblaciones del mundo se ha asociado el locus HLA-DRB1 con susceptibilidad al desarrollo de AR, pero el alelo varía dependiendo del grupo étnico estudiado. Los alelos asociados con AR se caracterizan por codificar para una secuencia conocida como "epitope compartido" que ocupa la posición del aminoácido 70 a 74 de la α hélice de la cadena β de la molécula de HLA-DR (sitio que influye en el tipo de péptido antigénico que se unirá a la molécula HLA-DR). El locus HLA-DQB1 codifica para moléculas de *clase II* que presentan antígenos al TCR de los linfocitos T CD4⁺. Así, al participar los loci HLA-DRB1 y DQB1 en la respuesta inmune mediada por linfocitos CD4⁺, la respuesta inmune puede ser modificada por las diferentes combinaciones de alelos HLA-DRB1 DQB1 que constituyen un haplotipo en particular. Por otra parte, dada la cercanía de ambos loci en la región de *clase II* del MHC, estos son heredados en bloque.

Durante el proceso inflamatorio que existe en la sinovia de los pacientes con AR, se producen varias citocinas; dentro de éstas se encuentra el TNF- α que favorece la degradación de los componentes de la sinovia, la angiogénesis y la producción de otras citocinas, como la IL-6. El gen del TNF- α se localiza en la región de *clase III* y su región promotora contiene polimorfismos que afectan la actividad transcripcional y, por lo tanto, las cantidades de esta citocina.

Se ha demostrado que linfocitos T de pacientes con AR son reactivos contra ciertos autoantígenos⁴⁵⁻⁴⁹, dentro de los cuales se encuentran las proteínas de choque térmico. El gen de la HSP70-*hom* se localiza en la región de *clase III* del MHC y presenta una mutación no-sinónima la que origina un cambio estructural en la proteína que codifica, por lo que la proteína del alelo mutado puede estar funcionando como autoantígeno⁴⁵⁻⁴⁹.

Las proteínas para las cuales codifican los genes HLA-DRB1, HLA-DQB1, TNF- α y HSP70-*hom* son importantes en la patogénesis de la AR, lo que hace a estos genes candidatos para el estudio de susceptibilidad genética para el desarrollo de AR. Algunos alelos de estos genes ya han sido asociados con susceptibilidad al desarrollo de AR, pero dada las características de la estructura genética de nuestra población de mestizos mexicanos, los alelos en los pacientes mestizos mexicanos con AR pueden ser diferentes a los de otros grupos étnicos estudiados.

5. HIPÓTESIS.

Existe asociación de los loci HLA-DRB1, HLA-DQB1, TNF- α y HSP70-*hom* con susceptibilidad al desarrollo de AR , pero los alelos asociados con susceptibilidad difieren a los encontrados en otros grupos étnicos , dado la estructura genética de la población de mestizos mexicanos, así como también difieren los patrones de LD en los mestizos mexicanos entre los loci estudiados.

6 OBJETIVOS.

Primarios:

- a. Estudiar si hay asociación de los genes de *clase II* (HLA-DRB1, HLA-DQB1) con susceptibilidad al desarrollo de AR.
- b. Estudiar si hay asociación de los genes de *clase III* polimorfismos de la región promotora del TNF- α (-238 y -308) y HSP70-*hom* con susceptibilidad al desarrollo de AR.
- c. Establecer los patrones de LD entre los loci estudiados.
- d. Estudiar si hay un haplotipo que esté asociado con susceptibilidad al desarrollo de AR.

Secundarios.

- a. Estudiar las características clínicas y demográficas de los pacientes con AR .
- b. Establecer si los loci asociados con susceptibilidad al desarrollo de AR, están además asociados con alguna característica demográfica o clínica.

5 MATERIALES Y METODOS.

a. Pacientes y controles.

Se incluyeron 84 individuos mestizos mexicanos no relacionados que cumplieron los criterios del ACR (del inglés American College of Rheumatology, anteriormente The American Rheumatism Association) de 1987 para la clasificación de la artritis reumatoide (Anexo 1)⁸⁵. Los pacientes fueron captados de la consulta externa del Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ). Todos los pacientes, al momento de ser incluidos en el estudio, tenían menos de 3 años (36 meses) de evolución de la enfermedad desde el inicio de los síntomas atribuibles a la AR. Todos los pacientes cumplieron los criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión.

1. Diagnóstico de artritis reumatoide.
2. Mayor de 18 años de edad.
3. Deseo de participar en el estudio, manifestado con la firma del Consentimiento Informado, aprobado por el comité de ética para investigación en humanos del INCMNSZ.
4. Ser mestizos mexicanos.
5. Ser residentes del Distrito Federal o área metropolitana.
6. Datos demográficos y clínicos completos.
7. Contar con muestra de ADN.

Criterios de exclusión.

1. Asociación de otra enfermedad de tipo autoinmune.
2. Asociación de otra enfermedad crónica.

3. No firmar el Consentimiento Informado.
4. No ser mestizo mexicano.

Como controles se incluyeron 99 individuos mestizos mexicanos, adultos y residentes del Distrito Federal o área metropolitana. Todos los controles fueron sanos y sin antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes, tales como tiroiditis autoinmune, artritis reumatoide, lupus eritematoso generalizado, escleroderma, espondilitis anquilosante y enfermedad inflamatoria intestinal (CUCI o enfermedad de Crohn).

Tanto pacientes como controles fueron interrogados sobre el lugar de nacimiento de sus dos últimas generaciones; ver introducción para la definición de mestizo mexicano.

b. Evaluación clínica.

Se registraron las siguientes variables: edad, género, educación formal, duración de la enfermedad, tipo de fármacos modificadores de la AR (FMAR) que recibían como tratamiento y títulos de factor reumatoide (FR) detectado por la técnica de nefelometría. La capacidad funcional de los pacientes con AR se evaluó utilizando la versión validada en español del HAQ (del inglés, Health Assessment Questionnaire). El HAQ es un instrumento autoadministrado que mide específicamente la función física de los pacientes con AR; este cuestionario se responde en una escala ordinal que va desde "sin dificultad" = 0, hasta "no puedo hacerlo" = 3; cada respuesta es calificada de 0 a 3, y la suma de las respuestas se promedia dividiéndose entre 10 (total de preguntas), para obtener la puntuación global, cuyo promedio va de 0 a 3; a mayor puntuación, mayor incapacidad funcional⁸⁶. La actividad de la enfermedad fue calificada utilizando el índice DAS (del

inglés, Disease Activity Score), que incluye 4 variables: a) índice de Ritchie (Sistema diseñado para evaluar sólo la presencia de dolor a la presión en las articulaciones de los pacientes con AR); b) articulaciones inflamadas; c) velocidad de sedimentación globular, y d) estado de salud general⁸⁷. Todos los pacientes contaron con radiografías de manos para la evaluación del daño articular.

c. Tipificación de los genes HLA-DRB1, DQB1, TNF- α -238, -308 y HSP70-*hom*.

La extracción de ADN genómico se hizo a partir de sangre total, de acuerdo al procedimiento descrito por Davis *et al*⁸⁸ (Anexo 2).

La tipificación genérica de los genes HLA-DRB1 y DQB1 se llevó a cabo por la reacción en cadena de la polimerasa e hibridación con sondas específicas de secuencia (PCR-SSO; Anexo 2), utilizando el kit Dynal RELI SSO HLA-DRB1 y HLA-DQB1 (Hoffmann-La Roche Ltd. And Roche Molecular Systems , Inc., Alameda, CA, USA; Anexo 2). La tipificación por alta resolución se realizó por PCR-SSP (Sequence Specific Primers), utilizando los kits comerciales BAG (Biologische Anlysensystem GmbH, Alemania).

La tipificación de los polimorfismos en la región promotora del TNF- α se llevó a cabo por la reacción en cadena de la polimerasa y posterior corte con endonucleasas de restricción (PCR-RFLP). La enzima *BamHI* se utilizó en el polimorfismo -238, y la enzima *NcoI* se utilizó para el polimorfismo -308⁸⁹ (Anexo 2).

El polimorfismo de HSP70-*hom* se detectó por PCR-RFLP utilizando la endonucleasa de restricción *NcoI* (Anexo 2)⁹⁰.

d. Análisis estadístico.

El análisis de los datos se llevo a cabo utilizando el paquete estadístico STATA7 (UCLA Labs, Los Angeles, CA, USA). Se utilizó la prueba de chi-cuadrada para detectar

diferencias entre pacientes y controles; en las frecuencias alélicas, frecuencia de haplotipos, y en la proporción de pacientes que presentaron por lo menos un alelo HLA-DRB1 que codifica para el EC+ o al menos un alelo HLA-DRB1 que codifica para el ácido aspártico en la posición 70 de la cadena β (D^{70+}). La prueba exacta de Fisher se utilizó cuando el valor de alguna de las celdas en las tablas de 2x2 fue menor o igual a 5. El valor de p fue corregido al multiplicarlo por el número de comparaciones (Anexo 3). La razón de momios (RM) e intervalos de confianza de 95% (IC 95%)^{91,92} fueron calculados para medir la fuerza de asociación entre un locus y susceptibilidad o protección para desarrollar AR (Anexo 3). Se calculó el promedio y la desviación estándar de las variables cuantitativas (edad, duración de la enfermedad en meses, educación formal en años, índice de HAQ, índice DAS y títulos de FR). Para detectar diferencias estadísticamente significativas de las variables cuantitativas se utilizó la prueba t de Student⁹².

Los pacientes con AR fueron clasificados en tres categorías, de acuerdo a los títulos de FR: pacientes con FR negativo (0–20 UI/ml), pacientes con títulos de FR por debajo de la media (< 224 UI/ml) y finalmente aquellos con títulos de FR por arriba de la media (>224 UI/ml). Una vez clasificado los pacientes en las tres categorías, de acuerdo al título de FR, se realizó una prueba de chi-cuadrada para detectar una asociación significativa entre los pacientes que presentaron por lo menos un alelo HLA-DRB1 EC+ o D^{70+} con alguno de los tres grupos en que fueron clasificados los pacientes.

Las frecuencias alélicas en pacientes y controles fueron calculadas con el programa de Arlequín v 1.1⁹³. El análisis de Hardy-Weinberg se calculó en utilizando el mismo programa de acuerdo a Guo *et al*⁹⁴. La frecuencia de haplotipos formados por dos loci se calculó a partir de las frecuencias genotípicas de cada locus estudiado, utilizando los

estimados de ML (del inglés, Maximum-likelihood), usando el algoritmo EM (del inglés ; Expectation-Maximization)^{95,96}. Conociendo la frecuencia de los haplotipos se calcularon los valores de D y D' (Anexo 3), para detectar la existencia de desequilibrio de unión entre un par de loci en particular^{97,98}. Se utilizó el método de Mantel-Haenszel (MH) para distinguir si la asociación del locus HLA-DQB1 es independiente de la asociación del locus HLA-DRB1 o viceversa (Anexo 3)^{92,99}.

8 RESULTADOS.

a. Características demográficas.

Se incluyeron 84 pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide (AR), de acuerdo a los criterios del ACR (Anexo I). Los pacientes que se incluyeron cursaban con menos de 36 meses (3 años) de evolución desde el inicio de los síntomas atribuibles a la AR. Setenta y dos pacientes (85.7 %) fueron mujeres y doce hombres (14.3 %), con un promedio de edad de 39.3 años; el 84.5 % fue factor reumatoide positivo (FR +), con títulos promedio de 455.2 UI / ml (Tabla 3). La mayoría de los pacientes tomaba drogas modificadoras de la enfermedad; de éstas, la más frecuente fue el metotrexato, en un 68 %, seguida por la cloroquina, en un 48.8 %. Ninguno de los pacientes presentó manifestaciones extra-articulares al momento de ingresar al estudio.

Todos los loci estudiados se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 4), en la población control, lo cual nos permite excluir que nuestros resultados se deban a una asociación espuria.

b. Asociación del locus HLA-DRB1 con susceptibilidad a desarrollar artritis reumatoide.

b.1 El epítoto compartido esta asociado con artritis reumatoide en Mestizos Mexicanos.

Para establecer el papel del epítoto compartido (EC) en la susceptibilidad para el desarrollo de AR en mestizos mexicanos, se agruparon los pacientes de acuerdo a la presencia o ausencia de un alelo HLA-DRB1 que codifican para el EC (EC+). Al comparar pacientes y controles, observamos que la proporción de pacientes con al

menos un alelo HLA-DRB1 EC+ está incrementada significativamente ($p_c = 0.0002$, RM = 4.1 IC95 % = 2.2 – 7.7 ; Tabla 5)

Tabla 3. Características demográficas de los pacientes con artritis reumatoide

Características	Total de pacientes n = 84
Genero, Femenino n (%) Masculino n (%)	72 (85.7) 12 (14.3)
Edad, promedio \pm DE años	39.3 \pm 14.8
Duración de la enfermedad, Promedio \pm DE meses	16.7 \pm 7.5
Educación formal, Promedio \pm DE años	9.9 \pm 4.6
Factor reumatoide +, n (%)	71 (84.5)
HAQ, promedio \pm DE Rango 0 a 3	0.79 \pm 0.64
DAS, promedio \pm DE	3.3 \pm 1.2
Título de factor reumatoide, Promedio \pm DE UI/ ml	455.2 \pm 689.9
MTX n (%) CLQ n (%)	68 (80.9) 41 (48.8)

DE = desviación estándar , **HAQ** = Cuestionario de evaluación de la función física,
DAS = Escala de evaluación de la actividad, **MTX** = Metotrexato, **CLQ** = Cloroquina.

Tabla 4 . Equilibrio de Hardy–Weinberg, método cadena de Markov

Locus	Heterocigosis observada	Heterocigosis esperada	Valor de p
HLA-DRB1	0.90909	0.93786	0.15728
HLA-DQB1	0.77778	0.84705	0.11129
TNF α -238	0.13131	0.14075	0.43847
TNF α -308	0.06061	0.06886	1.00000
HSP70-hom	0.35354	0.38153	0.78717

Tabla 5. Proporción de pacientes con AR y controles sanos que presentan por lo menos un alelo HLA-DRB1 que codifica para el epítipo compartido.

	Pacientes n = 84		Controles n = 99		P	RM	IC 95 %
	n	f	n	f			
EC+	54	0.643	30	0.303	0.0001*	4.1	2.2 – 7.7
EC–	30	0.357	69	0.697			

*pC = 0.0002

b.2 HLA-DRB1 en pacientes mestizos Mexicanos con AR.

La Tabla 6 muestra la distribución de los alelos HLA-DRB1 (resolución intermedia) en pacientes y controles, observándose un incremento de la frecuencia de los alelos HLA-DRB1*04 y 01. Sin embargo, no hay un incremento estadísticamente significativo HLA-DRB1*04 ($p_c = 0.08$, RM = 1.9, IC 95 % 1.2 – 3.1) y HLA-DRB1*01 ($p_c = 0.91$, RM 2.12, IC 95 % 0.88 – 5.3). La frecuencia alélica de HLA-DRB1*14 se encontró ligeramente incrementada al comparar pacientes contra controles (0.137) y (0.105), respectivamente, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

La frecuencia alélica de HLA-DRB1*04, 01 y 14 tipificados por alta resolución, se muestra en la Tabla 7, donde observamos que la frecuencia de los alelos HLA-DRB1 que codifican

para el epitope compartido está incrementada en pacientes (0.393), comparado con controles (0.172), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p_c = 0.003$, RM = 3.12, IC 95 % 1.88 – 5.22; Tabla 7) .

Tabla 6. Frecuencia alélica (*fa*) del locus HLA-DRB1 en pacientes mestizos mexicanos con AR y controles sanos (tipificación por resolución intermedia).

	Pacientes 168		Controles 198		P	RM	IC 95 %
	n	fa	n	fa			
DRB1*04	63	0.375	47	0.237	0.006*	1.9	1.2 – 3.1
DRB1*14	23	0.137	21	0.105	NS		
DRB1*08	19	0.113	33	0.165	0.09	0.64	0.33 – 1.2
DRB1*01	17	0.101	10	0.050	0.07**	2.12	0.88 – 5.3
DRB1*15	7	0.042	13	0.065	NS		
DRB1*16	7	0.042	5	0.025	NS		
DRB1*07	7	0.042	22	0.111	0.02^{&}	0.35	0.12 – 0.87
DRB1*11	7	0.042	20	0.100	0.04[†]	0.39	0.13 – 0.97
DRB1*13	6	0.036	10	0.050	NS		
DRB1*03	5	0.030	11	0.055	NS		
DRB1*12	3	0.018	2	0.010	NS		
DRB1*09	2	0.012	3	0.015	NS		
DRB1*10	2	0.012	1	0.005	NS		

* $p_c = 0.08$, ** $p_c = 0.91$, [&] $p_c = 0.26$, [†] $p_c = 0.52$

Tabla7. Frecuencia alélica (*fa*) de HLA-DRB1*04,*01,*14 y *10; tipificados por alta resolución para identificar los alelos HLA-DRB1 que codifican para el epítipo compartido (EC) en pacientes con AR y controles sanos.

Alelo	Pacientes 168		Controles 198		P	RM	IC 95 %
	n	fa	n	fa			
DRB1*04							
0404^{EC}	27	0.161	9	0.045	0.0002	4.02	1.76 – 9.99
*0407	12	0.071	21	0.106			
*0405^{EC}	11	0.065	2	0.010	0.008^φ	6.65	1.46 – 64.35
*0403	6	0.036	4	0.020			
*0411	5	0.030	3	0.015			
*0401^{EC}	1	0.006	1	0.005			
*0408^{EC}	1	0.006	1	0.005			
*0402	0	0.000	2	0.010			
*0406	0	0.000	1	0.005			
*0409^{EC}	0	0.000	1	0.005			
*0410^{EC}	0	0.000	2	0.010			
DRB1*01							
*0101^{EC}	11	0.065	7	0.035			
*0102^{EC}	3	0.018	0	0.000			
*0103	3	0.018	3	0.015			
DRB1*14							
*1402^{EC}	7	0.042	7	0.035			
*1401	6	0.036	6	0.030			
*1407	4	0.024	3	0.015			
*1406^{EC}	3	0.018	3	0.015			
*1403	3	0.018	2	0.010			
DRB1*10							
*1001^{EC}	2	0.012	1	0.005			
Total HLA-DRB1 que codifican para el EC	66	0.393	34	0.172	0.0001**	3.12	1.88 – 5.22

*pc = 0.006, **pc = 0.003, ^φpc = 0.24

Los alelos HLA-DRB1 más frecuentes que codifican para el EC fueron: HLA-DRB1*0404 (0.161 vs 0.045; $p = 0.006$, RM = 4.02, IC95% = 1.76 – 9.99; Tabla 7), DRB1*0405 (0.065 vs 0.010), DRB1*0101 (0.065 vs 0.035) DRB1*0102 (0.018 vs = 0.000). La frecuencia alélica de los subtipos de HLA-DRB1*14 que codifican para el EC fue muy similar entre pacientes y controles DRB1*1402 (0.042 vs 0.035) y DRB1*1406 (0.018 vs 0.015).

Asimismo, la proporción de pacientes con AR que llevan dos copias del alelo HLA-DRB1 que codifica para el EC se encontró aumentada al compararla con los controles (0.143 vs 0.010 ; $p = 0.0007$, RM = 16.3, IC = 2.3 – 705; Tabla 8) . La combinación de HLA-DRB1*0404 - DRB1*0101 fue la más frecuente (0.333) entre los pacientes con dos copias de alelos HLA-DRB1 que codifican para el EC; el resto de las combinaciones se muestra en la Tabla 8.

b.3 Características demográficas y clínicas en relación a la presencia o ausencia del epítipo compartido y al alelo HLA-DRB1 que lo codifica.

Las características demográficas y clínicas fueron analizadas de acuerdo a la presencia de al menos una copia del alelo HLA-DRB1 EC+, o a la ausencia del alelo HLA-DRB1 que codifica para el EC (EC-). Las proporciones hombre /mujer y de individuos que tomaban metotrexate o cloroquina , así como el promedio de edad, educación formal, duración de la enfermedad y las evaluaciones HAQ (evaluación de capacidad funcional) y DAS (escala de evaluación de actividad de la artritis reumatoide) no fueron estadísticamente diferentes entre los pacientes con AR que fueron EC+ o EC- (Tabla 9).

El porcentaje de pacientes con FR (+) no fue estadísticamente diferente entre pacientes EC+ (67.6 %) y EC- (32.4 %). Sin embargo, el valor promedio del título de FR en pacientes EC+ (546.4 ± 744.9) fue mayor que en pacientes EC- (291.1 ± 551.9), pero

no alcanzó a ser estadísticamente significativa ($p = 0.1$, prueba de t de Student; Tabla 9). Por otro lado se encontró un incremento en la proporción de pacientes con al menos un HLA-DRB1 EC+ y niveles más altos de FR. Así, cuando los pacientes se clasificaron de acuerdo a los niveles de FR (FR negativo, 0 – 20 UI/ ml ; niveles de FR por debajo de la media , <224 UI/ ml; y niveles de FR por arriba de la media, >224 UI/ ml) y a la presencia o ausencia de EC, se observó un incremento significativo en la proporción de pacientes HLA-DRB1 EC+ con títulos de FR por arriba de la media ($p = 0.005$, OR = 4.3 , IC 95 % = 1.9 – 9.2; Tabla 10).

Tabla 8 . Proporción de pacientes y controles Mestizos Mexicanos con dos copias de alelos HLA-DRB1 que codifican para el EC.

	Decientes n = 84		Controles n = 99		P	RM	IC 95 %
	n	f	n	f			
Total	12	0.143	1	0.010	0.0007	16.3	2.3 – 705.03
DRB1*0404-0101	4	0.333	0	0.000			
DRB1*0404-0404	1	0.083	0	0.000			
DRB1*0404-0102	1	0.083	0	0.000			
DRB1*0404-0401	1	0.083	0	0.000			
DRB1*0404-1406	1	0.083	1	0.010			
DRB1*0405- 0101	1	0.083	0	0.000			
DRB1*0405-1402	1	0.083	0	0.000			
DRB1*0405-1001	1	0.083	0	0.000			
DRB1*0101-0102	1	0.083	0	0.000			

Tabla 9 . Características demográficas y clínicas de los pacientes con artritis reumatoide de acuerdo a la presencia o ausencia del epítopo compartido (EC).

Características	Total de pacientes con AR n = 84	EC+ n = 54	EC- n = 30
Genero, Femenino n (%) Masculino n (%)	72 (85.7) 12 (14.3)	43 (59.7) 11 (91.7)	29 (40.3) 1 (8.3)
Edad, promedio \pm DE años	39.3 \pm 14.8	39.7 \pm 14.8	38.5 \pm 15
Duración de la enfermedad, Promedio \pm DE meses	16.7 \pm 7.5	16.3 \pm 7.7	17.3 \pm 7.4
Educación formal, Promedio \pm DE años	9.9 \pm 4.6	9.5 \pm 4.8	10.5 \pm 4.4
Factor reumatoide +, n (%)	71 (84.5)	48 (67.6)	23 (32.4)
HAQ, promedio \pm DE Rango 0-3	0.79 \pm 0.64	0.68 \pm 0.63	0.83 \pm 0.67
DAS, promedio \pm DE	3.3 \pm 1.2	3.4 \pm 1.2	3.2 \pm 1.1
Título de factor reumatoide, Promedio \pm DE UI/ ml	455.2 \pm 689.9	546.4 \pm 744.9	299.1 \pm 551.9

DE = desviación estándar , HAQ = Cuestionario de evaluación de la función física,
DAS = Escala de evaluación de la actividad.

Los títulos de FR se han asociado con gravedad de la enfermedad y a la vez los títulos de FR y gravedad de la enfermedad están influenciados por el alelo HLA-DRB1 que codifica para el EC, así como por la presencia de una o dos copias del EC+. En el presente estudio se analizaron las diferentes características clínicas y demográficas de acuerdo a la presencia de una o dos copias de HLA-DRB1 EC+. En la Tabla 11 se muestran las características demográficas y clínicas de los 12 pacientes con AR que presentan dos copias del EC+ vs los que solo presentan una copia. En el grupo de dos

copias (EC+ / EC+), el 75 % fueron mujeres, y en el grupo con una sola copia (EC+ / EC-) el 81 % . El 91.7 % y 88.1 % fueron positivos para el FR en los grupos EC+ / EC+ y EC+ / EC-, respectivamente. En la Figura 5 se puede observar que no hay diferencia en el promedio del título de factor reumatoide entre ambos grupos. Posteriormente analizamos si las características clínicas y demográficas fueron diferentes en los 42 individuos que presentaban solo una copia del EC+, pero codificado por diferentes alelos HLA-DRB1. Los 42 pacientes con AR se agruparon en 3 grupos; HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*01 y HLA-DRB1*14. No encontramos ninguna diferencia estadísticamente significativa en las características clínicas y demográficas entre los tres grupos. Sin embargo, en la Figura 6 podemos observar que el promedio en los títulos de FR es más elevado en los individuos que son HLA-DRB1*04 que los que son HLA-DRB1*01 ó HLA-DRB1*14, sin alcanzar a ser estadísticamente significativa esta diferencia (prueba t de Student).

Tabla 10. Proporción de pacientes EC+ y títulos de FR.

Categoría de acuerdo a los niveles de FR	Pacientes EC+ n = 54	Pacientes EC- n = 30	RM	IC 95 %
Título de FR 0 – 20 UI/ ml	6	7	0.9	0.3 - 2.6
Título de FR < 224 UI/ ml	14	15	0.9	0.5 - 1.9
Título de FR > 224 UI/ ml	34	8	4.3	1.9 - 9.2

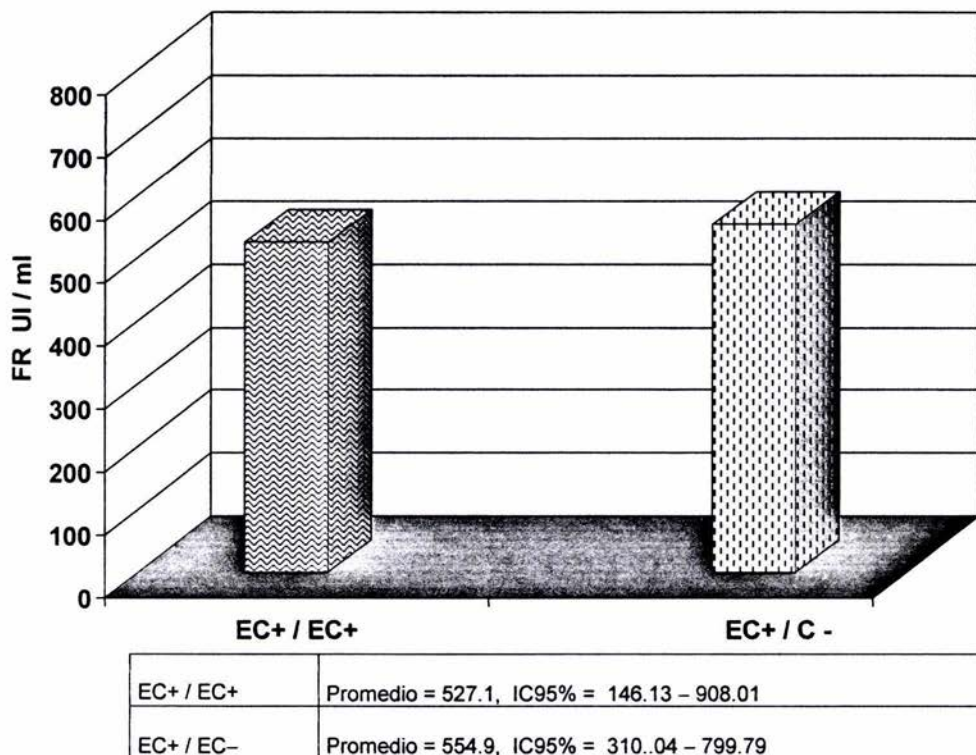
Los pacientes con AR fueron clasificados en tres grupos de acuerdo a los títulos de FR (FR negativo, 0 – 20 UI/ ml ; niveles de FR por debajo de la media , <224 UI/ ml; y niveles de FR por arriba de la media, >224 UI/ ml). Se realizó una prueba de X^2 para detectar una asociación entre HLA-DRB1 EC + y títulos de FR, encontrándose un incremento significativo en la proporción de pacientes HLA-DRB1 + y títulos de FR por arriba de la media ($p = 0.005$)

Tabla 11. Características clínicas y demográficas de los pacientes con AR que presentan dos copias y una copia de alelo HLA-DRB1 que codifica para el epítipo compartido (EC)

Características	Pacientes EC+ / EC+ n = 12	Pacientes EC+ / EC- n = 42
Genero, Femenino n (%) Masculino n (%)	9 (75.0) 3 (25.0)	34 (81.0) 8 (19.0)
Edad, promedio \pm DE años	36.6 \pm 8.5	40.6 \pm 16.1
Duración de la enfermedad, Promedio \pm DE meses	14.2 \pm 7.9	16.9 \pm 7.6
Educación formal, Promedio \pm DE años	10.7 \pm 3.3	8.9 \pm 5.2
Factor reumatoide +, n (%)	11 (91.7)	37 (88.1)
HAQ, promedio \pm DE Rango 0 – 3	0.8 \pm 0.57	0.78 \pm 0.65
DAS, promedio \pm DE	3.6 \pm 1.2	3.3 \pm 1.2
Título de factor reumatoide, Promedio \pm DE UI/ ml	527.1 \pm 599.6	554.9 \pm 785.8

DE = desviación estándar , **HAQ** = Cuestionario de evaluación de la función física,
DAS = Escala de evaluación de la actividad.

Figura 5. Promedio del título de FR en pacientes con AR que presentan que presentan dos copias del epitope compartido (EC+ / EC+) y los que presentan una copia (EC+ / EC -)



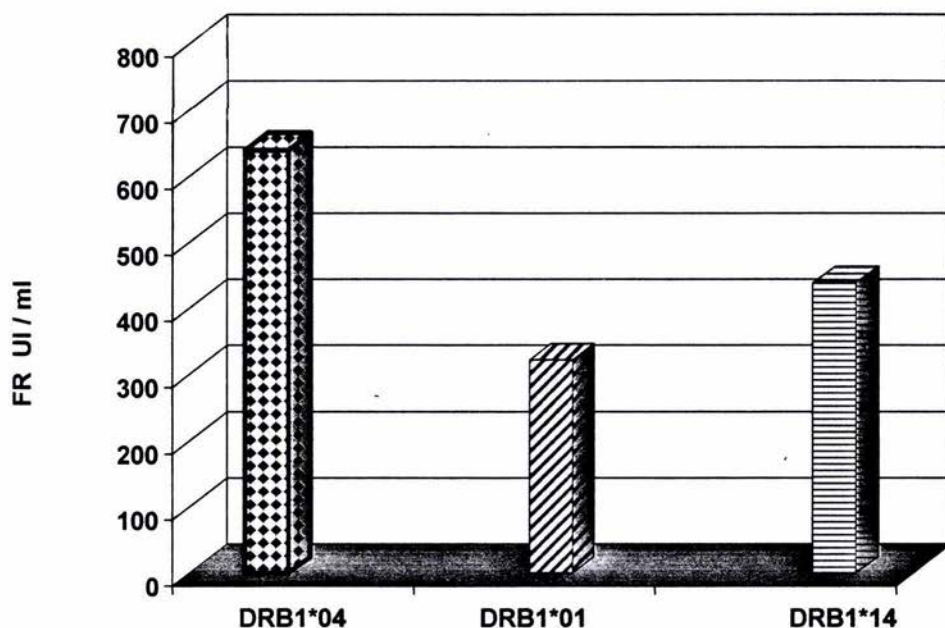
c. Protección del locus HLA-DRB1 para el desarrollo de artritis reumatoide.

c.1. HLA-DRB1*07, *08 y *11 protegen para el desarrollo de artritis reumatoide.

En la Tabla 6 se muestra la frecuencia génica de HLA-DRB1 (tipificación por resolución intermedia), y podemos observar que la razón de momios (RM) de HLA-DRB1*07 ($p_c = 0.26$, **RM = 0.35**, IC 95% = 0.12 – 0.87); HLA-DRB1*08 ($p_c = 1.17$, **RM = 0.64**, IC 95% = 0.33 – 1.21) y HLA-DRB1*11 ($p_c = 0.52$, **RM = 0.39**, IC 95% = 0.13 – 0.97) fue menor de

1. lo cual sugiere un efecto protector. Sin embargo, no alcanzan a ser estadísticamente significativos.

Figura 6. Promedio del título de FR en pacientes con AR que presentan sólo una copia del epítopo compartido. Análisis de los pacientes que son DRB1*04, DRB1*01 y DRB1*14.



DRB1*04	Promedio = 640.5, IC 95% = 272.18 – 1008.73
DRB1*01	Promedio = 321.9, IC 95% = -91.09 – 734.82
DRB1*14	Promedio = 439.5, IC 95% = 68.44 – 810.56

En la Tabla 12 se muestran los resultados de la tipificación de alta resolución de HLA-DRB1* 07, *08, *11, y los alelos encontrados en los pacientes fueron los siguientes: HLA-DRB1*0701, HLA-DRB1*0802, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB1*1104. Todos estos alelos codifican para el aminoácido ácido aspártico en la posición 70 de la cadena β (D^{70+}) de

la molécula HLA-DR, por lo cual comparamos el total de alelos D^{70+} , encontrando una disminución estadísticamente significativa de los alelos que son D^{70+} en pacientes (0.197) vs controles (0.379), ($p_c = 0.003$, RM = 0.4, IC 95% = 0.24 – 0.66; Tabla 12). Asimismo, encontramos una disminución en la proporción de pacientes que presentan al menos un alelo D^{70+} en pacientes (0.369) vs controles (0.626) siendo ésta estadísticamente significativa ($p_c = 0.001$, RM = 0.4, IC 95% = 0.2 – 0.7 ; Tabla 13). Además, la proporción de pacientes que llevan dos copias del alelo D^{70+} (0.02) se encontró disminuida al compararla con los controles (0.13), siendo estadísticamente significativa ($p_c = 0.02$, RM = 0.19, IC 95% = 0.19 – 0.74). Las características clínicas y demográficas de los pacientes que presentan al menos un alelo D^{70+} se muestran en la Tabla 14, no encontrándose ninguna diferencia estadísticamente significativa.

b. HLA-DQB1 y susceptibilidad al desarrollo de artritis reumatoide.

El estudio de los genes *clase II* de la región del MHC se extendió al locus HLA-DQB1, localizado hacia el centrómero en relación al locus HLA-DRB1 (Figura 1). La frecuencia alélica del locus HLA-DQB1 se muestra en la Tabla 15. Encontramos un incremento en la frecuencia del alelo HLA-DQB1*0302 en los pacientes con AR (0.387) al comparar con el grupo control (0.242), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p_c = 0.03$, RM = 1.97, IC 95% = 1.23 – 3.17). Por otro lado, la frecuencia de del alelo HLA-DQB1*0201 se encuentra disminuida en los pacientes (0.071) vs controles (0.167), aunque el valor de p , después de la corrección deja de ser estadísticamente significativo, la razón de momios y los intervalos de confianza están por debajo de la unidad ($p_c = 0.06$, RM = 0.38, IC 95% = 0.17 – 0.8; Tabla 15), lo que sugiere un factor de protección para el desarrollo de artritis reumatoide.

Tabla 12. Alelos HLA-DRB1*07, *08, y *11 en mestizos mexicanos con artritis reumatoide y controles sanos.

	Pacientes 168		Controles 198		P	RM	IC 95 %
	n	fg	n	fg			
DRB1*08							
*0802	19	0.113	30	0.150			
*0804	0	0.000	3	0.015			
DRB1*07							
*0701	7	0.042	22	0.111			
DRB1*11							
*1101	5	0.030	12	0.060			
*1104	2	0.018	4	0.020			
*1102	0	0.000	3	0.015			
*1103	0	0.000	1	0.005			
Total	33	0.197	75	0.379	0.0001*	0.4	0.24 – 0.66

* $P_c = 0.003$

Tabla 13. Proporción de pacientes que presentan por lo menos un alelo D⁷⁰⁺ en pacientes con AR y en controles sanos.

	Pacientes n = 84		Controles n = 99		P	RM	IC 95 %
	n	f	n	f			
D ⁷⁰⁺	31	0.369	62	0.626	0.0006*	0.4	0.2 – 0.7
D ⁷⁰⁻	53	0.631	37	0.374			

* $p_c = 0.001$

Tabla 14. Características clínicas y demográficas de los pacientes con AR que presentan al menos un alelo D⁷⁰⁺.

Características	D ⁷⁰⁺ n = 31	D ⁷⁰⁻ n = 53
Genero, Femenino n (%) Masculino n (%)	28 (38.9) 3 (25)	44 (61.1) 9 (75)
Edad, promedio ± DE años	40.9 ± 17.1	38.3 ± 13.3
Duración de la enfermedad, Promedio ± DE meses	17.3 ± 6.2	16.3 ± 4.8
Educación formal, Promedio ± DE años	9.1 ± 4.3	10.3 ± 8.9
Factor reumatoide +, n (%)	26 (36.6)	45 (63.4)
HAQ, promedio ± DE Rango 0 – 3	0.81 ± 0.57	0.79 ± 0.68
DAS, promedio ± DE	3.5 ± 1.2	3.3 ± 1.2
Título de factor reumatoide, Promedio ± DE UI/ ml	485.8 ± 673.2	437.4 ± 705.2

DE = desviación estándar , HAQ = Cuestionario de evaluación de la función física,
DAS = Escala de evaluación de la actividad.

En la Tabla 16 se muestran los valores de D y D' (ver materiales y métodos) , que son los dos métodos estadísticos que se utilizaron en este trabajo para determinar los patrones de LD para cada par de loci, en nuestra población de mestizos mexicanos. Así, en la Tabla 16 podemos observar el patrón de LD para los haplotipos HLA-DRB1-DQB1 más representativos que se encontraron en nuestra población de mestizos mexicanos, destacando que el alelo HLA-DQB1*0302 se encuentra en LD con HLA- DRB1*0407 ($D = 0.0798$, $D' = 1$), DRB1*0404 ($D = 0.0342$, $D' = 1$), DRB1*0403 ($D = 0.0152$, $D' = 1$),

DRB1*0411 ($D = 0.0114$, $D' = 1$) y DRB1*0405 ($D = 0.0076$, $D' = 1$). Por otro lado, el alelo HLA-DQB1*0201 se encuentra en LD con DRB1*0701 ($D = 0.0926$, $D' = -1$). En la Tabla 17 se muestra la frecuencia de los haplotipos HLA-DRB1-DQB1 en los pacientes con AR y controles.

Tabla 15. Frecuencia génica (*fa*) de los alelos del locus HLA-DQB1 en pacientes Mestizos Mexicanos con AR y controles sanos.

HLA-DQB1	Pacientes 168		Controles 198		P	RM	IC 95 %
	n	fa	n	fa			
HLA-DQB1*0302	65	0.387	48	0.242	0.003*	1.97	1.23 – 3.17
HLA-DQB1*0301	24	0.143	33	0.167	NS		
HLA-DQB1*0402	19	0.113	33	0.167	NS		
HLA-DQB1*0501	17	0.101	12	0.061	NS		
HLA-DQB1*0201	12	0.071	33	0.167	0.006**	0.38	0.17 – 0.8
HLA-DQB1*0602	11	0.065	15	0.076			
HLA-DQB1*0503	10	0.060	9	0.015			
HLA-DQB1*0502	6	0.036	4	0.020			
HLA-DQB1*0603	3	0.018	4	0.020			
HLA-DQB1*0604	1	0.006	3	0.015			

* $p_c = 0.03$, ** $p_c = 0.06$

Podemos observar que la frecuencia del haplotipo HLA-DRB1*0404-DQB1*0302 se encuentra incrementada en pacientes (0.161) vs controles (0.045), siendo ésta estadísticamente significativa ($p_c = 0.006$, $RM = 4.2$, $IC\ 95\ \% = 1.85 - 10.45$; Tabla 17) Asimismo, la frecuencia del haplotipo HLA-DRB1*0701-DQB1*0201 se encuentra

disminuida en pacientes al comparar con los controles 0.042 y 0.011, respectivamente, pero sin ser estadísticamente significativa después de la corrección ($p_c = 0.62$, $RM = 0.35$, IC 95% 0.12 – 0.87; Tabla 17). Sin embargo, como podemos observar en la Tabla 7 la frecuencia del alelo DRB1*0404 (0.161) y la frecuencia del haplotipo HLA-DRB1*0404-DQB1*0302 (0.161; Tabla 17) es la misma. Lo mismo ocurre para las frecuencias del alelo HLA-DRB1*0701 (0.042) y del haplotipo HLA-DRB1*0701-DQB1*0302 (0.042).

Tabla 16. Desequilibrio de unión entre los loci HLA-DRB1 y DQB1 en la población de Mestizos Mexicanos. Valores de D , D' y de p

Haplotipos DRB1 – DQB1	D	D'	p
DRB1*0101-DQB1*0501	0.0281	0.8479	0.0000
DRB1*0103-DQB1*0501	0.0142	1.0000	0.0000
DRB1*03-DQB1*0201	0.0463	1.0000	0.0000
DRB1*0407-DQB1*0302	0.0798	1.0000	0.0000
DRB1*0404-DQB1*0302	0.0342	1.0000	0.0000
DRB1*0403-DQB1*0302	0.0152	1.0000	0.0004
DRB1*0405-DQB1*0302	0.0076	1.0000	0.0132
DRB1*0411-DQB1*0302	0.0114	1.0000	0.0023
DRB1*0701-DQB1*0201	0.0926	1.0000	0.0000
DRB1*0802-DQB1*0402	0.1305	1.0000	0.0000
DRB1*1101-DQB1*0301	0.0427	0.8942	0.0000
DRB1*1104-DQB1*0301	0.0159	1.0000	0.0001
DRB1*1402-DQB1*0301	0.0279	1.0000	0.0000
DRB1*1401-DQB1*0503	0.0239	1.0000	0.0000
DRB1*1407-DQB1*0503	0.0119	1.0000	0.0008
DRB1*1406-DQB1*0301	0.0069	0.5769	0.0523
DRB1*1501-DQB1*0602	0.0420	1.0000	0.0000
DRB1*1502-DQB1*0602	0.0089	0.6393	0.0001

Sólo están representados los haplotipos con LD significativo (valor de p)

Tabla 17. Frecuencia de los haplotipos (*fh*) HLA-DRB1-DQB1 en pacientes con artritis reumatoide y controles sanos en una población de Mestizos Mexicanos.

Haplotipos DRB1 – DQB1	Pacientes n = 168		Controles n = 198		p	RM	IC95%
	n	fh	n	fh			
DRB1*0101-DQB1*0501	9	0.053	6	0.030			
DRB1*0103-DQB1*0501	3	0.012	3	0.015			
DRB1*03-DQB1*0201	5	0.030	11	0.055			
DRB1*0404-DQB1*0302	27	0.161	9	0.045	0.0002*	4.2	1.85 – 10.47
DRB1*0407-DQB1*0302	12	0.071	21	0.106			
DRB1*0405-DQB1*0302	11	0.065	4	0.020			
DRB1*0403-DQB1*0302	6	0.036	2	0.010			
DRB1*0411-DQB1*0302	5	0.030	2	0.010			
DRB1*0701-DQB1*0201	7	0.042	22	0.111			
DRB1*0802-DQB1*0402	19	0.113	31	0.157			
DRB1*1101-DQB1*0301	7	0.042	11	0.055			
DRB1*1104-DQB1*0301	0	0.000	4	0.020			
DRB1*1402-DQB1*0301	6	0.036	7	0.035			
DRB1*1401-DQB1*0503	6	0.036	6	0.030			
DRB1*1407-DQB1*0503	4	0.024	3	0.015			
DRB1*1406-DQB1*0301	2	0.012	2	0.010			
DRB1*1501-DQB1*0602	7	0.042	9	0.045			
DRB1*1502-DQB1*0602	0	0.000	2	0.010			

* $p_c = 0.006$, ** $p_c = 0.62$

e. La asociación de susceptibilidad de los loci HLA-DRB1 y HLA-DQB1 para el desarrollo de AR es independiente.

Hasta el momento, tomando por separado los resultados de los loci HLA-DRB1 y HLA-DQB1, podríamos decir que ambos loci influyen en la susceptibilidad o protección al

desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, analizando los dos loci como haplotipos podemos ver que la frecuencia del alelo HLA-DRB1 asociado con susceptibilidad, es la misma que la frecuencia del haplotipo HLA-DQB1-DQB1 de susceptibilidad, de igual manera los valores de p , RM e IC 95 % son muy parecidos (Tablas 7 y 17), por lo cual surge la pregunta de si uno de los dos loci puede ser un factor de confusión que sea originado por el fuerte desequilibrio de unión que existe entre ambos loci. Para responder esta pregunta se utilizó la prueba de Mantel-Haenszel (MH), donde se estratifican los pacientes como se describe a continuación.

En la Tabla 18a se observa el número de pacientes de acuerdo al genotipo del locus HLA-DQB1*0302 y a la presencia o ausencia de alelos HLA-DRB1*04 que codifican para el epítipo compartido; con dichos datos se elaboraron dos tablas de 2 x 2 para calcular la RM, la primera donde se comparan los individuos que presentaron por lo menos un alelo HLA-DRB1*04 que codifica para el EC [DRB1*04(EC+) / 04(EC+) y DRB1*04(EC+) / EC-] vs (EC- / EC-) en pacientes y controles, en el grupo de individuos que fueron positivos para un alelo HLA-DQB1*0302 [DQB1*0302-0302 y DQB1*0302-X], (RM = 3.3 IC 95 % 1.3 – 8.1; Tabla 18b). En la segunda tabla se comparan los individuos que presentaron por lo menos un alelo HLA-DRB1*04 que codifica para el EC [DRB1*04(EC+) / 04(EC+) y DRB1*04(EC+) / EC-] vs (EC- / EC-) en pacientes y controles, pero ahora en el grupo de pacientes que fueron negativos para el alelo HLA-DQB1*0302 (RM = 2.1 IC 95 % = 0.03 – 168.56). La diferencia de la RM entre ambas tablas de 2X2 no fue estadísticamente significativa ($p = 0.3505$) lo que sugiere que no hay un efecto sinérgico entre estos loci en la susceptibilidad al desarrollo de AR. El valor de la razón de momios obtenida por el método de MH (RM = 2.8, IC95% 1.4 – 5.5; Tabla 18b) fue diferente al

obtenido en el grupo que fue HLA-DQB1*0302 positivo (RM = 3.3) y en el grupo de HLA-DQB1*0302 negativo (RM = 2.1), lo cual sugiere que no hay efecto de confusión del locus HLA-DQB1 o HLA-DRB1, y que la asociación de ambos loci con riesgo a desarrollar AR es independiente.

Tabla 18a. Distribución de HLA-DQB1*0302 genotipos en pacientes con AR y controles de acuerdo a la presencia o ausencia de alelos HLA-DRB1*04 que codifican para el epítipo compartido (EC)

Genotipo	DQB1*0302-0302 n	DQB1*0302-x n	DQB1* x-x n
Pacientes			
DRB1*04(EC+) / 04(EC+)	2	0	0
DRB1*04(EC+) / EC -	5	31	0
EC - / EC -	1	15	27
Controles			
DRB1*04(EC+) / 04(EC+)	0	0	0
DRB1*04(EC+) / EC -	6	10	0
EC - / EC -	2	24	57

Tabla 18b. Razón de momios de los genotipos [DRB1*04(EC+) / 04(EC+) y DRB1*04(EC+) / EC-] vs (EC- / EC-) en pacientes y controles, de acuerdo a los subgrupos [DQB1*0302-0302 y DQB1*0302-X] y DQB1* X-X. El símbolo X denota la ausencia del alelo HLA-DQB1*0302.

DRB1*04(EC+) / 04(EC+) y DRB1*04(EC+) / EC- vs EC- / EC-	RM	IC 95 %
DQB1* X-X	2.1	0.03 – 168.56
DQB1*0302-0302 y DQB1*0302-X	3.3	1.3 – 8.1
Mantel-Haenszel	2.8	1.4 – 5.5

El análisis de MH también se llevó a cabo tomando en cuenta la presencia o ausencia del EC independientemente del alelo HLA-DRB1 que lo codifica. En la tabla 19a se muestra la distribución de los genotipos HLA-DQB1*0302, de acuerdo al EC. Se elaboraron dos tablas de 2X2 para obtener la RM; en la primera se compararon los individuos que presentaron por lo menos un EC (EC+ / EC+ y EC+ / EC-) vs los que fueron negativos para el EC (EC - / EC -) en pacientes y controles, pero solo en los que presentaron un alelo HLA-DQB1*0302 [DQB1*0302-0302 y DQB1*0302-X] (RM = 4.2, IC95% = 1.6 – 10.7; tabla 19b). En la segunda tabla de 2X2 se compararon los individuos que presentaron por lo menos un EC (EC+ / EC+ y EC+ / EC-) vs los que fueron negativos para el EC (EC - / EC -) pero ahora en los que fueron negativos para el alelo HLA-DQB1*0302 (RM = 2.2, IC95% = 0.8 – 6.2; Tabla 19b). Al comparar la razón de momios de ambas tablas, encontramos que la diferencia no es estadísticamente significativa (p = 0.3196), sugiriendo que no existe un efecto sinérgico entre ambos loci. El valor de la razón de momios obtenida por el método de MH (RM = 3.1, IC95% = 1.7 – 5.8 ; Tabla 19b) fue diferente al obtenido en el grupo que fue HLA-DQB1*0302 positivo (4.2) y al obtenido en el grupo que fue HL-DQB1*0302 negativo (2.2), lo que sugiere la ausencia de un factor confusión entre ambos loci. Así podemos decir que el efecto de susceptibilidad de HLA-DQB1*0302 es independiente del efecto de HLA-DRB1, ya sea analizándolo sólo como subtipos de HLA-DRB1*04 que codifican para el epítipo compartido, o bien como epítipo compartido independientemente del alelo HLA-DRB1 que lo codifique.

Tabla 19a . Distribución de HLA-DQB1*0302 genotipos en pacientes con AR y controles de acuerdo a la presencia o ausencia del epítipo compartido (EC).

Genotipo	DQB1*0302-0302 n	DQB1*0302-x n	DQB1* x-x n
Pacientes			
EC+ / EC+	2	8	1
EC+ / EC-	5	26	12
EC- / EC-	1	15	14
Controles			
EC+ / SE+	0	1	0
EC+ / SE-	5	10	17
EC- / SE-	10	16	40

Tabla 19b. Razón de momios al comparar [(EC+ / EC+) y (EC+ / EC-)] vs (EC- / EC-) en pacientes y controles, de acuerdo a los subgrupos [DQB1*0302-0302 y DQB1*0302-X] y DQB1* X-X. El símbolo X denota la ausencia del alelo HLA-DQB1*0302.

EC+ / EC+ y EC+ / EC- vs EC- / EC-	RM	IC 95 %
DQB1* X-X	2.2	0.8 – 6.2
DQB1*0302-0302 y DQB1*0302-X	4.2	1.6 – 10.7
Mantel-Haenszel	3.1	1.7 – 5.8

f. HLA-DQB1 y características clínicas.

Una vez demostrado que la asociación de HLA-DQB1*0302 con susceptibilidad al desarrollo de AR es independiente de los alelos HLA-DRB1 que codifican para el EC, se analizaron las características demográficas y clínicas de los pacientes de acuerdo a la ausencia o presencia del alelo HLA-DQB1*0302. Cuarenta y ocho pacientes con AR (84.2 %) fueron mujeres en el grupo que presentó por lo menos un alelo HLA-DQB1*0302, y en el grupo que fue negativo para el alelo HLA-DQB1*0302, el 88.9 % fueron mujeres (Tabla 20). El FR fue positivo en un 87.7 % en el grupo HLA-DQB1*0302 positivo y 77.8

% fue FR positivo en el grupo HLA-DQB1*0302 negativo. Igualmente, el porcentaje de pacientes que tomaba metotrexate o cloroquina fue muy similar en ambos grupos. No hubo diferencia en los valores promedio de meses de evolución de la enfermedad, títulos de FR, HAQ y DAS (Tabla 20). Sin embargo, el promedio de edad al inicio de la enfermedad fue menor en el grupo de pacientes con AR que presentó al menos un alelo HLA-DQB1*0302 (37.0 ± 13.8), al comparar con el grupo que fue HLA-DQB1*0302 negativo (44.0 ± 15.9), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.04$; t de Student).

Tabla 20. Características clínicas y demográficas de los pacientes con AR que presentan al menos un alelo HLA-DQB1*0302.

Características	HLA-DQB1*0302 n = 57	HLA-DQB1-X n = 27
Genero, Femenino n (%) Masculino n (%)	48 (84.2) 9 (15.8)	24 (88.9) 3 (11.1)
Edad, promedio \pm DE años	37.0 \pm 13.8	44.0 \pm 15.9
Duración de la enfermedad, Promedio \pm DE meses	16.5 \pm 8.0	17.1 \pm 6.5
Educación formal, Promedio \pm DE años	9.3 \pm 4.3	11.0 \pm 5.2
Factor reumatoide +, n (%)	50 (87.7)	21 (77.8)
HAQ, promedio \pm DE Rango 0 – 3	0.82 \pm 0.66	0.76 \pm 0.59
DAS, promedio \pm DE	3.5 \pm 1.2	3.1 \pm 0.92
Título de factor reumatoide, Promedio \pm DE UI/ ml	508.8 \pm 791.0	342.2 \pm 390.0

DE = desviación estándar , HAQ = Cuestionario de evaluación de la función física,
DAS = Escala de evaluación de la actividad.

g. Región de clase III del complejo principal de histocompatibilidad y su asociación con artritis reumatoide.

g.1 TNF- α y artritis reumatoide.

Se analizaron los polimorfismos -238 y -308 de la región promotora del TNF- α . La distribución de los alelos y genotipos del polimorfismo -238 se muestra en la Tabla 21a, donde se observa que hay un ligero incremento del heterocigoto (G / A) en los pacientes (0.214) al comparar con los controles (0.131), aunque no alcanza a ser estadísticamente significativa. Además, se encontró un incremento en la frecuencia del alelo A en los pacientes con AR (0.143) vs controles (0.076), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.04$), aunque se pierde ligeramente después de la corrección ($p_c = 0.08$, RM = 2.0, IC95% = 1.0 – 4.32; Tabla 21a). Por otro lado, la proporción de pacientes que presentan al menos un alelo A se encuentra incrementada en pacientes (25 %) vs controles (14 %), sin alcanzar a ser estadísticamente significativa ($p_c = 0.12$, RM = 2.0, IC95% = 1.0 – 4.06; Tabla 21b). La proporción de mujeres, porcentaje de FR +, pacientes que tomaban metotrexate o cloroquina no fue diferente entre los pacientes que presentaron al menos un alelo A vs los que no presentaron el alelo A. El valor promedio de edad, meses de evolución de la enfermedad, HAQ, DAS y títulos de FR no fue diferente en ambos grupos. Al analizar la tendencia de la razón de momios de las diferentes variables cuantitativas de acuerdo a la presencia o ausencia del alelo A del polimorfismo -238 del TNF- α , se encontró un incremento en la proporción del alelo TNF238A y valores por debajo de la media del índice DAS que mide actividad de la enfermedad ($p_c = 0.06$, RM = 3.1, IC95% = 1.0 – 11.03; Tabla 22).

Tabla 21a. Frecuencias de alelos y genotipo del polimorfismo -238 de la región promotora del TNF- α en pacientes con AR mestizos mexicanos y controles.

TNF -238	Pacientes con AR n = 84		Controles n = 99		p	RM	IC 95 %
	n	f	n	f			
Genotipos							
G / G	63	0.750	85	0.859			
G / A	18	0.214	13	0.131			
A / A	3	0.036	1	0.010			
Alelos							
G	144	0.857	183	0.924	0.04*	2.0	1.0 – 4.32
A	24	0.143	15	0.076			

* $p_c = 0.08$

Tabla 21b. Proporción de pacientes con al menos un alelo A del polimorfismo -238 del TNF-238 en pacientes mestizos mexicanos y controles.

TNF -238	Pacientes con AR n = 84		Controles n = 99		p	RM	IC 95 %
	n	(%)	n	(%)			
G / G	63	(75)	85	(86)			
G / A A / A	21	(25)	14	(14)	0.06*	2	0.9 - 4.06

* $p_c = 0.12$

El análisis de LD mostró que el alelo *TNFA238* se encuentra en desequilibrio de unión con el alelo HLA-DRB1*0701 ($D = 0.04209$, $D' = 0.6249$, $p = 0.00000$) y con HLA-DRB1*1401 ($D = 0.0129$, $D' = 0.4590$, $p = 0.00007$). Sin embargo la frecuencia del haplotipo HLA-DRB1*0701-TNF-238A no fue estadísticamente diferente entre pacientes con AR (0.042)

vs controles (0.061). Asimismo, la frecuencia del haplotipo HLA.DRB1*1401-TNF-238A no fue estadísticamente diferente al comparar pacientes (0.036) vs controles (0.015).

Con relación al polimorfismo -308 de la región promotora del TNF α la distribución de los genotipos y alelos fue muy similar entre pacientes y controles; estos resultados se muestran en la Tabla 23.

Tabla 22. Proporción de pacientes con al menos un alelo -238 A en pacientes con artritis reumatoide, de acuerdo al valor del índice DAS.

Categoría de acuerdo a los valores del índice DAS	Pacientes -238 A (+) n = 21		Pacientes -238 A (-) n = 63		p	OR	CI 95 %
	n	(%)	n	(%)			
0 – 3.25	15	(71)	28	(44)	0.03*	3.1	1.0 – 11.03
> 3.25	6	(29)	35	(56)			

* p_c = 0.06

Tabla 23. Frecuencias de alelos y genotipo del polimorfismo -308 de la región promotora del TNF- α en pacientes con AR mestizos mexicanos y controles.

TNF -308	Pacientes con AR n = 84		Controles n = 99		p	RM	IC 95 %
	n	f	n	f			
Genotipos							
G / G	78	0.928	93	0.939	NS		
G / A	5	0.060	13	0.061	NS		
A / A	1	0.012	0	0.000	NS		
Alelos							
G	161	0.958	186	0.939	NS		
A	7	0.042	12	0.061	NS		

g.2 HSP70-hom y susceptibilidad al desarrollo de artritis reumatoide.

En el presente estudio no se encontró asociación del locus HSP70-hom con susceptibilidad al desarrollo de artritis reumatoide. La distribución de los genotipos y alelos fue muy similar tanto en pacientes como en controles; los resultados se muestran en la Tabla 24. Tampoco se encontraron diferencias en las características demográficas y clínicas en los pacientes de acuerdo a la presencia o ausencia del alelo B (alelo mutado) de HSP70-hom.

Tabla 24. Frecuencias de alelos y genotipo del polimorfismo HSP70-hom en pacientes mestizos mexicanos y controles.

HSP70-hom	Pacientes con AR n = 84		Controles n = 99		P	OR	IC 95 %
	n	f	n	f			
Genotipo							
AA	48	0.571	59	0.595	NS		
AB	29	0.345	35	0.354	NS		
BB	7	0.084	5	0.051	NS		
Alelo							
A	129	0.744	153	0.773	NS		
B	43	0.256	45	0.227	NS		

9. DISCUSIÓN.

En el presente estudio se demuestra una asociación de la región de clase II del MHC con susceptibilidad al desarrollo de la artritis reumatoide (AR) en mestizos mexicanos, donde el efecto del locus HLA-DRB1 es independiente del efecto de HLA-DQB1. Por otro lado, también se demuestra una asociación del polimorfismo -238 de la región promotora del TNF- α .

Los datos muestran una clara asociación del epítipo compartido (EC) con la susceptibilidad al desarrollo de AR, ya que hay un incremento en la proporción de pacientes (0.643) que presentan por lo menos un alelo HLA-DRB1 que codifica para EC (EC+) vs controles (0.303). El análisis de las características demográficas y clínicas de acuerdo a la presencia o ausencia de HLA-DRB1 EC+ reveló que hay un incremento en el valor promedio del título de FR en pacientes que fueron EC+ vs los que no presentaron un alelo que codifique para el EC (EC-), pero esto no fue estadísticamente significativo. Sin embargo, sí hay un claro incremento en la proporción de pacientes que son EC+ con los niveles más elevados del título de FR (> 224 UI/ml). No hubo diferencia en las proporciones y valores promedio de las otras variables estudiadas. Asimismo, la proporción de individuos con dos copias del EC (EC+ / EC+) está incrementada en los pacientes (0.143) al comparar con controles (0.010), las características clínicas y demográficas de los pacientes que presentaron dos copias del EC (EC+ / EC+) no fueron diferentes de los pacientes que sólo presentaron una copia del EC (EC+ / EC-). Estudios previos han demostrado que la dosis del EC+ modifica la expresión de la enfermedad, por ejemplo: la presencia de 2 copias del EC+ se ha asociado a mayor daño articular y

manifestaciones extra-articulares como el síndrome de Felty, vasculitis y nódulos reumatoides^{100,101}.

Así como la dosis del EC+ influye en la expresión de la enfermedad, también lo hace el tipo de alelo HLA-DRB1 que codifica para el EC, ya que adicional a la presencia de dos copias del EC+, los individuos que son HLA-DRB1*0401-0401 cursan con una enfermedad más agresiva que los que son HLA-DRB1*0401-0404, DRB1*0404-0404 o DRB1*0404-0101, y en general los subtipos moleculares de HLA-DRB1*04 EC+ cursan con una enfermedad mas agresiva que los que son HLA-DRB1*01 EC+^{102,103}. En la población de mestizos mexicanos con AR, los alelos HLA-DRB1 más frecuentes que codifican para el EC, fueron los siguientes: HLA-DRB1*0404 (0.161), DRB1*0405 (0.065) y DRB1*0101 (0.065). Interesantemente se detectaron tres pacientes con alelos HLA-DRB1*0102 (0.018); este alelo, hasta el momento no ha sido detectado en la población de mestizos mexicanos (controles). Al analizar las características demográficas y clínicas de los pacientes con AR, de acuerdo al alelo HLA-DRB1 que codifica para el EC, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, aunque el valor promedio del título de FR en los individuos que presentan un subtipo HLA-DRB1*04 que codifican para el EC, es mayor que los que son HLA-DRB1*0101, DRB1*0102, DRB1*1402 o DRB1*1406.

En nuestra población, la presencia de dos copias de EC no influye en la gravedad de la enfermedad, así como tampoco el tipo de alelo HLA-DRB1 que codifica para el EC. Los resultados del presente estudio corroboran que los individuos que son HLA-DRB1 EC+ tienen un riesgo mayor para el desarrollo de artritis reumatoide, y que la presencia del EC+ está asociada con los títulos altos de FR, lo cual sugiere que los individuos que son HLA-DRB1 EC+ pueden cursar con una enfermedad más agresiva. Sin embargo, la

ausencia de diferencias significativas en los valores de las variables demográficas, clínicas y más importante en los títulos de FR entre los pacientes que fueron EC+ / EC+ y los que fueron EC+ / EC-, puede ser explicada por la combinación de los diferentes alelos HLA-DRB1, ya que del total de pacientes con 2 copias de EC+, el 0.333 fue una combinación de HLA-DRB1*0404-0101 y el resto, fue una combinación de HLA-DRB1*0404 ó HLA-DRB1*0405 con HLA-DRB1*0101, DRB1*0102 , DRB1*1402 y DRB1*1001.

En poblaciones caucásicas y asiáticas, la combinación de HLA-DRB1*0401 con cualquier otro subtipo de HLA-DRB1*04, DRB1*01 y DRB1*14 que codifica para el EC, se ha asociado con mayor gravedad de la enfermedad manifestada por daño articular importante y manifestaciones extraarticulares^{104,105}. De igual forma. en los individuos EC+ / EC-, el valor promedio en los títulos de FR fue mayor en los individuos que presentaron un subtipo HLA-DRB1*04 que codifica para el EC, pero no fue estadísticamente significativa la diferencia al comparar con los individuos que presentaron otro alelo HLA-DRB1 EC+.

Tanto en los individuos que fueron EC+ / EC+, como los que fueron EC+ / EC-, el alelo más frecuente fue el HLA-DRB1*0404. La frecuencia incrementada del alelo HLA-DRB1*0404 en los pacientes mestizos mexicanos con AR, sugiere que los genes autóctonos pueden ser importantes en el desarrollo de AR, ya que este alelo es el más frecuente en las poblaciones de mestizos mexicanos, e indígenas nahuas y mazatecos¹⁰⁶. Adicional al componente autóctono, debido a la presencia de HLA-DRB1*0404, en nuestra población se puede observar un efecto de otros genes adquiridos por mestizaje, dado principalmente por los alelos HLA-DRB1*0405, DRB1*0101 y DRB1*0102; los dos

primeros se encuentran en frecuencias muy bajas en la población de mestizos mexicanos y el último no ha sido detectado en población sana. Estos alelos probablemente se adquirieron a través de la hibridación de la población mexicana con otros grupos étnicos, dando origen a los mestizos mexicanos. Los resultados corroboran los hallazgos de Debaz *et al*¹⁰⁷ (HLA-DRB1*0404), en una población de mexicanos con AR. En contraste a los hallazgos en pacientes mexicano-americanos de Starr County en el estado de Texas, reportados por Del Rincón *et al*¹⁰⁸, que encuentran una asociación de HLA-DRB1*1402 con susceptibilidad al desarrollo de AR, en este estudio no encontramos dicha asociación. Esta diferencia puede explicarse debido a que la estructura genética de los mestizos mexicanos es diferente a la encontrada en los mexicano-americanos, compuesta en un 61 % por genes españoles, un 31 % por genes de nativos de América (indígenas Pima o Papago) y un 8% de genes africanos¹⁰⁹, por lo que los hallazgos de Del Rincón pueden ser atribuidos a la influencia de genes de los nativos de América (Tinglits, Yakima o Pima), ya que la asociación de HLA-DRB1*1402 con susceptibilidad al desarrollo de AR se ha reportado en poblaciones indígenas Yakima y Pima^{110,111}.

En el presente estudio se corroboró el efecto de protección de los alelos HLA-DRB1 que codifican para el ácido aspártico en la posición 70 (D⁷⁰⁺), ya que la proporción de pacientes con AR que presentan al menos una alelo D⁷⁰⁺ (0.369) está disminuida de manera muy importante al comparar con los controles (0.626). De los alelos que codifican para HLA-DRB1 D⁷⁰⁺, el más importante fue el DRB1*0701 (0.042) vs (0.111) , seguido del DRB1*1101 (0.042) vs (0.060) y finalmente el HLA-DRB1*0802 (0.113) vs (0.150). Si bien los alelos HLA-DRB1 confieren un factor de protección, estos no influyen en la expresión de la enfermedad, pues no hay diferencias estadísticamente significativas en las variables demográficas y clínicas entre los individuos HLA-DRB1 D⁷⁰⁺ y los que son

HLA-DRB1 D⁷⁰⁻, así como tampoco existen diferencias separando a los pacientes de acuerdo al alelo HLA-DRB1 que codifique para D⁷⁰⁺.

La región que abarca del aminoácido de la posición 70 a la posición 74 de la cadena β de la molécula HLA-DR es muy importante para la susceptibilidad o protección al desarrollo de AR. En relación con susceptibilidad la región conocida como epítipo compartido, que incluye los aminoácidos QRRAA o QKRAA (Tabla 2), de acuerdo al alelo HLA-DRB1 que lo codifique, se han propuesto varios modelos para explicar su rol en la patogénesis de la artritis reumatoide:

a) Péptidos artritogénicos específicos se unen al EC. Los péptidos artritogénicos poseen una secuencia específica de aminoácidos en las cadenas laterales correspondiendo a la posición 4 del péptido antigénico, y a su vez corresponde con uno de los bolsillos ("pocket") localizado en el surco de unión al péptido de las moléculas *clase II*. Péptidos antigénicos con aminoácidos de carga negativa (ácido glutámico y ácido aspártico) en la posición 4 del péptido, se unen de manera eficiente para alelos que contienen arginina (R) o lisina (K) en la posición 71 de la cadena DR β . Por otro lado, los aminoácidos con cargas positivas (arginina y lisina) en la posición 4 del péptido, no se unen a los alelos HLA-DRB1 que codifican para el EC¹¹²⁻¹¹⁴.

b) Existe un reconocimiento directo del receptor de células T (TCR) por el epítipo compartido localizado en la alfa-helice de la cadena β en la molécula HLA-DR. Este modelo se basa en las observaciones de que las posiciones 70 y 74 del EC juegan un papel importante en la interacción con el TCR, independientemente del antígeno unido a la molécula de HLA-DR. Experimentos de mutagénesis dirigida, donde se alteran los sitios polimórficos 70 o 74 del EC en una molécula HLA-DRB1*0404, han demostrado ser

suficientes para disminuir el reconocimiento por clonas de células T humanas¹¹⁵. Adicionalmente, un modelo gráfico interactivo del complejo trimolecular TCR-péptido-MHC se utilizó para orientar los contactos entre TCR y HLA-DRB1*0404¹¹⁶, demostrando que los contactos más notables fueron las interacciones en la región comprendida entre la posición 67 a 74 de cadena β (donde una red de puentes de hidrógeno que rodea los aminoácidos en las posiciones 70 y 71 del epítipo compartido, potencialmente crea una conformación específica que es reconocida por las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del TCR ; dichas CDR participan en la activación específica de las células T). Estos sitios de interacción detectados por el modelo gráfico correlacionan con elementos V β del TCR en poblaciones oligoclonales de células T que se han encontrado en pacientes con AR. Así, este modelo propone que el epítipo compartido por medio de sus interacciones con el TCR (elementos V β) favorece la expansión oligoclonal de células autorreactivas.

Mecanismos de mimetismo molecular. Existe similitud entre la secuencia del epítipo compartido con varias proteínas, lo que puede desencadenar una reacción cruzada; dentro de éstas se encuentran la proteína gp110 del virus de Epstein-Barr, y la proteína DNA J de *Escherichia coli*^{117,118}.

Con relación al factor de protección que ejercen los alelos HLA-DRB1 D⁷⁰⁺, el ácido aspártico en esta posición modifica la red de puentes de hidrógeno que se están alrededor de los aminoácidos localizados en la posición 70 y 71 del epítipo compartido, lo cual altera los sitios de contacto entre el epítipo compartido y el TCR. Otro mecanismo implicado con este efecto protector es que la cadena β de la molécula de HLA-DR con D⁷⁰⁺ une de manera más eficiente la cadena invariante (Ii) durante la síntesis de moléculas

HLA-DR, lo que resulta en una disminución en la unión de autoantígenos en el surco de la molécula HLA-DR durante su síntesis^{119,120}.

El alelo HLA-DQB1*0302 se asocia con susceptibilidad al desarrollo de artritis reumatoide y se asocia con un inicio de la enfermedad a más temprana edad. Pese a la existencia de un fuerte desequilibrio de unión (LD) entre el locus HLA-DRB1 y el locus HLA-DQB1, la asociación de HLA-DQB1*0302 en este estudio de mestizos mexicanos es independiente de los alelos HLA-DRB1 EC+. Por lo que los haplotipos formados por los loci HLA-DRB1-HLA-DQB1 son importantes en la susceptibilidad al desarrollo de AR. Los alelos que forman los haplotipos HLA-DRB1-DQB1 varían de acuerdo al grupo étnico estudiado. Así, el tipo de haplotipo asociado con susceptibilidad al desarrollo de AR varía de acuerdo al grupo étnico estudiado. Por ejemplo: el haplotipo HLA-DRB1*0401-DQB1*0301 se ha asociado en diferentes poblaciones de caucásicos, además con una enfermedad más agresiva^{121,122}. En nuestra población de mestizos mexicanos con AR, todos los alelos HLA-DRB1*04 EC+ se encuentran en LD con HLA-DQB1*0302, pero el haplotipo más frecuente fue HLA-DRB1*0404-DQB1*0302. El alelo HLA-DQB1*0302 es el alelo HLA-DQB1 más frecuente en la población de mestizos mexicanos, así como en la población indígena de mazatecos, seguido de los alelos HLA-DQB1*0301 y DQB1*0402¹²³. Con relación a los haplotipos HLA-DRB1*04-HLA-DQB1, el haplotipo HLA-DRB1*0407-DQB1*0302 es el más frecuente en la población de mestizos mexicanos y en los indígenas mazatecos, seguido del haplotipo HLA-DRB1*0404-DQB1*0302. Siendo el haplotipo HLA-DRB1*0404-0302 el más frecuente en los pacientes mestizos mexicanos con artritis reumatoide, el papel de genes autóctonos en la susceptibilidad para el desarrollo de artritis reumatoide, es muy importante, tanto a nivel de alelo como de haplotipo.

Las dos moléculas HLA-DR y HLA-DQ son expresadas en las células presentadoras de antígenos, lo que las hace importantes en la presentación de antígenos durante una respuesta inmune. Varios estudios han demostrado la importancia de ambas moléculas en la regulación de la respuesta inmune, por ejemplo se requiere de la participación conjunta de HLA-DR y HLA-DQ para controlar la respuesta inmune contra antígenos de esquistosoma en humanos¹²⁴. De igual forma se ha demostrado que las diferentes combinaciones de las moléculas HLA-DR / HLA-DQ puede favorecer o proteger el desarrollo de enfermedades autoinmunes¹²⁵⁻¹²⁷.

Finalmente, el alelo TNF238A de la región promotora del TNF- α y la proporción de pacientes con al menos un alelo TNF238A tiende a estar incrementado en pacientes al compararse con los controles (el valor de p significativo se pierde después de la corrección). Por otro lado, la proporción de pacientes con al menos un alelo TNF238A se haya incrementada en los pacientes con los valores más bajos del índice DAS, que mide actividad de la enfermedad. El papel del TNF-238A en la susceptibilidad al desarrollo de la artritis reumatoide, parece ser independiente de los alelos HLA-DRB1 EC+, debido a que TNF-238A se haya en LD con HLA-DRB1*0701 y con HLA-DRB1*1401 en nuestra población de mestizos mexicanos y no se encuentran en los pacientes que son HLA-DRB1 EC+.

Como se comentó en la introducción la selección natural es una fuerza evolutiva importante que opera en los genes HLA *clase I y II*, a nivel de locus y a nivel de haplotipo, seleccionando aquellos alelos o haplotipos que codifican para moléculas HLA *clase I y II* que generan una respuesta inmunológica más adecuada ante la invasión de patógenos.

En el presente estudio los haplotipos HLA-DRB1*0407-DQB1*0302 ($D = 0.0798$, $D' = 1.0$), HLA-DRB1*0404-DQB1*0302 ($D = 0.0342$, $D' = 1.0$), HLA-DRB1*0802-DQB1*0402 ($D = 0.1305$, $D' = 1.0$), HLA-DRB1*1402-DQB1*0301 ($D = 0.0279$, $D' = 1.0$), con LD alto se encuentran en la población de mestizos mexicanos (controles sanos) con una frecuencia de 0.106, 0.045, 0.157 y 0.035, respectivamente. La frecuencia de estos haplotipos en la población indígena de Mazatecos es la siguiente: HLA-DRB1*0407-DQB1*0302 (0.283), HLA-DRB1*0404-DQB1*0302 (0.116), HLA-DRB1*0802-DQB1*0402 (0.141) y DRB1*1402-DQB1*0301 (0.041)¹²³. Lo cual sugiere que la selección positiva ha favorecido la permanencia de estos haplotipos, que pueden montar una respuesta inmune optima ante la infección.

La recombinación es variable a lo largo de la región del MHC, dentro del bloque de región de *clase II* que se extiende de HLA-DRB1 a DPB2 la recombinación es alta a nivel del locus TAP2 por la existencia de hot-spots, y es menor en el segmento comprendido entre el locus DRB1 y el locus DQB1. De tal forma que, la persistencia de los haplotipos en nuestra población de mestizos mexicanos, puede ser también favorecida por la recombinación disminuida en el segmento HLA-DRB1-DQB1. Considerando que la población de mestizos mexicanos es el producto de la hibridación con españoles y africanos hace aproximadamente 500 años después de la conquista en el siglo XVI, y que han pasado aproximadamente 20 generaciones (25 años por cada generación⁶⁷) desde entonces, podemos calcular cuantas generaciones se necesitan para que el LD disminuya y pueda alcanzar el equilibrio, en una región donde la recombinación es baja. Con la formula $t = \ln y / \ln (1-c)$ donde t = número de generaciones , \ln = logaritmo

natural, $y = D^* / D$ [(D^* = valor de D al cual se espera que disminuya después de n generaciones) (D = valor de LD con el que se inicia)], c = valor de la recombinación⁶⁷.

Con una recombinación de 0.01 el valor de D de los siguientes haplotipos: HLA-DRB1*0407–DQB1*0302 ($D = 0.0798$), HLA-DRB1*0404–DQB1*0302 ($D = 0.0342$) HLA-DRB1*0802–DQB1*0402 ($D = 0.1305$), HLA-DRB1*1402–DQB1*0301 ($D = 0.0279$,), disminuirá a la mitad en aproximadamente 70 generaciones. Con una recombinación de 0.05, tomaría aproximadamente 14 generaciones en llegar a la mitad del valor de D inicial. Los cálculos anteriores y considerando que probablemente el LD (valor de D) haya sido más alto hace 20 generaciones, sugieren que se necesitan más de 20 generaciones para que un LD tan alto alcance el equilibrio, en una zona donde la recombinación es baja. En conjunto, la selección positiva sobre estos haplotipos, la recombinación baja en esta región, y las pocas generaciones que han pasado desde la conquista, influyen en lo fuerte del desequilibrio de unión en los mestizos mexicanos.

En el caso de los haplotipos HLA-DRB1*0701–TNFA238 ($D = 0.04209$, $D' = 0.6249$) y HLA-DRB1*1401–TNFA238 ($D = 0.0129$, $D' = 0.4590$), formados por un alelo del locus de clase II (DRB1) y un alelo de clase III (TNF- α), el LD no es tan alto como el observado en algunos haplotipos HLA-DRB1–DQB1. El desequilibrio de unión en estos haplotipos puede ser debido al fenómeno de hitchhiking, ya que al operar la selección positiva sobre los alelos HLA-DRB1, origina que se formen haplotipos con genes no-HLA, en este caso con alelos de la región promotora del TNF- α .

10. CONCLUSIONES.

- a. El epítipo compartido (EC) se asocia con susceptibilidad al desarrollo de AR; el alelo HLA-DRB1*0404 es el más frecuente dentro de los alelos HLA-DRB1 que codifican el EC.
- b. Los alelos que codifican para el ácido aspártico en la posición D⁷⁰⁺ (HLA-DRB1*0701, DRB1*0802, DRB1*1101) se asocian con protección para el desarrollo de AR.
- c. El haplotipo HLA-DRB1*0404–DQB1*0302 se asocia con susceptibilidad al desarrollo de AR; este haplotipo es frecuente en las poblaciones indígenas de México y en mestizos mexicanos, lo cual sugiere que los genes autóctonos son importantes en la susceptibilidad al desarrollo de AR.
- d. El locus HLA-DQB1 participa en la susceptibilidad al desarrollo de AR y es independiente de la asociación del locus HLA-DRB1.
- e. El epítipo compartido se asocia con los títulos más altos de FR y el alelo HLA-DQB1*0302 se asocia con un inicio de la enfermedad a más temprana edad.
- f. El alelo TNF238A de la región promotora del TNF- α se asocia con los valores del índice de actividad DAS más bajos.

g. No existe asociación del polimorfismo -308 de la región promotora del TNF- α con susceptibilidad al desarrollo de AR, así como tampoco se detectó una asociación con el gen HSP70-*hom*.

11. BIBLIOGRAFIA:

1. Campbell, R.D., and Trowsdale, J. **Map of the human MHC.** *Immunol Today* 1997; 14:349-352
2. The MHC sequencing consortium: **Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex.** *Nature* 1999; 401:921-923.
3. Beck, S., and Trowsdale, J. **The human major histocompatibility complex: lessons from the DNA sequence.** *Annu. Rev. Genomics Hum Genet.* 2001; 1: 117-1137.
4. Ways, J.P., Coppin, H.L. and Parham, P. **The complete primary structure of HLA-Bw58.** *J Biol Chem.* 1985;260:11924-11933.
5. Wake, C.T. **Molecular biology of the HLA class I and class II genes.** *Mol.Biol.Med* 1896; 1:1-11.
6. Hughes, E.A., Hammond, C., and Cresswell, P. **Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome .** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997;94:1896-1901.
7. Belich, M.P., and Trowsdale, J. **Proteasome and class I antigen processing and presentation.** *Mol. Biol. Rep.*1995; 21:53-56.
8. Denzin, L.K., Hammond, C., and Cresswell, P. **HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II dimmers and facilitates peptide loading.** *Cell* 1995;82:155-165.
9. Nelson, C. A., and Fremont, D.H. **Structural principles of MHC class II antigen presentation.** *Rev Immunogenet.* 1999; 1: 47-59.
10. Murria, J.S. **How the MHC selects Th1/Th2 immunity.** *Immunol. Today* 1998;
11. McDevitt, H., and Chinitz, A. **Genetic control of the antibody response: relationship between immune response and histocompatibility (H-2) type.** *Science* 1969;163:1207-1208.

12. Benacerraf, B., and McDevitt, H. **Histocompatibility-linked immune response genes.** *Science* 1972;175:273-279.
13. Collins, E.J., Garboczi, D.N. and Wiley, D.C. **Tree-dimensional structure of a peptide extending from one end of a class I MHC binding site.** *Nature* 1994;371:626-629.
14. Stern, L.J., Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Urban, R.G., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. **Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide.** *Nature* 1994;368:215-221.
15. Bouneaud, C., Kourilsky, P., and Bousso, P. **Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion.** *Immunity* 2000; 13:829-840.
16. Wood, K.J., and Sakagushi, S. **Regulatory T cells in transplantation tolerance.** *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3:199-210.
17. Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L., and von Boehmer, H. **Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen.** *Nat Immunol.* 2002; 3: 756-763.
18. Urdahl, K.B., Sun, J.C., and Bevan, M.J. **Positive selection of MHC class Ib-restricted CD8(+) T cells on hematopoietic cells.** *Nat Immunol* 2002;3:772-779.
19. Sarantopoulos, S., Linrong, L., and Cantor, H. **Qa-1 restriction of CD8⁺ suppressor T cells.** *J. Clin Invest.* 2004;114:1218-1220.
20. Kwok, W.W., Nepom, G.T., and Raymond, F.C. **HLA-DQ polymorphisms are highly selective for peptide binding interactions.** *J Immunol* 1995; 155:2468-2476.
21. Burns, A.P., Fisher, M., Li, P., Pusey, C.D., and Rees, A.J. **Molecular analysis of HLA class II genes in Goodpasture's disease.** *Q.J. Med.* 1995; 88: 93-100.

22. Santori, F.R., Arsov, I., Lili, M., and Vukmanovi's, S. **Editing Autorreactive TCR Enables Efficient Positive Selection.** *J. Immunol* 2002;169:1729-1734
23. Oldstone, M.B.A. **Molecular mimicry and immune-mediated diseases.** *FASEB J.* 1998; 12:1255-1265.
24. Talbot, P.J. **Virus-induced autoimmunity in multiple sclerosis: the coronavirus paradigm.** *Adv. Clin. Neurosci.*1997; 7:215-233.
25. Walport, M.J., and Lachmann, P.J. **Complement deficiencies and abnormalities of the complement system in systemic lupus erythematosus and related disorders.** *Curr. Opin. Rheumatol.* 1990; 2:661-663.
26. Yamamoto-Furusho, J.K., Uscanga, L.F., Vargas-Alarcon, G., Rodríguez-Perez, J.M., Zúñiga, J., and Granados, J. **Polymorphisms in the promoter region of the tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and the HLA-DRB1 locus in Mexican mestizo patients with ulcerative colitis.** *Immunol Lett.* 2004;95:31-35.
27. Silman, A.J., MacGregor, A.J., and Thomson, W. **Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study.** *Br. J. Rheumatol* 1993;32:903-907.
28. Koumantaki, Y., Giziaki, E., Linos, A., Kontomerkos, A., Kaklamanis, P., Vaiopoulos, G., Mandas, J., and Kaklamani, E. **Family history as a risk factor for rheumatoid arthritis: a case-control study.** *J. Rheumatol.* 1997; 24:1522:1526.
29. Ollier, W., and Thomson, W. **Population genetics of rheumatoid arthritis.** *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 741-79.
30. Stastny P. **Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis.** *J Clin Invest* 1976; 57: 1148-1157.

31. Nepom, G.T., Byers, P., Seyfried, C., Healey, L.A., Wilski, K.R., Stage, D., and Nepom, B.S. **HLA genes associated with rheumatoid arthritis : identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes.** *Arthritis Rheum* 1989; 32: 15-21.
32. Wordsworth, B.P., Lanchbury, J.S.S., Sakkas, L.I., Welsh, K.I., Panayi, G.S., and Bell, J.I. **HLA-DR4 subtype frequency in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the human leukocyte antigen class II region.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 10049-10053.
33. Takeuchi, F., Nakano, K., Matsuta, K., Nabeta, H., Bannai, M., Tanimoto, K., and Ito, K. **Positive and negative association of HLA-DR genotypes with Japanese rheumatoid arthritis.** *Clin Exp Rheumatol* 1996; 14: 17-22.
34. Seglias, J., Li, E.K., Cohen, M.G., Wong, R.W.S., Potter, P.K., and So, A.K. **Linkage between rheumatoid arthritis susceptibility and the presence of HLA-DR4 and DR beta allelic third hypervariable region sequences in southern Chinese persons.** *Arthritis Rheum* 1992;35: 163-167.
35. Hong, G.H., Park, M.H., Takeuchi, F., Oh, M.D., Song, Y.W., Nabeta, H., Nakano, K., Ito, K., and Park, K.S. **Association of specific amino acid sequence of HLA-DR with rheumatoid arthritis in Koreans and its diagnostic value.** *J Rheumatol* 1996; 23: 1699-1703.
36. Yelamos, J., García Lozano, J.R., Moreno, I., Aguilera, I., Gonzalez, M.F., García, A., Nuñez-Roldan, A., and Sánchez, B. **Association of HLA-DR4-Dw15 (DRB1*0405) and DR10 with rheumatoid arthritis in a Spanish population.** *Arthritis Rheum* 1993; 36: 811-814.

37. deVries, N., Ronningen, K.S., Tilanus, M.G.J., Bouwens-Rombouts, A., Segal, R., Egeland, T., Thorsby, E., van de Putte, L.B.A., and Brautbar, C. **HLA-DR1 and rheumatoid arthritis in Israeli Jews : sequencing reveals that DRB1*0102 is the predominant HLA-DR1 subtype.** *Tissue Antigens* 1993; 41:26-30.
38. Dejuan, M.D., Belmonte, I., Barado, J., Martinez-Laso, J., Figueroa, M., Arnaiz-Villena, A., and Cuadrado, E. **Differential associations of HLA-DR antigens with rheumatoid arthritis (RA) in Basques: High frequency of DR1 and DR10 and lack of association with HLA-DR4 of any of its subtypes.** *Tissue Antigens* 1994;43: 320-323.
39. Wilkens, R.F., Nepom, G.T., Marks, J., Nettles, J.W., and Nepom B.S. **Association of HLA Dw16 with rheumatoid arthritis in Yakima Indians: further evidence for the shared epitope hypothesis.** *Arthritis Rheum* 1991; 34: 43-47.
40. Gregersen, P.K., Silver, J., and Winchester, R.J. **The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1205-1213.
41. Firestein, G.S. **Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1996;39:1781-1790.
42. Firestein, G.S. **Evolving concepts of rheumatoid arthritis.** *Nature* 2003;423:356-361.
43. Dessen, A., Lawrence, C.M., Cupo, S., Zaller, D.M., and Wiley, D.C. **X-Ray Crystal Structure of HLA-DR4 (DRA1*0101, DRB1*0401) Complexed with a Peptide from Human Collagen II.** *Immunity* 1997;7:473-481.
44. Fox, D.A. **The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: new perspectives.** *Arthritis Rheum* 1997; 40:598-609.

45. Verheijden, G.F., Rijnders, A.W., Bos, E. Coenen-de Roco, C.J., van Staveren, C.J., Miltenburg, A.M., Meijerink, J.H., Elewayt, D., de Keyser, F., Veys, E., and Boots, A.M. **Human cartilage glycoprotein-39 as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1997; 40:1115-1125.
46. Li, N.L., Zhang, D.Q., Zhoy, K.Y., Cartman, A., Lenoux, J.Y., Poole, A.R. and Zhang, Y.P. **Isolation and characteristics of autorreactive T cells specific to aggrecan G1 domain from rheumatoid arthritis patients.** *Cell Res.* 2000;10:39-49.
47. Oda, A., Miyata, M., Kodama, E., Satoh, H., Sato, Y., Nishimaki, T., Nomaguchi, H., and Kasukawa, R. **Antibodies to 65Kd heat-shock protein were elevated in rheumatoid arthritis.** *Clin Rheumatol* 1994;13:261-264.
48. Rowley, M., Tai, B., Mackay, I.R., Cunningham, T., and Phillips, B. **Collagen antibodies in rheumatoid arthritis. Significance of antibodies to denatured collagen and their association with HLA-DR4.** *Arthritis Rheum* 1986;29:174-184.
49. Alcocer-Varela, J. **Citocinas en las enfermedades reumáticas autoinmunes.** *IDEPSA, Madrid: 1998 pags 35-39.*
50. Keffer, J., Probert, L., and Cazlaris, H. **Transgenic mice expressing tumor necrosis factor: a predictive model of rheumatoid arthritis.** *EMBO J* 1991; 10: 4025-4031.
51. Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., and Bijl, H. **Repeated therapy with monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis.** *Lancet* 1994; 344: 1125-1127.

52. Moreland, L.W., Baumgartner, S.W., Schiff, M.H., Tindall, E.A., Fleischmann, R.M., and Weaver, A.L. **Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein.** *N Engl J Med* 1997; 337: 141-147.
53. Beutler, B., and Cerami, A. **The biology of cachectin /TNF—a primary mediator of the host response.** *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 625-55.
54. Jacob, C.O., Fronek, Z., Lewis, G.D., Koo, M., Hansen, J.A., and MacDevitt, H.O. **Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor α : relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1233-1237.
55. Wilson, A.G., Symons, J.A., McDowell, T.L., McDevitt, H.O., and Duff, G.W. **Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3195-3199.
56. Uglialoro, A.M., Turbay, D. Pesavento, P.A. Delgado J.C., McKenzie, F.E., Gribben, J.G., Hartl, D., Yunis, E.J. and Goldfeld, A.E. **Identification of three new single nucleotide polymorphisms in the human tumor necrosis factor- α gene promoter.** *Tissue Antigens* 1998; 52:359-367.
57. Danis, V.A., Millington, M., Hyland, V., Lawford, R., Huang, O., and Grennan, D. **Increased frequency of the uncommon allele of a tumor necrosis factor α gene polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.** *Dis Markers* 1995; 12: 127-33.

58. Sargent, C.A., Dunham, I., Trowsdale, J., and Campbell, R.D. **Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86: 1968–1972.
59. Milner, C.M., and Campbell, R.D. **Polymorphic analysis of the three MHC-linked HSP70 genes.** *Immunogenetics* 1992 ; 36: 357–362.
60. Milner, C.M., and Campbell, R.D. **Structure and expression of the three MCH-linked HSP70 genes.** *Immunogenetics* 1990; 32: 242–251.
61. Swadesh M: **Indian linguistic groups of Mexico.** *México D.F. , Mexico: Escuela Nacional de Antropología e Historia, 1959.*
62. Lisker R, Pérez-Briseño R Granados J., et al . **Gene frequencies and admixture estimates in a Mexico City population.** *Am. J. Phys. Anthropol.* 1988; 71: 203-207.
63. Lisker R, Ramírez E, Pérez Briceño R, et al. **Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers.** *Hum Biol* 1990; 62: 791-801.
64. Bekker-Mendez, C., Yamamoto-Furusho, J.K., Vargas-Alarcon, G., Ize-Ludlow, D., Alcocer –Varela, J. and Granados, J. **Haplotype distribution of class II MHC genes in Mexican patients with systemic lupus erythematosus.** *Scand J. Rheumatol* 1998; 27:373-378.
65. Cerda-Flores, R.M., Villalobos-Torres, M.C., Barrera-Saldana, H.A., Cortes-Prieto, L.M., Barajas, L.O., Rivas, F., Carracedo, A., Zhong, Y., Barton, S.A. Chakraborty, R. **Genetic admixture in three Mexican Mestizo populations based on D1S80 and HLA-DQA1 loci.** *Am J Hum Biol* 2002; 14: 257

66. Thomas, D.C., and Witte, J. **Population stratification: A problem for case-control studies of candidate genes of candidate-gene associations?** *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2002; 11:505-512.
67. Hedrick, P.W. **Genetics of populations.** 2000, Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts.
68. Bontrop, R.E., Otting, N., Sliereendregt, B. L., and Lanchbury, J.S. **Evolution of major histocompatibility complex polymorphisms and T-cell receptor diversity in primates.** *Immunol. Rev.* 1995; 143:33-62.
69. Parham, P., Adams, E.J., and Arnett, K.L. **The origins of HLA-A,-B,-C polymorphisms.** *Immunol. Rev.* 1995;143:141-180.
70. www.ashi-hla.org.
71. Hill, A.V., Elvin, J., Willis A.C., Aidop, M., Allsopp, M., Gotch, F.M., Gao, X.M., Takiguchi, M., Greenwood, B.M., Townsend, A.R., *et al.* **Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria.** *Nature* 1992; 360:434-436.
72. Kaufman, J. **The generation and selection of the major histocompatibility complex: polymorphisms.** *En HLA in Health and Disease (R. Lechler and A. Warrens, eds), pp171-178.* 2000, Academic Press, London.
73. Hughes, A.L., and Nei, M. **Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection.** *Nature* 1988;335:167-170.

74. Hughes, A.L., and Nei, M. **Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86:958–962.
75. Robinson, W.P., Cambon–Thomsen, A., Borot, N., Klitz, W., and Thomson, G. **Selection, Hitchhiking and Disequilibrium Analysis at the Three Linked Loci With Applications to HLA Data.** *Genetics* 1991;129:931–948.
76. Huttley, G.A., Smith, M.W., Carrington, M., and O'Brien. **A Scan for Linkage Disequilibrium Across the Human Genome.** *Genetics* 1999; 152:1711–1722.
77. Bontrop, R.E. **The evolution of the major histocompatibility complex: Insights from phylogeny.** In *HLA in Health and Disease* (R. Lechler and A. Warrens, eds), pp163–169. 2000, Academic Press, London.
78. Gaudieri, S., Dawkins, R.L., Habara, K., Kulski, J.K., and Gojobori, T. **SNP Profile within the Human Major Histocompatibility Complex Reveals an Extreme and Interrupted Level of Nucleotide Diversity.** *Genome Research* 2004;10:1579–1586.
79. Grimsley, C., Mather, K. A., and Ober C. **HLA–H: A Pseudogene with Increased Variation Due Balancing Selection at Neighboring Loci.** *Mol. Biol. Evol.* 1998;15:1581–1588.
80. Dawkins, R.L., Leelayuwat, C., Gaudieri, S., Tay, G.K., Hui, J., Cattley, S., Martinez, P., and Kulski, J.K. **Genomics of the Major Histocompatibility Complex: Haplotypes, duplications, retroviruses and disease.** *Immunol. Rev.* 1999; 167: 275-304.

81. Yunis, E.J., Larsen, C.E., Fernandez-Viña, M., Awdeh, Z.L., Romero, T., Hansen, J.A. and Alper, C.A. **Inheritable variable sizes of DNA stretches in the human MHC: conserved extended haplotypes and their fragments or blocks.** *Tissue Antigens* 2003; 62:1–20.
82. Cullen, M., Erlich, H., Klitz, W., and Carrington, M. **Molecular mapping of a recombination hotspot located in the second intron of the human TAP2 locus.** *Am. J. Hum. Genet.* 1995; 56:1350–1358.
83. Jeffreys, A.J., Kauppi, L., and Neumann, R. **Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex.** *Nature Genet.* 2001;29:217–222.
84. Pritchard, J.K., and Przeworski, M. **Linkage Disequilibrium in Humans. Models and Data.** *Am J Hum Genet* 1999; 65:220–228.
85. Arnett, F.C., Edworthy, S.M., Bloch, D.A., McShane, D.J., Fries, J.F., Cooper, N.S., Healey, L.A., Kaplan, S.R., Liang, M.H., Luthra, H.S., Medsger, T.A. Jr, Mitchell, D.M., Neustadt, D.H., Pinals, R.S., Schaller, J.G., Sharp, J.T., Wilder, R.L., and Hunder, G.G. **The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1988; 31:315-324.
86. Cardiel, M.H., Abello-Banfi, M., Ruiz-Mercado, R., and Alarcón-Segovia, D. **How to measure health status in rheumatoid arthritis in no-English speaking patients: validation of Spanish version of the Health Assessment Questionnaire Disability Index (Spanish HAQ-DI)** *Clin Exp Rheumatol* 1993; 11:117-121.

87. van der Heijde, D.M.F.M., van't Hof, M.A., van Riel, P.L., van Leeuwen, M.A., van Rijswijk, M.H., and van de Putte, L.B. **Validation of single variables and composite indices for measuring disease activity in rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 1992;51:177-181.
88. Davis, R.W., Thomas, M., Cameron, J., St John, T.P., and Padgett, R.A. **Rapid DNA isolation for enzymatic and hybridization analysis.** *Methods Enzymol* 1980; 65: 404-411.
89. Skoog, T., van't Hooft, F.M., Kallin, B., Jovinge, S., Boquist, S., Nilsson, J., Eriksson, P., and Hamsten, A. **A common functional polymorphism (C→A substitution at position -863) in the promoter region of the tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene associated with reduced circulating levels of TNF- α .** *Hum Mol Genet* 1999;8:1443-1449.
90. Vinasco, J., Beraun, Y., Nieto, A., Fraile, A., Pareja, E., Mataran, L., and Martín, J. **Heat shock protein 70 gene polymorphisms in rheumatoid arthritis.** *Tissue antigens* 1997;50:71-73.
91. Vargas Vorackova F, **Causalidad.** *En: Epidemiología Clínica (Moreno Altamirano L, ed), pp 131-139, 2003, McGraw-Hill, México.*
92. Rosner, B. **Fundamentals of Biostatistics.** 2000, Duxbury, California.
93. Schneider, S., Roessli, D., and Excoffier L (2000) Arlequin ver (2.000): **A software for population genetics data analysis.** Genetics and Biometric Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
94. Guo, S.J. and Thompson, E.A. **Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles.** *Biometrics* 1992; 48:361-372.

95. Dempster, A., Laird, N.M., and Rubin, D. **Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm.** *J. R. Stat. Soc B.* 1977; 39:1-22.
96. Excoffier, L., and Slatkin, M. **Maximum likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population.** *J. Mol. Evol* 1995; 12: 921-927.
97. Lewontin, R. **On Measures of Genetic Disequilibrium.** *Genetics* 1988; 120:849-852.
98. Slatkin, M. **Linkage Disequilibrium in Growing and Stable Populations.** *Genetics* 1994; 137: 331-336
99. Rood, M.J., van Krugten, M.V., Zenelli, E., van der Linden, M.W., Keijsers, V., Schreuder, G.M.T., Verduyn, W., Westendorp, R.G.J., de Vries, R.R.P., Breedveld, F.C., Verweij, C.L., and Huizinga, T.W.J. **TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 2000; 43:129-134.
100. Weyand, C.M. and Goronzy, J.J. **Disease-associated human histocompatibility leukocyte antigen determinants in patients with seropositive rheumatoid arthritis.** *J. Clin. Invest.* 1990; 85: 1051-1057.
101. Weyand, C.M., McCarthy, T.G. and Goronzy, J.J. **Correlation between disease phenotype and genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis.** *J. Clin. Invest.* 1995; 95:2120-2126.
102. MacGregor, A., Ollier, W., Thomson, W., Jawaheer, D. and Silman A. **HLA-DRB1*0401/0404 genotype and rheumatoid arthritis: increased association in men, young age at onset and disease severity.** *J Rheumatol* 1995; 22:1032-1036.

103. Weyand, C.M., Xie, C. and Goronzy, J.J. **Homozygosity for the HLA-DRB1 allele selects for extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis.** *J.Clin. Invest* 1992; 89:2033-2039.
104. Moreno, I., Valenzuela, A., Garcia, A., Yelamos J., Sánchez, B. And Hernaz, W. **Association of the shared epitope with radiological severity of rheumatoid arthritis.** *J. Rheumatol* 1996; 23: 6-9.
105. Wakitani, S., Murata, N., Toda, Y., Ogawa, R., Kaneshige, T., Nishimura, Y. and Ochi, T. **The relationship between HLA-DRB1 alleles and disease subsets of rheumatoid arthritis in Japanese.** *Br. J. Rheumatol* 1997; 36:630-636.
106. Vargas-Alarcón, G., Gamboa, R., Zúñiga, J., Hernández-Pacheco, G., Ramos-Kuri, M., Castillo, E., Gomez-Casado, E., Martínez-Lazo, J., Arnaiz-Villena, A. and Granados, J. **HLA-DR4 allele frequencies on Indian and Mestizo population.** *Hum Immunol* 2000 ; 61: 341-344.
107. Debaz, H., Olivo, A., Vazquez-García, M.N., de la Rosa, G., Hernández, A., Lino, L., Burgos, R., Fernández-Viña, M., Stastny, P., and Gorodetzky, C. **Relevant Residues of DRβ1 Third Hypervariable Region Contributing to the expression and to Severity of Rheumatoid Arthritis (RA) in Mexicans.** *Hum Immunol* 1998; 59:287-294
108. Del Rincón, I. and Escalante, A. **HLA-DRβ1 alleles associated with susceptibility or resistance to rheumatoid arthritis, articular deformities, and disability in Mexican Americans.** *Arthritis and Rheum* 1999; 42: 1329-1338.
109. Haines, C.L., Hewett-Emmett, D., Bertin, TK. and Schull, W.J. **Origins of U.S. Hispanics. Implications for Diabetes.** *Diabetes Care* 1991; 14: 618-627.

110. Reveille, J.D. **The genetic contribution to the pathogenesis of rheumatoid arthritis.** *Current Opinion in Rheumatology* 1998; 10: 187-200.
111. Willians, R.C., Jacobsson, L.T.H., Knowler, W.C., Del Puente, A., Kostky, D., McAuley, J.E., Bennett, P.H., and Pettitt, D.J. **Meta-analysis reveals association between most common class II haplotype in full-heritage native Americans and Rheumatoid Arthritis.** *Hum Immunol* 1995; 42:90-94.
112. Hammer, J., Gallazi, F., Bono, E., Karr, R.W., Guenot, J., Valsasini, P., Nagy, Z.A. and Sinigaglia, F. **Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: Correlation with rheumatoid arthritis association.** *J Exp Med* 1995; 181: 1847-1855.
113. Davenport, M. P., Godkin, A., Friede, T., Stevanoviic, S., Willis, A. C., Hill, A.V.C. and Rammensee, H.G. **A distinctive peptide binding motif for HLA-DRB1*0407, an HLA-DR4 subtype no associated with rheumatoid arthritis.** *Immunogenetics* 1997; 45: 229-232.
114. Rammensee, H.G., Friede, T. and Stevanoviic, S. **MHC ligands and peptide motifs: First listing.** *Mmunogenetics* 1995; 41: 178-228.
115. Hiraiwa, A., Yamanaka, K., Kwok, W. W., Mickelson, E.M., Masewiez, S., Hansen, J.A., Radka, S.F. and Nepom, G.T. **Structural requirements for recognition of the HLA-Dw14 class II epitope: A key HLA determinant associated with rheumatoid arthritis.** *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 80-51-8055.
116. Penzotti, J.E., Nepom, G.T. and Lybrand, T.P. **TCR/HLA-DRB1*04 molecular modeling predicts site-specific interactions for the DR shared epitope associated with rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1316-1325.

117. Albani, S., Tuckwell, J. E., Esparza, L., Carson, D.A. and Roudier, J. **The susceptibility sequence to rheumatoid arthritis is a cross reactive B cell epitope shared by the Escherichia coli heat shock protein dnaJ the histocompatibility leukocyte antigen DRB1*0401 molecule .** *J Clin. Invest.* 1992; 89: 327-331.
118. Roudier, J., Petersen, J., Rhodes, G. H., Luka, J. and Carson, D.A. **Susceptibility to rheumatoid arthritis maps to a T-cell epitope shared by the HLA-Dw4 DR β -1 chain and the Epstein-Barr virus glycoprotein gp110.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86: 5104-5108.
119. Matthey, D.L., Dawes, P.T., Gonzalez-Gay, M.A., García-Porrúa, C., Thomson, W., Hajjjer, A.H., and Ollier, W.E.R. **HLA-DR β 1 alleles encoding and aspartic acid at position 70 protect against development of rheumatoid arthritis.** *J Rheumatol* 2001; 28: 232-239
120. Kirschmann, D.A., Duffin, K. L., Smith, C. E., **Naturally processed peptides from rheumatoid arthritis associated and non-associated HLA-DR molecules.** *J Immunol* 1995; 155: 5655-5662.
121. Perdriger, A., Chales, G., Semana, G., Guggenbuhl, P., Meyer, O., Quillivic, F. and Pawlotsky, Y. **Role of HLA-DR-DR and DR-DQ Associations in the Expression of Extraarticular Manifestations and Rheumatoid Factor in Rheumatoid Arthritis.** *J. Rheumatol.* 1997; 24: 1272-1276.
122. Stephens, H.A.F., Sakkas, L.I., Vaughan, R.W. Teitsson, I., Welsh, K.I. and Panayi, G.S. **HLA-DQw7 is a disease severity marker in patients with rheumatoid arthritis.** *Immunogenetics* 1989; 30: 119-122.

123. Arnaiz-Villena, A., Vargas-Alarcón, G., Granados, J., Gomez-Casado, E., Longas, J., Gonzalez-Hevilla, M., Zúñiga, J., Salgado, N., Hernández-Pacheco, G., Guillén, J. and Martínez-Laso, J. **HLA genes in Mexican Mazatecans, the peopling of the Americans and the uniqueness of Amerindians.** *Tissue Antigens* 2000; 56: 405-416.
124. Hirayama, K., Matsushita, S., Kikuchi, I., Iuchi, M., Ohta, N. and Sasazuki, T. **HLA-DQ is epistatic to HLA-DR in controlling the immune response to schistosomal antigen in human.** *Nature* 1987; 327: 426-430.
125. Sønderstrup, G. and McDevitt, H.O. **DR,DQ, and you: MHC alleles and autoimmunity.** *J. Clin. Invest.* 2001; 107:795-796
126. McDevitt, H.O. **The role of MHC class II molecules in susceptibility and resistance to autoimmunity.** *Curr. Opin. Immunol.* 1998; 10:677-681
127. Wen, L., Chen, N.Y., Tang, J., Sherwin, R. and Wong, F.S. **The regulatory role of DR4 in a spontaneous diabetes DQ8 transgenic model.** *J. Clin. Invest.* 2001; 107:871-880.

ANEXO 1.

Criterios revisados en 1987 para la clasificación de la artritis reumatoide.

Criterio	Definición
1. Rigidez matutina	Rigidez matutina en las articulaciones y alrededor de ellas por lo menos de una hora de duración antes de la mejoría máxima.
2. Artritis de tres o más articulaciones	Al menos tres áreas articulares deben tener simultáneamente hinchazón de tejidos blandos o derrame (no sólo crecimiento óseo) , observado por un médico. Las 14 áreas articulares posibles con: interfalángicas proximales (IFP), metacarpofalángicas (MCF), muñecas, codos, rodillas, tobillos y metatarsfalángicas (MTF), derechas e izquierdas.
3. Artritis de las articulaciones de las manos	Al menos un área articular inflamada, según se describió antes, de la muñeca, MCF o IFP.
4. Artritis simétrica	Afección simultánea de las mismas áreas articulares (como en 2) en ambos lados del cuerpo (el trastorno bilateral de IFP, MCF, y MTF es aceptable sin absoluta simetría).
5. Nódulos reumatoides	Nódulos subcutáneos sobre las prominencias óseas, superficies extensoras o regiones yustarticulares, observados por un médico.
6. Factor reumatoide en suero	Demostración de cantidades anormales de "factor reumatoide" en el suero por un método que sea positivo en menos de 5% de la población de controles normales.
7. Cambios radiológicos	Cambios radiológicos típicos de artritis reumatoide en la radiografía PA de manos y muñecas, los cuales deben incluir erosiones o descalcificación inequívoca localizada o más acentuadas en zonas adyacentes a las articulaciones afectadas (los cambios de osteoartritis únicamente no califican).
Interpretación. Para propósitos de clasificación se dice que un paciente tiene artritis reumatoide si satisface al menos cuatro de los siete criterios señalados. Los criterios 1 al 4 debieron estar presentes al menos durante 6 semanas.	

ANEXO 2. Técnicas

a. Extracción de ADN por la técnica de salting-out.

1. En un tubo falcón, colocar de 10 a 50 ml de sangre total y agregar 40 ml de buffer de lisis para glóbulos rojos 1X. Mezclar por un minuto a temperatura ambiente.
2. Centrifugar a 3800 r.p.m. durante 10 minutos para precipitar los leucocitos.
3. Descartar el sobrenadante.
4. Resuspender el botón celular en 20 ml de buffer de lisis para glóbulos rojos. Mezclar por un minuto.
5. Centrifugar a 3800 r.p.m. durante 10 minutos.
6. Descartar el sobrenadante. Invertir el tubo sobre un papel absorbente para eliminar el exceso de sobrenadante.
7. Resuspender el botón de leucocitos en 160 μ l de buffer para proteinasa K , 40 μ l de proteinasa K (10mg/ml), 40 μ l de SDS al 20% y 300 μ l de agua (volumen final de aproximadamente 800 μ l). Transferir a un tubo eppendorf de 1.5 ml.
8. Incubar toda la noche a 37°C o bien a 55°C por 2 horas. En el último caso agregar 20 μ l de proteinasa K después de una hora de incubación.
9. Posterior a la incubación, adicionar 200 μ l de NaCl 6M y mezclar vigorosamente para precipitar proteínas.
10. Centrifugar a 13 000 r.p.m. por 10 minutos.
11. Colocar el sobrenadante en dos tubos eppendorf de 1.5 ml.
12. Adicionar a cada tubo 900 μ l de alcohol absoluto frío. Mezclar por inversión hasta observar el ADN precipitado.

13. Con ayuda de pipeta transferir el ADN precipitado a tubos eppendorf de 1.5 ml y agregar 1 ml de alcohol al 70% para lavar.
14. Centrifugar a 10 000 r.p.m durante 5 minutos.
15. Decantar el sobrenadante.
16. Resuspender el ADN en 200 μ l de H₂O dd.

Buffers utilizados en la extracción de ADN.

Buffer de lisis para glóbulos rojos.

Sacarosa	0.32 M
Triton X-100	1% v/v
MgCl ₂ .6H ₂ O	5mM
Tris-HCl	12mM

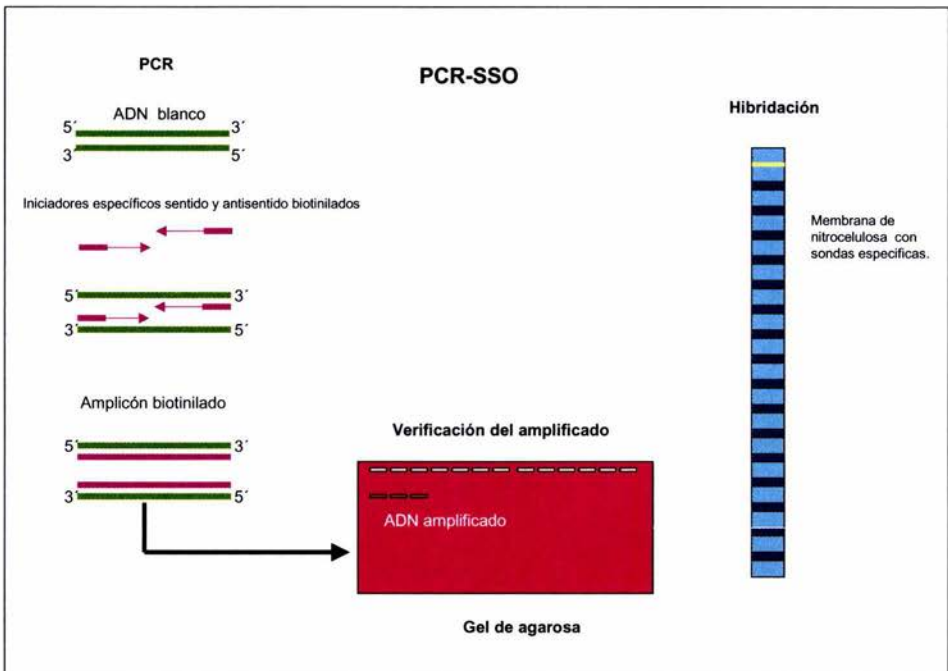
Ajustar a pH de 7.5

Buffer para proteinasa K.

NaCl	0.375M
EDTA	0.12M

b. Tipificación de HLA-DRB1 y DQB1.

La tipificación de los loci HLA-DRB1 y HLA-DQB1 se realizó por la técnica de reacción en cadena de polimerasa e hibridación con sondas específicas del alelo. Se utilizó el kit comercial Dynal RELI SSO (DRB1 y DQB1). La metodología consiste en la amplificación del exon 2 del los genes HLA-DRB1 y DQB1 usando iniciadores biotinilados. Una vez que se obtiene el amplicón biotinilado, este es desnaturalizado por alcalinidad para obtener cadenas simples de ADN que son hibridadas con las sondas específicas ancladas a una membrana de nitrocelulosa. La detección de los sitios de hibridación positivos (ADN y sonda) se lleva a cabo por medio de un sistema de revelado que consiste de estreptavidina-peroxidasa, peróxido de hidrógeno y TMB (tetrametilbencidina).



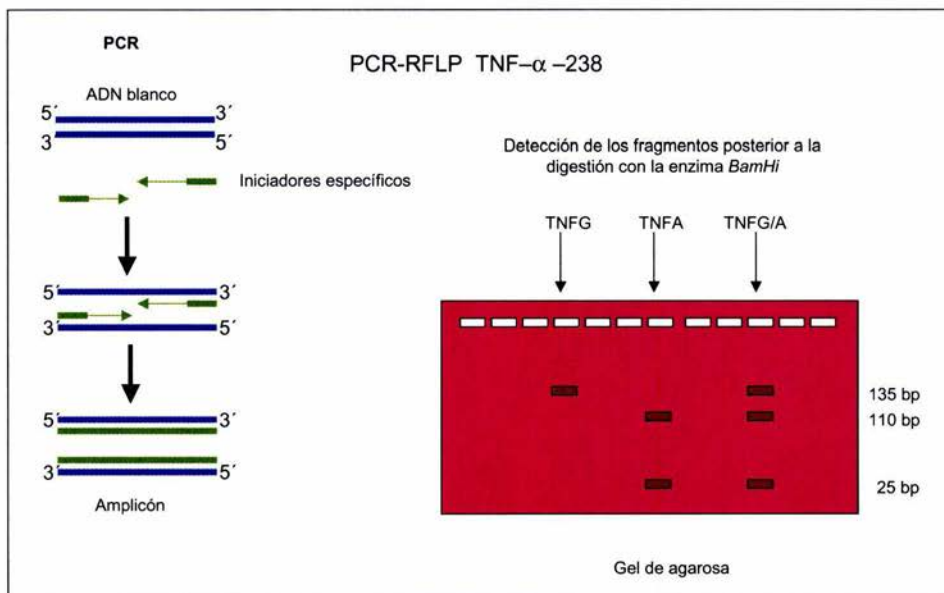
c. Tipificación del polimorfismo -238 de la región promotora del TNF- α . PCR-RFLP.

La posición -238 de la región promotora del TNF- α se detectó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los siguientes iniciadores específicos que flanquean el sitio polimórfico:

Sentido 5'-AAACAGACCACAGACCTGGTC-3'

Antisentido 5'-CTCACACTCCCCATCCTCCCGATC-3')

Una vez terminada la PCR, el amplicón se digirió toda la noche con la endonucleasa de restricción (RFLP) *Bam*HI. Los alelos fueron designados como sigue: alelo TNF238G fragmento de 135 bp (no digestión); alelo TNF238A dos fragmentos 110 bp y 25 bp (digestión).



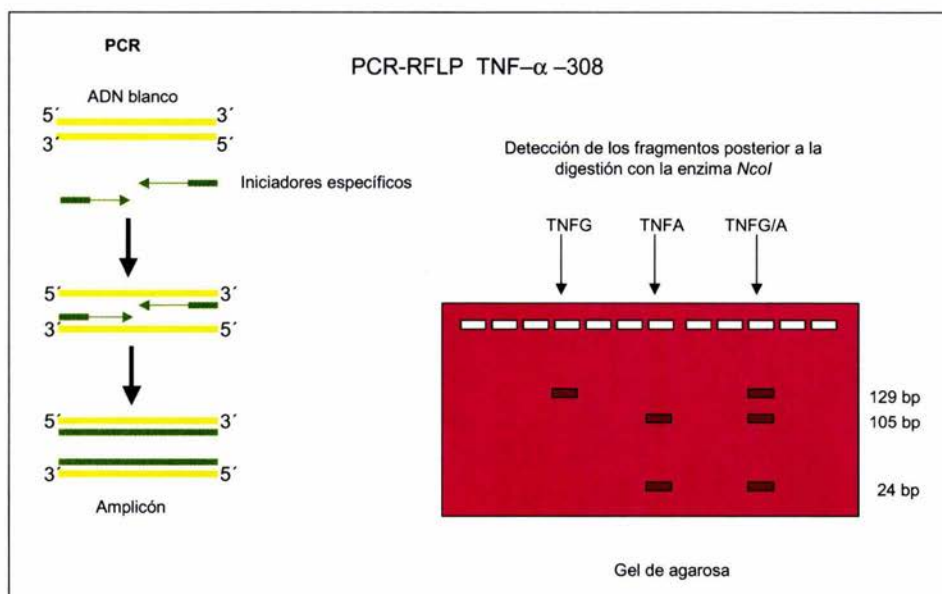
d. Tipificación del polimorfismo -308 de la región promotora del TNF- α . PCR-RFLP.

La posición -308 de la región promotora del TNF- α se detectó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los siguientes iniciadores específicos que flanquean el sitio polimórfico:

Sentido 5'-GAGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'

Antisentido 5'-GGGACACACAAGCATCAAG-3')

Una vez terminada la PCR el amplicón se digirió toda la noche con la endonucleasa de restricción (RFLP) *NcoI*. Los alelos fueron designados como sigue: alelo TNF308G (T1) fragmento de 129 bp (no digestión); alelo TNF308A (T2) dos fragmentos 105 bp y 24 bp (digestión).



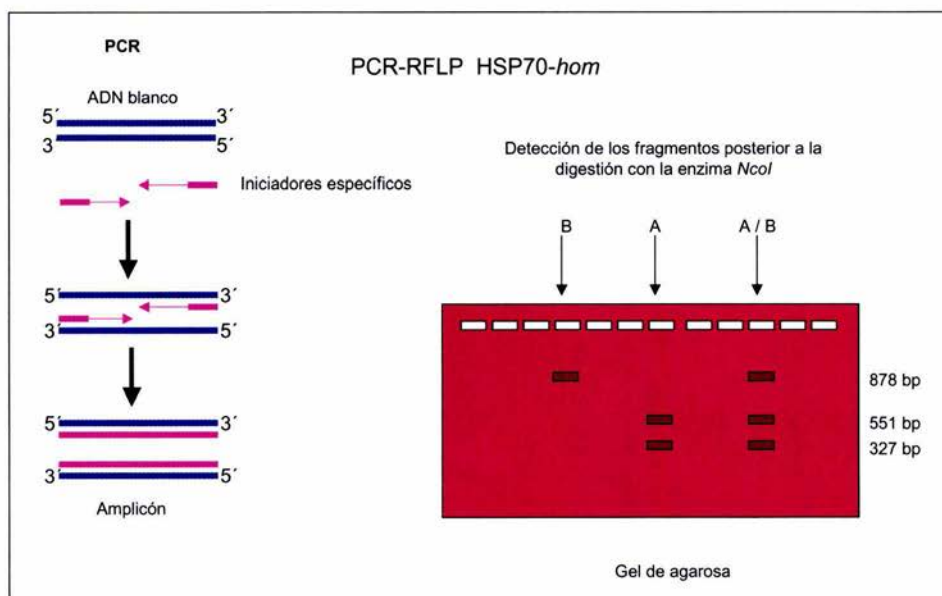
e. Tipificación del polimorfismo del gen HSP70-hom. PCR-RFLP.

El polimorfismo del gen HSP70-hom se detectó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los siguientes iniciadores específicos que flanquean el sitio polimórfico en la posición 2437:

Sentido 5'-GGACAAGTCTGAGAAGGTACAG-3'

Antisentido 5'-GTAAGTTAGATTCAGGTCTGG-3')

Una vez terminada la PCR el amplicón se digirió toda la noche con la endonucleasa de restricción (RFLP) *NcoI*. Los alelos fueron designados como sigue: alelo B fragmento de 878 bp (no digestión); alelo A dos fragmentos 551 bp y 327 bp (digestión).



ANEXO 3. Pruebas estadísticas:

a. Razón de momios.

La razón de momios (RM) establece asociación entre un factor de riesgo y enfermedad, donde los valores mayores de 1 sugieren susceptibilidad al desarrollo de enfermedad, y los valores menores de 1 sugieren protección al desarrollo de enfermedad. Considerando una tabla de 2x2 la RM se calcula como sigue:

		Enfermedad	
		Presente	Ausente
Factor de riesgo	Presente	a	b
	Ausente	c	d

$$RM = ad / bc$$

Tomando en cuenta la tabla anterior de 2x2 y el valor de la RM, el intervalo de confianza de 95 % se calcula con la siguiente formula:

$$IC\ 95\% = e^{[\ln(RM) \pm 1.96 \sqrt{1/a + 1/b + 1/c + 1/d}]}$$

ln = logaritmo natural.

b. Corrección del valor de p.

Se puede hacer multiplicando el valor de p por el número de comparaciones, o utilizando la siguiente formula:

$$p = 1 - (1 - \alpha)^c, \text{ donde } \alpha = \text{valor de p sin corregir, y } c = \text{número de comparaciones.}$$

c. Prueba de Mantel-Haenszel (MH).

El uso de la prueba de MH en los estudios de casos y controles, permite identificar un factor de confusión cuando se han analizado varios factores, y más de uno está asociado con la enfermedad. Para realizar la prueba de MH, primeramente se construyen tablas de 2x2 de acuerdo a cada uno de los factores que se han asociado, con estas tablas se calcula la RM para cada factor. La RM se calcula como se comentó anteriormente. Posteriormente, se calcula la RM con la prueba de MH (RM_{MH}), combinando los datos de las tablas de 2x2 que se construyeron para cada factor estudiado y asociado con la enfermedad. Así, RM_{MH} es una combinación de los valores individuales de RM, que se obtuvieron de cada factor involucrado, y se calcula como sigue:

		Enfermedad		
		Presente	Ausente	
Factor de riesgo	Presente	a_i	b_i	$a_i + b_i$
	Ausente	c_i	d_i	$c_i + d_i$
		$a_i + c_i$	$b_i + d_i$	n_i

Se construyen las tablas de 2x2 necesarias (k).

Con los datos de las tablas de 2x2 se calcula la RM_{MH} como sigue:

$$RM_{MH} = \frac{\sum_{i=1}^k a_i d_i / n_i}{\sum_{i=1}^k b_i c_i / n_i}$$

El intervalo de confianza de 95% se calculó con la siguiente fórmula:

$$IC\ 95\% = e^{[\ln(RM_{MH}) \pm 1.96 \sqrt{\text{Var}(\ln RM_{MH})}]}$$

d. Cálculo del desequilibrio de unión (LD).

El cálculo de LD se realizó con el programa de Arlequín v 1.1. Se calculó la frecuencia de los haplotipos a partir de las frecuencias genotípicas de los loci estudiados, utilizando el algoritmo EM (del inglés, Expectation-Maximization).

Conociendo las frecuencias de haplotipos para cada par de loci, el valor de D se calculó como sigue:

$$D_{ij} = p_{ij} - p_i p_j$$

Donde p_{ij} es la frecuencia del haplotipo formado por los alelos i y j ; p_i y p_j representan la frecuencia de los alelos i y j , respectivamente.

El valor estandarizado de D (D'), se calculó con la siguiente formula:

$$D'_{ij} = D_{ij} / D_{ij,max}$$

Donde $D_{ij,max}$ toma uno de los siguientes valores:

Min [$p_i p_j$, $(1-p_i)(1-p_j)$] cuando $D_{ij} < 0$

Min [$(1-p_i)p_j$, $p_i(1-p_j)$] cuando $D_{ij} > 0$

ANEXO 4. Artículo publicado.

HLA-DRB1 Alleles Encoding the "Shared Epitope" are Associated With Susceptibility to Developing Rheumatoid Arthritis Whereas HLA-DRB1 Alleles Encoding an Aspartic Acid at Position 70 of the β -Chain are Protective in Mexican Mestizos

J.A. Ruiz-Morales, G. Vargas-Alarcón,
P.O. Flores-Villanueva, C. Villarreal-Garza,
G. Hernández-Pacheco, J.K. Yamamoto-Furusho,
J.M. Rodríguez-Pérez, N. Pérez-Hernández, M. Rull,
M.H. Cardiel, and J. Granados

ABSTRACT: The risk to develop rheumatoid arthritis (RA) has been associated with the presence of HLA-DRB1 alleles encoding the "shared epitope" (SE). Additionally, HLA-DRB1 alleles encoding an aspartic acid at position 70 (D^{70+}) have been associated with protection against the development of RA. In this study we tested the association between either SE or D^{70+} and rheumatoid arthritis in Mexican Mestizos. We included 84 unrelated Mexican Mestizos patients with RA and 99 unrelated healthy controls. The HLA-typing was performed by PCR-SSO and PCR-SSP. We used the chi-squared test to detect differences in proportions of individuals carrying at least one SE or D^{70+} between patients and controls. We found that the proportion of individuals carrying at least one HLA-DRB1 allele encoding the SE was significantly

increased in RA cases as compared to controls ($p_c = 0.0004$, OR = 4.1, 95% CI = 2.2–7.7). The most frequently occurring allele was HLA-DRB1*0404 (0.161 vs 0.045). Moreover, we observed a significantly increased proportion of HLA-DRB1 SE+ cases with RF titers above the median ($p = 0.005$). Conversely, the proportion of individuals carrying at least one HLA-DRB1 allele encoding the D^{70+} was significantly decreased ($p_c = 0.004$, OR = 0.4, 95% CI 0.2–0.7) among RA patients compared with controls. In conclusion, the SE is associated with RA in Mexican Mestizos as well as with the highest titers of RF. *Human Immunology* 65, 262–269 (2004). © American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2004. Published by Elsevier Inc.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease of unknown etiology, but it is thought that both

genetic and environmental factors play an important role in its pathogenesis. Regarding its genetic component, the most thoroughly examined genes are those located in the human leukocyte antigen (HLA) class II region. Ever since the first description of an association between HLA-DR4 and RA in 1976 [1], several alleles of HLA-DRB1 have been associated with the predisposition to develop RA; however, the associated allele varies among different ethnic groups. For example, HLA-DRB1*0401 and 0404 are the most common found in Caucasians from North America and from Northern Europe [2, 3]; while HLA-DRB1*0405 is more frequently present in Japanese [4], Chinese [5], Koreans [6], Asian Indians [7],

From the Department of Immunology and Rheumatology (J.A.R.-M., C.V.-G., J.K.Y.-F., M.R., M.H.C., J.G.), Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Tlalpan, México; Department of Physiology (G.V.-A., G.H.-P., J.M.R.-P., N.P.-H.), Cellular Section Biology, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, México; Department of Cancer Immunology and AIDS (P.O. F.-V.), Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA.

Address reprint requests to: Dr. Julio Granados, Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan 14000, México D.F.; E-mail: julgrate@yahoo.com.

Received April 18, 2003; revised December 19, 2003; accepted December 22, 2003.

Human Immunology 65, 262–269 (2004)
© American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2004
Published by Elsevier Inc.

0198-8859/04/\$-see front matter
doi:10.1016/j.humimm.2003.12.009

and Caucasians from Israel [8], and Spain [9]. In addition, HLA-DRB1*1001 is observed in Spanish [9] and Asian Indians [7], while DRB1*0102 is found in Israelis [10]. Interestingly, the allele HLA-DRB1*1402 is associated with Native Americans [11], and Mexican Americans [12]. All of these alleles share a common sequence of amino acids that consists of Leu-Leu-Glu-Gln-Arg-Arg-Ala-Ala, which is found from residues 67 to 74 of the DRB1 polypeptide chain of the HLA-DR molecule. This sequence is called "rheumatoid epitope" or "shared epitope" (SE) [13]. The presence and the dose of HLA-DRB1 alleles encoding to SE have been associated with characteristics of severe disease, such as extra-articular-disease, severity of joint damage, and a higher likelihood of being rheumatoid factor (RF) positive as well as higher titer of RF [14, 15]. Conversely, DRB1 alleles lacking the SE, such as DRB1*07, DRB1*08 and DRB1*11 have been associated with protection to develop RA. These alleles encode an aspartic acid at position 70 (D^{70+}) of the HLA-DRB chain, compared with glutamine (Q) or arginine (R) in SE bearing alleles. Despite the D^{70+} has been associated with protection to develop RA its association with a disease severity is unclear [16].

The SE sequence as well as the D^{70+} alleles encode a critical portion of the molecule HLA-DR that forms one of the peptide-binding pockets, and thus, make it possible to consider the potential role of either the SE or D^{70+} in selecting types of antigenic peptides such as auto antigens or cross-reactive pathogenic antigens [17].

The primary aim of this study is to test the association between HLA-DRB1 alleles encoding the "shared epitope" (SE+) or HLA-DRB1 alleles encoding an aspartic acid at position 70 (D^{70+}) and rheumatoid arthritis in Mexican Mestizos. As a secondary aim we also tested whether or not the SE or the D^{70+} could be associated with titers of RF in RA patients. To do so, we designed a case control study involving Mexican Mestizo patients with rheumatoid arthritis and healthy controls.

PATIENTS AND METHODS

Patients

In the present study, we included 84 unrelated Mexican Mestizo patients who met the American College of Rheumatology (ACR); formerly, the American Rheumatism Association) 1987 revised criteria for the classification of RA [18]. The patients were receiving medical care at the Department of Immunology and Rheumatology at the Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion "Salvador Zubiran." All patients have RA of no more than 3 years of evolution. We included 99 healthy unrelated Mexican Mestizos as controls. Patients and controls were asked about their birthplace, that of

their parents and maternal and paternal grandparents as well as their current address. Thus, all patients and controls were Mexican Mestizos and residing in Mexico City or its metropolitan area. All patients and controls were unrelated and of Mexican Mestizo ethnical background to the third generation as assessed by a questionnaire. A Mexican Mestizo is defined as a person who was born in Mexico and whose last two ascending generations were also born in Mexico [19]. According to a recent publication, the percentage contribution from Spanish, Amerindian and African in the gene admixture of Mexican Mestizos from the Federal District is 50.03 ± 4.11 , 49.03 ± 3.76 , and 0.94 ± 1.27 , respectively [20]. Taking into consideration the standard deviations observed in that study an insignificant variability in the degree of genetic admixture is expected within and between our sample of cases and controls.

Clinical Assessment

Demographic details, including sex, gender, formal education, and disease duration were recorded. Use of disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) and the presence of extra-articular disease manifestations were also recorded. The RF was determined using nephelometry technique. Functional capacity was assessed using a clinically validated Spanish translation of the health assessment questionnaire (HAQ) [21], giving a score from 0 to 3 points. For the assessment of disease activity, we used the disease activity score (DAS) [22].

DNA Extraction

Genomic DNA was extracted from whole blood samples according to the procedure described by Davis *et al.* [23].

HLA Typing

Generic HLA typing was done by polymerase chain reaction–sequence-specific oligonucleotide (PCR-SSO) reverse dot blot using Dynal RELI SSO HLA-DRB test kits (Hoffmann-La Roche Ltd. and Roche Molecular Systems, Inc., Alameda, CA, USA) as described by Bignon and Fernandez-Viña [24]. The subtypes of HLA-DRB1*01; HLA-DRB1*04, and DRB1*14 were done by PCR-SSP (sequence specific primer).

Statistical Analysis and Determination of Sample Size

Data analysis was performed using the STATA7 statistical package (UCLA Labs, Los Angeles, CA, USA). We used the chi-squared test to detect differences in proportions of males and females as well as, to detect differences in proportions of individuals carrying the SE or the D^{70+} of HLA-DRB1 in patients and controls. The chi-squared test was also used to test differences in proportions in RA patients with high or low levels of RF according to the

TABLE 1 Characteristics of Mexican Mestizos with RA and those patients carrying either a least one copy of SE+ or at least one copy of D⁷⁰⁺

Characteristic	All patients n = 84	SE+ n = 54	SE- n = 30	D ⁷⁰⁺ n = 31	D ⁷⁰⁻ n = 53
Gender, F n (%)	72 (85.7)	43 (59.7)	29 (40.3)	28 (38.9)	44 (61.1)
M n (%)	12 (14.3)	11 (91.7)	1 (8.3)	3 (25)	9 (75)
Age, mean \pm SD years	39.3 \pm 14.8	39.7 \pm 14.8	38.5 \pm 15.0	40.9 \pm 17.1	38.3 \pm 13.3
Disease duration, mean \pm SD months	16.7 \pm 7.5	16.3 \pm 7.7	17.3 \pm 7.4	17.3 \pm 6.2	16.3 \pm 8.3
Formal education, mean \pm SD years	9.9 \pm 4.6	9.5 \pm 4.8	10.5 \pm 4.4	9.1 \pm 4.3	10.3 \pm 8.9
RF +, n (%)	71 (84.5)	48 (67.6)	23 (32.4)	26 (36.6)	45 (63.4)
HAQ, mean \pm SD	0.79 \pm 0.64	0.68 \pm 0.63	0.83 \pm 0.67	0.81 \pm 0.57	0.79 \pm 0.68
DAS, mean \pm SD	3.3 \pm 1.2	3.4 \pm 1.2	3.2 \pm 1.1	3.5 \pm 1.2	3.3 \pm 1.2
RF titer, mean \pm SD IU/ml	455.2 \pm 689.9	546.4 \pm 744.9	299.1 \pm 551.9	485.8 \pm 673.2	437.4 \pm 705.2
DMARDs					
MTX n (%)	68 (80.9)	43 (63.2)	25 (36.8)	28 (41.2)	40 (58.8)
CLQ n (%)	41 (48.8)	25 (61.0)	16 (39.0)	16 (39)	25 (61)

Abbreviations: CLQ = chloroquine; DAS = disease activity scale, score from 0 (total inactivity disease) to 10 (very active disease); DMARDs = disease-modifying antirheumatic drugs; F = female; HAQ = health assessment questionnaire, score from 0 to 3; M = male; MTX = methotrexate; RA = rheumatoid arthritis; RF = rheumatoid factor; SD = standard deviation; SE = shared epitope.

presence of SE or the D⁷⁰⁺ of the HLA-DRB1. If the number in any cell was less than 5, the Fisher exact test was used as indicated in the tables. The odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated to measure the strength of association between either SE or D⁷⁰⁺ and RA. As a secondary aim we wanted to test whether or not an association between the presence of SE or D⁷⁰⁺ of HLA-DRB1 with increased titers of RF exist in our Mexican sample of RA patients. To analyze this, we classified the RA patients into three categories according to the titers of RF: those with RF negative (0–20 IU/ml), those with titers of RF below the median (< 224 IU/ml), and those with titers of RF above the median (> 224 IU/ml). Means and standard deviation (SD) were calculated for the age, formal education, disease duration, HAQ and DAS scores and also RF titers. We used a Student *t*-test to analyze differences of means values of these variables between patients and controls or patients classified according to the presence of SE or D⁷⁰⁺ of the HLA-DRB1.

We conducted a preliminary study with 20 cases and 20 controls and found that 0.7 cases and 0.4 controls carried HLA-DRB1 alleles encoding SE (O.R. 3.5) and that 0.15 cases and 0.45 controls carried HLA-DRB1 alleles encoding D⁷⁰⁺ (O.R. 0.1358). We calculated that we needed 66 to 82 cases and controls to detect with 80% power a minimal OR of 3 (0.33) with a two-sided alpha level of 0.025 (according to the number of comparisons). We expected a proportion of 0.5 controls carrying at least one HLA-DRB1 allele encoding SE and 0.3 patients carrying at least one HLA-DRB1 alleles encoding D⁷⁰⁺. We recruited 84 cases and 99 controls. Thus, with this sample we have at least 80% power to detect an OR of 3 (0.33) when comparing the proportions of

patients and controls carrying HLA-DRB1 SE+ or HLA-DRB1 D⁷⁰⁺ alleles.

RESULTS

We included in this study 84 unrelated RA patients with less than 3 years (36 months) since the onset of symptoms attributable to RA. Seventy-two patients (85.7%) were female; 71 patients (84.5%) were RF positive, and none of these patients had an extra-articular disease. Sixty-eight patients (80.9%) were taking methotrexate, and 41 (48.8%) were receiving chloroquine (Table 1). We did not find significant differences neither in the proportion of males and females nor in the mean of age in patients and controls. The patients and controls studied have similar educational level.

The "shared epitope" is associated with RA in Mexican Mestizo individuals. To identify association of HLA-DRB1 SE with RA we pooled the HLA-DRB1 alleles encoding the SE and compared their frequencies in patients and controls. The proportion of individuals carrying at least one HLA-DRB1 allele encoding the SE was significantly increased in RA patients as compared to controls ($p_c = 0.0004$, OR = 4.1, 95% CI = 2.2–7.7; Table 2). In agreement with this observation the frequency of HLA-DRB1 SE alleles was increased in RA patients as compared to controls ($p_c = 0.003$, OR = 3.3 CI = 2.0–5.4; Table 3). The most frequent DRB1 alleles encoding the SE in RA cases as compared with controls were DRB1*0404 (0.161 vs 0.045), DRB1*0405 (0.065 vs 0.010) and DRB1*0101 (0.065 vs 0.035). Interestingly, the subtypes of DRB1*14 were equally distributed in patients and controls. In addition, the frequency of individuals carrying two DRB1 alleles encoding the

TABLE 2 Proportions of rheumatoid arthritis in healthy controls with at least one either SE+ or D⁷⁰⁺ in Mexican Mestizos

	Patients <i>n</i> = 84		Controls <i>n</i> = 99		<i>p</i> Value	OR	CI 95%
	Number	Frequency	Number	Frequency			
SE+	54	0.643	30	0.303	0.0001*	4.1	2.2–7.7
SE-	30	0.357	69	0.697			
D ⁷⁰⁺	31	0.369	62	0.626	0.0009 ^b	0.4	0.2–0.7
D ⁷⁰⁻	53	0.631	37	0.374			

* $p_c = 0.0004$; ^b $p_c = 0.004$.

Abbreviations: CI = confidence interval; OR = odds ratio; SE = shared epitope.

SE was increased in RA patients as compared to controls (0.13 in RA patients vs 0.01 in controls; $p = 0.0014$, OR = 14.8, CI = 1.9–108.1). We observed the following combinations of SE+ HLA-DRB1 alleles among RA patients with two copies of SE: HLA-DRB1*0404-0404 (0.09), HLA-DRB1*0101-0102 (0.09) and the remaining were a combination of HLA-DRB1*0404 with either HLA-DRB1*0401 (0.09), HLA-DRB1*0405 (0.09), HLA-DRB1*0101 (0.36), or HLA-DRB1*0102 (0.09). We also observed combinations of HLA-DRB1*0405 with *1402 (0.09) and *0101 (0.09).

The proportion of females and males and individuals taking DMARDs, as well as the mean of age, formal education, disease duration and the scores for HAQ (a measurement of functional capacity) and DAS (a measurement of disease activity) were not statically different between RA cases carrying at least one HLA-DRB1 SE

encoding alleles (SE+) and cases carrying other HLA-DRB1 alleles (SE-; Table 1). Although, the percentage of RA cases with RF-positive was not statically significant between SE+ (67.6%) and SE- (32.4%), the mean of the RF titer in SE+ patients (546.4 ± 744.9 IU/ml) was higher than SE- patients (291.1 ± 551.9 IU/ml), but this did not reach significance ($p = 0.1$, Student *t*-test). However, we observed an increased proportion of individuals carrying HLA-DRB1 SE+ among RA cases with the highest RF titers. Indeed, when we classified the RA cases according to the presence of the SE and levels of RF as described in materials and methods (negative RF, 0–20 IU/ml; RF titers below the median, < 224 IU/ml; and RF titers above the median, > 224 IU/ml) we observed a significant increased proportion of HLA-DRB1 SE+ cases with RF titers above the median ($p = 0.005$; Table 4).

TABLE 3 Frequencies of HLA-DRB1 alleles encoding either the SE+ or the D⁷⁰⁺ in Mexican Mestizos with rheumatoid arthritis and healthy controls

	Patients <i>n</i> = 168		Controls <i>n</i> = 198		<i>p</i> Value	OR	CI 95%
	Number	GF	Number	GF			
SE+	65	0.399	34	0.167	0.0001*	3.0	1.9–4.9
DRB1*0404	27	0.161	9	0.045			
DRB1*0405	11	0.065	2	0.010			
DRB1*0408	1	0.006	1	0.005			
DRB1*0401	1	0.006	1	0.005			
DRB1*0410	0	0.000	2	0.010			
DRB1*0409	0	0.000	1	0.005			
DRB1*0101	11	0.065	7	0.035			
DRB1*0102	2	0.018	0	0.000			
DRB1*1402	7	0.042	7	0.035			
DRB1*1406	4	0.024	3	0.015			
DRB1*1001	2	0.012	1	0.005			
D ⁷⁰⁺	33	0.196	75	0.379	0.0001 ^b	0.4	0.2–0.7
DRB1*07	7	0.042	22	0.111			
DRB1*11	7	0.042	20	0.100			
DRB1*08	19	0.113	33	0.165			

* $p_c = 0.003$; ^b $p_c = 0.003$.

Abbreviations: CI = confidence interval; GF = gene frequency; OR = odds ratio; SE = shared epitope.

TABLE 4 Proportion of patients with the SE+ and the highest titers of RF

RF titer status	Patients SE+ n = 54	Patients SE- n = 30	OR	95% CI
RF titer 0–20 IU/ml	6	7	0.9	0.3–2.6
RF titer <224 IU/ml	14	15	0.9	0.5–1.9
RF titer >224 IU/ml	34	8	4.3	1.9–9.2

We classified the RA patients into three categories according to the titers of RF: those with RF-negative (0–20 IU/ml), those with titers of RF below the median (< 224 IU/ml), and those with RF above the median (> 224 IU/ml). We performed a chi-squared test to detect an association between HLA-DRB1 alleles encoding the SE and the titers of RF. Thus, we observed a significant increased proportion of HLA-DRB1 SE+ cases with the RF titers above the median ($p = 0.005$).

Abbreviations: CI = confidence interval; OR = odds ratio; RA = rheumatoid arthritis; RF = rheumatoid factor; SE = shared epitope.

The proportion of individuals carrying HLA-DRB1 alleles encoding aspartic acid at position 70 (D^{70+}) of the β chain is decreased in RA patients of Mexican Mestizos background. Although the level of resolution of our HLA-DRB1 molecular typings provide generic information and some HLA-DRB1*07, DRB1*11 and DRB1*08 alleles which are not encoded to aspartic acid at position 70 are not present in Mexican Mestizos. We believed that this should not affect our observations made in Mexican Mestizos. Hence, we grouped the DRB1*07, DRB1*11 and DRB1*08 as D^{70+} . We observed that the proportion of individuals carrying at least one HLA-DRB1 allele encoding the D^{70+} was significantly decreased ($p_c = 0.004$, OR = 0.4, 95% CI 0.2–0.7) among RA cases as compared to controls (0.369 vs 0.626; Table 2). In addition, the frequency of $D70^+$ alleles was significantly lower in RA patients as compared to controls ($p_c = 0.003$ OR = 0.4, 95% CI = 0.2–0.7; Table 3). The frequencies of HLA-DRB1*07, HLA-DRB1*11 and DRB1*08 were as follows 0.042 vs 0.111; 0.042 vs 0.100; and 0.113 vs 0.165 respectively (Table 3). Furthermore, the frequency of RA cases carrying two copies of HLA-DRB1 D^{70+} alleles was decreased in RA patients as compared to controls (0.02 in RA patients vs 0.13 in controls; $p = 0.01$, OR = 0.19, CI 0.04–0.74).

No statistically significant differences were found in proportions of males and females, RF-positive percentage, and individuals receiving DMARDs, as well as the means of age, formal education, disease duration, HAQ score and DAS score between D^{70+} patients and D^{70-} patients (Table 1). No differences in the HLA-DRB1 allele encoding the D^{70+} were found between RA patients with erosive disease and extra-articular manifestations (data not shown).

DISCUSSION

In this study, we showed data that substantiates a significant association between SE+ and RA since the proportion of individuals carrying at least one copy of HLA-DRB1 SE encoding alleles was significantly increased in RA patients as compared to controls. Of interest, we found the HLA-DRB1*0404 to be the most important allele encoding the SE in this population. Although, the proportion of RA patients carrying two copies of SE+ was significantly increased in the group of RA patients (0.13) as compared to controls (0.01) this did not represent what we observed in the majority of patients with RA. This is supporting the notion that only one copy of HLA-DRB1 SE+ alleles might be sufficient to contribute with the expression of susceptibility to develop RA. Moreover, we observed a significant increased proportion of HLA-DRB1 SE+ cases with RF titers above the median (> 224 IU/ml). Although, the RA patients we studied have had less than 3 years of evolution and we did not see differences in the HAQ and DAS scores this is remarkable since high-titers of RF have been associated with severity of disease [25]. We are following these patients to evaluate long-term effects of these markers and possible differences in the course and severity of disease.

The results from our genetic studies confirm the results that have been found in other ethnic groups. Indeed, when we analyzed previous reports of HLA-DRB1 allele associations with RA in search for evidence of HLA-DRB1 SE+ allele association with susceptibility to develop RA we observed that all these studies are in agreement with our observation. All of them are reporting association of HLA-DRB1 alleles encoding the SE with RA. For example, in Caucasians (North Americans and Northern Europeans) the main alleles associated with RA are DRB1*0401, and DRB1*0404; while DRB1*0405 was found in Asians, the DRB1*0405 and *1001 in Spanish, and the DRB1*0102 in Israelis [26]. In addition, our study is in agreement with those of Gorodezky *et al.* [27] and Debaz *et al.* [28] who analyzed associations of HLA-DRB1 alleles with RA in Mexican Mestizos. Moreover, in the last study, the authors described an association between SE+ (DRB1*0404) and RA as well as an association between SE+ and presence and number of rheumatoid nodules as a manifestation of severity disease.

The role of autochthonous genes might be important in the development of RA, we found the HLA-DRB1*0404 as the most frequent SE+ allele in our RA patients and coincidentally this is the most frequent allele found in Mexican populations of Mestizos, Nahuas and Mazatecs ethnical background [29]. Moreover, in 72% of RA patients carrying two copies of SE+ alleles one of them was the HLA-DRB1*0404 allele.

We also observed an increased frequency of HLA-DRB1*0405 and DRB1*0101 alleles encoding the SE in RA patients as compared to controls (0.065 vs 0.010 and 0.065 vs 0.035, respectively). In addition, three patients carried a HLA-DRB1*0102 versus none of the controls. This is very interesting since the two former alleles are infrequent in Mexican Mestizos and the last one has not yet been found in Mexican Mestizo individuals. This is in favor of genetic admixture as a contributing factor in acquiring susceptibility to RA in Mexican Mestizos. These alleles are probably acquired through breeding with other ethnic groups, such as Caucasians or Asians, due to the fact that Mexican admixture estimates have shown a proportion of 56% Amerindian genes, 40% whites genes, and up to 4% black genes [20, 30–32].

In contrast to the findings in Mexican Americans from Starr County Texas made by Del Rincon *et al.* [12], we did not find an association of DRB1*14 with RA. The reason for this could be that the gene pool in our Mexican population and that of the Mexican Americans is different. Indeed, the gene pool of Mexican Americans is derived from 61% Spanish Europeans, 31% Native American (Pima or Papago Indians), and 8% Africans [33] which differs from that reported in Mexican Mestizo [30–32] that we discussed above. Therefore, the association between the HLA-DRB1*14 reported by Del Rincon *et al.* [12] can be attributed to the genetic influence of Native Americans (such as Tinglits, Yakima, and Pima) because the association of HLA-DRB1*1402 with RA has been reported in Yakima and Pima populations [26].

Equally interesting is the search for genetic markers of protection from developing RA. In the present study we observed an important decreased of proportion of patients carrying at least one copy of HLA-DRB1 D⁷⁰⁺ alleles. In this regard the most important alleles were HLA-DRB1*07 and DRB1*11. This is in agreement with previous observations made in similar populations [16]. The proportion of patients carrying two copies of HLA-DRB1 D⁷⁰ was extremely low in RA patients as compared to controls. Although we detected an increased proportion of patients with two copies of SE+ and a decreased proportion of patients with two copies of D⁷⁰⁺, we will need a large enough sample in order to evaluate more precisely the influence of gene-dose on either the risk to develop or protection from developing RA.

The role of SE in RA pathogenesis is unknown. However, the locus HLA-DRB1 is highly polymorphic, and this polymorphism may influence the kind of peptides that can be bound to the HLA-DR molecules. In fact, antigenic peptides, with negatively charged residues, are efficiently bound by SE+ alleles [34]. On the other hand, Penzotti *et al.* [35] have suggested that the hydro-

gen bonding network around SE residues at $\beta 70$ and $\beta 71$ is intimately involved in direct T cell receptor (TCR) contact, and that interaction alone may be sufficient for TCR activation. In view of the fact that the aspartic acid at $\beta 70$ from DRB1*07, DRB1*08, and DRB1*11 has a different charge, this can influence either the kind of peptide that can be bound to HLA molecule or TCR activation.

In conclusion, our results suggest that susceptibility to developing RA in Mexican Mestizos is associated with the presence of at least one HLA-DRB1 SE+ allele. The HLA-DRB1*0404 was the most frequent allele among HLA-DRB1 SE+ alleles in RA patients. Although autochthonous genes can be important in the pathogenesis of RA, the presence of other alleles that are not autochthonous increased the risk to develop RA in our population studied. In addition, alleles encoding the D70⁺ can protect against the development of RA in Mexican Mestizos.

REFERENCES

1. Stastny P: Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 57:1148, 1976.
2. Nepon GT, Byers P, Seyfried C, Healey LA, Wilski KR, Stage D, Nepon BS: HLA genes associated with rheumatoid arthritis: identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis Rheum* 32:15, 1989.
3. Wordsworth BP, Lanchbury JSS, Sakka LI, Welsh KI, Panayi GS, Bell JI: HLA-DR4 subtype frequency in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the human leukocyte antigen class II region. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:10049, 1989.
4. Takeuchi F, Nakano K, Matsuta K, Nabeta H, Bannai M, Tanimoto K, Ito K: Positive and negative association of HLA-DR genotypes with Japanese rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 14:17, 1996.
5. Seglias J, Li EK, Cohen MG, Wong RWS, Potter PK, So AK: Linkage between rheumatoid arthritis susceptibility and the presence of HLA-DR4 and DR beta allelic third hypervariable region sequences in southern Chinese persons. *Arthritis Rheum* 35:163, 1992.
6. Hong GH, Park MH, Takeuchi F, Oh MD, Song YW, Nabeta H, Nakano K, Ito K, Park KS: Association of specific amino acid sequence of HLA-DR with rheumatoid arthritis in Koreans and its diagnostic value. *J Rheumatol* 23:1699, 1996.
7. Taneja V, Giphart MJ, Verduijn W, Naipal A, Malaviya AN, Mehra NK: Polymorphism of HLA-DRB-DQA1 y DQB1 in rheumatoid arthritis in Asian Indians: association with DRB1*0405 and DRB1*1001. *Hum Immunol* 46:35, 1996.
8. Gao X, Brautbar C, Gazit E, Segal R, Naparstok Y, Livneh A, Stastny P: A variant to HLA-DR4 determines

- susceptibility to rheumatoid arthritis in a subset of Israeli Jews. *Arthritis Rheum* 34:547, 1991.
9. Yelamos J, García Lozano JR, Moreno I, Aguilera I, Gonzalez MF, García A, Nuñez-Roldan A, Sánchez B: Association of HLA-DR4-Dw15 (DRB1*0405) and DR10 with rheumatoid arthritis in a Spanish population. *Arthritis Rheum* 36:811, 1993.
 10. de Vries N, Ronningen KS, Tilanus MGJ, Bouwens-Rombouts A, Segal R, Egeland T, Thorsby E, van de Putte LBA, Brautbar C: HLA-DR1 and rheumatoid arthritis in Israeli Jews: sequencing reveals that DRB1*0102 is the predominant HLA-DR1 subtype. *Tissue Antigens* 41:26, 1993.
 11. Wilkens RF, Nepom GT, Marks J, Nettles JW, Nepom BS: Association of HLA Dw16 with rheumatoid arthritis in Yakima Indians: further evidence for the shared epitope hypothesis. *Arthritis Rheum* 34:43, 1991.
 12. Del Rincon I, Escalante A: HLA-DRβ1 alleles associated with susceptibility or resistance to rheumatoid arthritis, articular deformities, and disability in Mexican Americans. *Arthritis Rheum* 42:1329, 1999.
 13. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ: The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30:1205, 1987.
 14. Perdriger A, Chales G, Semana G, Guggenbuhl P, Meyer O, Quillivic F, Pawlowsky Y: Role of HLA-DR-DR and DR-DQ associations in the expression of extra-articular manifestations and rheumatoid factor in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 24:1272, 1997.
 15. Koh WH, Chan SH, Lin YN: Association of HLA-DRB1*0405 with extra-articular manifestations and erosions in Singaporean Chinese with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 24:629, 1997.
 16. Matthey DL, Dawes PT, Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Thomson W, Hajjer AH, Ollier WER: HLA-DRβ1 alleles encoding an aspartic acid at position 70 protect against development of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28:232, 2001.
 17. Nepon GT: Major histocompatibility complex-directed susceptibility to rheumatoid arthritis. *Adv Immunol* 68:315, 1998.
 18. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, Medsger TA Jr, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315, 1988.
 19. González-Treviño O, Yamamoto-Furusho JK, Cutiño-Moguel T, Hernández-Martínez B, Rodríguez-Ryna TS, Ruiz-Morales JA, Vargas-Alarcón G, Granados J: HLA study on two Mexican Mestizo families with autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity* 35:265, 2002.
 20. Cerda-Flores RM, Villalobos-Torres MC, Barrera-Saldana HA, Cortes-Prieto LM, Barajas LO, Rivas F, Carracedo A, Zhong Y, Barton SA, Chakraborty R: Genetic admixture in three Mexican Mestizo populations based on D1S80 and HLA-DQA1 loci. *Am J Hum Biol* 14:257, 2002.
 21. Cardiel MH, Abello-Bañfi M, Ruiz-Mercado R, Alarcon-Segovia D: How to measure health status in rheumatoid arthritis in non-English speaking patients: validation of Spanish version of the Health Assessment Questionnaire Disability Index. *Clin Exp Rheumatol* 11:117, 1993 (Spanish HAQ-DI).
 22. van der Heijde DM, van't Hof MA, van Riel PL, van Leeuwen MA, van Rijswijk MH, van de Putte LB: Validity of single variables and composite indices for measuring disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 51:177, 1992.
 23. Davis RW, Thomas M, Cameron J, St John TP, Padgett RA: Rapid DNA isolation for enzymatic and hybridization analysis. *Methods Enzymol* 65:404, 1980.
 24. Bignon JD, Fernandez-Viña MA: Protocols of the 12th International Histocompatibility Workshop for typing of HLA class II alleles by DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR) and hybridization with sequence specific oligonucleotide probes (SSOP). In Charron D (ed): *Genetic Diversity of HLA, Functional and Medical Implications*. Volume 1. Paris: EDK, 1997.
 25. Bukhari M, Lunt M, Harrison BJ, Scott DGI, Symmons DPM, Silman AJ: Rheumatoid factor is the major predictor of increasing severity of radiographic erosions in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46:906, 2002.
 26. Reveille JD: The genetic contribution to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 10:187, 1998.
 27. Gorodezky C, Lavalle C, Castro-Escobar LE, Miranda-Limon JM, Escobar-Gutierrez A: HLA antigens in Mexican patients with adult rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 24:976, 1981.
 28. Debaz H, Olivo A, Vazquez Garcia MN, de la Rosa G, Hernandez A, Lino L, Burgos R, Fernandez-Vina M, Stastny P, Gorodezky C: Relevant residues of DRB1 third hypervariable region contributing to the expression and to severity of rheumatoid arthritis (RA) in Mexicans. *Hum Immunol* 59:287, 1988.
 29. Vargas-Alarcón G, Gamboa R, Zuñiga J, Hernández-Pacheco G, Ramos-Kuri M, Castillo E, Gomez-Casado E, Martinez-Laso J, Arnaiz-Villena, Granados, J. HLA-DR4 allele frequencies on Indian and Mestizo population. *Hum Immunol* 61:341, 2000.
 30. Lisker R, Pérez-Briseño R, Granados J, Babinsky V: Gene frequencies and admixture estimates in a Mexico City population. *Am J Phys Anthropol* 71:203, 1988.
 31. Lisker R, Ramírez E, Pérez Briceño R, Babinsky V: Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum Biol* 62:791, 1990.
 32. Bekker-Méndez C, Yamamoto-Furusho JK, Vargas-Alarcón G, Ize-Ludlow D, Alcocer-Varela J, Granados J: Hap-

- lotype distribution of class II MHC genes in Mexican patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 27:373, 1998.
33. Haines CL, Hewett-Emmett D, Bertin TK, Schull WJ: Origins of U.S. Hispanics. Implications for Diabetes. *Diabetes Care* 14:618, 1991.
34. Hammer J, Gallazi F, Bono E, Karr RW, Guenot J, Valsasnini P, Nagy ZA, Sinigaglia F: Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association. *J Exp Med* 181:1847, 1995.
35. Penzotti JE, Nepom GT, Lybrand TP: TCR/HLA-DRB1*04 molecular modeling predicts site-specific interactions for the DR shared epitope associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 40:1316, 1997.