

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA**

**" ESTUDIO INMUNOGENETICO EN PACIENTES CON
ESPONDILOARTROPATIAS (Ea) DE INICIO JUVENIL MESTIZOS
MEXICANOS".**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

PRESENTA:

BEATRIZ SILVA RAMIREZ

DIRECTOR DE TESIS DR. JULIO GRANADOS

MEXICO, D.F.

2006



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.

INDICE GENERAL

- I. RESUMEN**

- II. ESPONDILOARTROPATIAS JUVENILES, GENERALIDADES**

- III. EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC),
GENERALIDADES**

- IV. RELACIÓN MHC Y EAJ**

- V. OBJETIVOS**

- VI. MATERIAL Y METODOS**

- VII. RESULTADOS**

- VIII. DISCUSION**

- IX. CONCLUSIONES**

- X. BIBLIOGRAFÍA**

- XI. TABLAS.**

- XII. ANEXOS.**

I. RESUMEN.

OBJETIVO. Describir la asociación entre genes del MHC clase I y II y las Espondiloartropatías de inicio juvenil en una población mestiza mexicana.

METODOS. El estudio incluye 66 pacientes consecutivos con EaJ (45 con Espondilitis Anquilosante (EA) y 21 con Espondiloartropatía no diferenciada (Ea-no dif) y 99 controles no relacionados sanos todos ellos mestizos mexicanos. La detección de alelos HLA-A, -B y -DR se realizó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con sondas de secuencia específicas (SSP). Las diferencias entre los grupos se analizaron por tablas de contingencia con la prueba Mantel- Haenzel y exacta de Fisher y el RR por el método Woolf.

RESULTADOS. La frecuencia del HLA-B 27 se encontró incrementada significativamente ($p < 10^{-3}$, RR=53.0, FE=51%), particularmente con EAJ ($p < 10^{-3}$, RR=67.42, AF=57%). En contraste, la frecuencia de HLA B 44 y B14 están disminuidas con respecto al grupo control. Es interesante mencionar que en aquellos pacientes con estos alelos y además B 27 positivos en su genoma, la edad de inicio del padecimiento se presentaba después de los 15 años y en aquellos pacientes B 27 positivos y B 39 la edad de inicio de la enfermedad se presentó entre los 5 y los 7 años. Para las moléculas clase II una probable asociación negativa fue encontrada con HLA- DR 5 ($p < 0.05$) pero no correlaciono con la edad de inicio de la enfermedad.

CONCLUSIÓN. El HLA-B 27 tiene una asociación muy fuerte con las Ea de inicio juvenil particularmente para la EA y es posible que al encontrarse con alelos como el

B 15 y el B 39 confieran un inicio de la enfermedad más temprano durante la infancia, y aquellos como el B 44 y B14 en la adolescencia, sin embargo estudios familiares podrían concluyentes.

II. ESPONDILOARTROPATÍAS JUVENILES, GENERALIDADES.

Las espondiloartropatías juveniles (EaJ), son un grupo de entidades nosológicas y síndromes de inicio antes de los 16 años que comparten características clínicas, patológicas y genéticas comunes que las distinguen del resto de las enfermedades reumáticas pediátricas. Se caracterizan por inflamación crónica de la sinovia y entesis de las articulaciones; principalmente en extremidades inferiores de niños y adolescentes, desencadenada primordialmente por infecciones recurrentes de vías urinarias y gástricas.

La afectación en columna vertebral y articulaciones sacroiliacas (SI) y/o complicaciones extrarticular se desarrolla tiempo después del inicio de los primeros síntomas. Están asociadas con el antígeno HLA-B 27 y con la ausencia del Factor Reumatoide (IgM FR) y de nódulos reumatoides (1,2).

CLASIFICACIÓN.

Se han realizado varios estudios para clasificar y diferenciar las espondiloartritis de inicio juvenil de otras enfermedades reumáticas como la Artritis Reumatoide Juvenil (ARJ) o Artritis Crónica Juvenil (ACJ) (3-6). De estos estudios se reconocen dos subgrupos de la enfermedad (7,8). La que incluye las formas indiferenciadas y los desordenes diferenciados claramente diagnosticados, cumpliendo con los criterios específicos y que presentan cambios estructurales como: Enfermedad espinal, sacroiliítis, o anquilosis tarsal y enfermedad extrarticular (como la psoriasis).

La enfermedad representativa de este grupo es la Espondilitis Anquilosante Juvenil (EAJ). En caucásicos sajones se ha observado que del 3 al 21% de los pacientes con EA tienen las primeras manifestaciones antes de los 16 años de edad (9,10). En la población

mestiza mexicana la proporción de pacientes con inicio en la infancia o juvenil es mayor (11). La EA juvenil y la del adulto difieren en su forma de inicio y en ambas los varones son los principalmente afectados.

Clínicamente en niños y adolescentes existe afección periférica de articulaciones y entesis, con una participación axial menos frecuente (12-17). En muchos de estos pacientes se establecen los diagnósticos de Artritis Reumatoide Juvenil (ARJ) o el Síndrome de Artropatía y Entesopatía Seronegativa (SAES), la afección de la columna vertebral y articulaciones sacroiliacas (SI) se presenta años después del inicio de la sintomatología (18-20).

El diagnóstico de la EA que empieza antes de los 16 años se basa en los criterios que resultaron del estudio sistemático de pacientes con EA del adulto en donde la participación axial y SI es frecuentemente en la etapa inicial de la sintomatología. En la forma juvenil se presentan en promedio después del quinto año de evolución con síntomas y cambios radiográficos propios de estas entidades (21,22).

La forma indiferenciada está caracterizada por un proceso inflamatorio (artritis, entesitis, tendinitis o dactilitis) o Síndrome de Entesopatía y Artropatía (SEA).

La Artritis Reactiva (ARe), Espondiloartritis psoriásica (EPs), Síndrome de Reiter (SR), la artropatía asociada a la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa crónica inespecífica y la Tarsitis Anquilosante forman parte de las espondiloartropatías con un patrón indiferenciado y en un lapso de tiempo no especificado cambian (dependiendo de factores tales como la raza o grupo étnico, sexo y factores ambientales) llegando a cumplir con los criterios de diagnóstico de las formas definidas, la proporción de casos que no se diferencian o que pasan de una entidad a otra se desconoce.

EPIDEMIOLOGIA.

Tanto la forma adulta como la juvenil de las espondiloartropatías están asociadas con el HLA-B27. Entonces su prevalencia dependerá de la presencia de este antígeno, algunos otros marcadores genéticos se han reportado (su distribución depende de factores tales como raza o grupo étnico). También los factores ambientales, particularmente aquellos que predisponen a infecciones recurrentes causadas por bacterias artritrógenas pueden inducir el inicio juvenil e influir en la epidemiología (23).

Las espondiloartropatías de inicio juvenil prevalecen sobre las otras artritis de la infancia. En base a los registros de Amerindios de Alaska y Canadá, se conoce que la incidencia es de 1.44 y 2.1/ 100 000 respectivamente y 2.0 / 100 000 en los Estados Unidos y con una incidencia mayor en mestizos mexicanos y otros grupos étnicos como: los hindúes y poblaciones del norte de África (24-26).

En décadas recientes se observa, un incremento en la incidencia de EaJ es notorio en las Clínicas de Reumatología Pediátrica, pasando del 0-16% en los 70s, al 31% en los 80s (27). Actualmente los registros marcan que el ratio de incidencia entre ARJ/EaJ es entre 1.4/1 y 2.6/1 (28-30). Algunos de los casos en donde se tiene un niño diagnosticado como ARJ o AJC este podría evolucionar en un tiempo no determinado a una EaJ indiferenciada y más tarde a EAJ (5 a 10 años) con lo cual la incidencia de esta patología se elevaría .

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las Espondiloartropatías (EaJ) tienen un espectro de manifestaciones clínicas muy amplio, un resumen de estas manifestaciones se presenta en la **TABLA I**.

La entesopatía y artropatía de articulaciones periféricas son los marcadores clásicos de las EaJ desarrollándose dentro del primer año de inicio de los síntomas y progresan con el tiempo de una forma indiferenciada a una diferenciada con la presencia de los rasgos clínicos específicos de cada uno de los síndromes.

Por entesopatías se entiende al proceso patológico (en este caso inflamatorio) de las entesis, es decir de los sitios de inserción de tendones, ligamentos, fascias y cápsula articular del hueso. La más frecuente es la talalgia (entesis de la aponeurosis plantar media del calcáneo) y le siguen con menor frecuencia la tuberosidad anterior de la tibia, región media esternal etc. En algunos niños existen episodios de entesitis seguido de remisión completa o parcial en algunos otros es severa y persistente asociada a la erosión cortical del hueso y anquilosis de la articulación.

La artropatía se presenta como inflamación de las articulaciones no específica al inicio con hipersensibilidad y movilidad limitada en pocos casos se acompaña de dolor, a excepción de la cadera y los hombros que generalmente tienen algún grado de inflamación. Las articulaciones más frecuentemente afectadas son las rodillas, el medio tarso y los tobillos con un patrón oligoarticular o asimétrico. Algunos pacientes tienen un episodio de oligoartritis con duración de 3 a 6 meses y que evolucionan a una AReJ, otros cursan con episodios de artritis y remisión parcial o completa. Finalmente existe un grupo de niños con artropatía persistente y severa que involucra varias articulaciones y que evolucionaran a EaJ (31).

El proceso de inflamación indiferenciada incluye episodios aislados de artritis, entesitis, tendinitis, dactilitis (dedos en salchicha) en dedos de pies y manos, consistiendo en una tumefacción uniforme de un dedo, generalmente único. La presencia de entesopatía y artropatía se denomina SEA (Síndrome de Entesopatía y Artropatía) con una probabilidad muy alta de evolucionar a una forma definida de espondiloartropatía (1,2,31). En un estudio realizado en niños con diagnóstico de SEA, el 69% desarrolla una EaJ, dentro de los siguientes 11 años después de los primeros síntomas (32).

En otro estudio en niños mestizos mexicanos con SEA persistente, el 90% de ellos evolucionaba a EAJ en un lapso no mayor de 10 años (33). En niños italianos 1 de cada 8 con SEA desarrollan EAJ, en los siguientes cinco años después del inicio de los primeros síntomas (34). Las diferencias en los rangos de progresión de SEA a EAJ depende no sólo de factores raciales sino de criterios clínicos para su valoración (33).

Los niños que inician una EaJ, pueden tener remisiones completas después de una o dos episodios moderados de la enfermedad activa, con episodios recurrentes de entesitis y artritis. Extendiéndose con el curso de la enfermedad a la espina lumbar e inflamación de estructuras del esqueleto axial en particular de la articulación sacroileaca. En el curso crónico de la enfermedad se incrementa el número de articulaciones y entesis afectadas, restringiendo la movilidad de niños y adolescentes. La actividad y el daño de la enfermedad pueden ser valoradas en base a movilidad espinal y el número de articulaciones y entesis con inflamación. Estos síndromes son incapacitantes y entre más temprano es el inicio más afección y mayor incapacidad (35).

En las EaJ diferenciadas existen cambios estructurales, que son valorados radiográficamente como: la sacroiliitis, enfermedad espinal o anquilosis tarsal, además

de síntomas extra-articulares (por ejemplo: psoriasis) o datos positivos de cultivo bacteriológico como en el caso de ARe (36).

Artritis Reactiva (ARe).

Se refiere a la inflamación aguda o crónica, recurrente o persistente de la membrana sinovial y/o entesis y con menor frecuencia de las mucosas, la piel y sus anexos, que se presenta después de infecciones entéricas y urogenitales por gérmenes tales como *salmonella sp.*, *Shigella flexneri.*, *Yersinia enterocolitica* y *Chlamydia trachomatis*, principalmente. La infección desencadena el cuadro inicial que suele presentarse en las siguientes semanas (de cuatro a seis). La artritis y dactilitis son las condiciones características además de la infección que conducen al diagnóstico, el pronóstico es bueno (31,37,38).

Síndrome de Reiter (SR).

Poco frecuente en niños, inician como una EaJ indiferenciada el diagnóstico se completa cuando cumple con la triada de Artritis, Conjuntivitis (bilateral) y Uretritis (Cervicitis), posteriores a un cuadro infeccioso. Solo algunos casos presentan lesiones cutáneas que son transitorias (keratoderma, blenorragia). En un estudio retrospectivo en niños con S. de Reiter, el compromiso axial se presentaba en promedio 29 meses después de un cuadro de oligoartritis de miembros inferiores, el 19% de estos niños presentaban sacroiliitis después del séptimo año de inicio de la sintomatología (39,40).

Artritis enteropática

La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa son dos síndromes que conforman el grupo de IBD (Inflammatory Bowel Disease) y que se acompañan con artritis periférica y/o axial. La enfermedad de Crohn se involucra con la mucosa y región linfática del colón, ileum distal y otros segmentos del tubo digestivo con lesiones muy características. La colitis ulcerativa es un proceso inflamatorio (acompañado de neutrofilia y abscesos) que involucra la mucosa del colón.

Las articulaciones en niños y adolescentes que desarrollan enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, se presentan inflamadas en forma simultánea o poco después del inicio de los síntomas intestinales, involucrando extremidades inferiores, el patrón de la enfermedad en más de los casos es oligoarticular con duración de 4 semanas, pocos pacientes pueden desarrollar erosión de la articulación y cambios estructurales que no necesariamente llevan a un daño permanente en la articulación. La presentación de espondilitis y sacroiliitis en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerativas están asociadas a la presencia del alelo HLA-B27 (41-43).

Existe una asociación entre las EaJ y afección intestinal, sin embargo en el 80% de los pacientes no existen cambios agudos ó crónicos de la mucosa y submucosa del ileum y/o colón. Teóricamente, la inflamación del intestino incrementa la permeabilidad y el ingreso de antígenos que influyen en la Respuesta Inmune local (44).

EAJ.

Los pacientes con EAJ inician con un cuadro indiferenciado que puede incluir el Síndrome de Entesopatía y Artropatía (SEA) y más tarde se presentan cambios radiográficos con dolor persistente y/o rigidez sacroiliaca, lumbar y menos frecuencia de las crestas iliacas o e trocánter mayor. Los síntomas, a veces unilaterales e intermitentes, se exacerbaban o aparecen luego de periodos prolongados de reposo y disminuyen o mejoran con el ejercicio. Conforme se afectan las articulaciones y las entesis de las vertebrales dorsales y de la caja torácica, aumenta el área de dolor y se limita la expansión del tórax, además se presentan síntomas como: fiebre, fatiga, pérdida de peso, trastornos del sueño por dolor intenso de presentación nocturna. La exploración física muestra disminución de la movilidad de la columna lumbar en todos los planos, dolor a la presión en la región sacroiliaca y disminución de la expansión torácica, así como contractura muscular paravertebral. A medida que la EAJ evoluciona, la región lumbar se rectifica, la cifosis dorsal se acentúa y la motilidad cervical disminuye. Las articulaciones y entesis periféricas, en especial de miembros inferiores (rodillas, coxofemorales, tarsos), se muestran inflamadas, con hipersensibilidad a la presión y al movimiento. Las entesis más afectadas son las de las fascias plantar, el tendón de Aquiles en el calcáneo, la tuberosidad anterior de la tibia, el trocánter mayor y el tarso, la entesis es más severa y persistente que la artritis.

La afección articular sacroiliaca muestra desde las primeras etapas, esclerosis subcondral e irregularidades de la superficie articular de los iliacos para después mostrar erosiones, disminución del espacio articular y anquilosis parcial o total. En esqueleto axial se observan rectificación de la columna lumbar, disminución de los espacios articulares

interapofisiarios, esclerosis marginal, encuadramiento de los cuerpos vertebrales, estrechamiento y erosión de la unión disco vertebral, osificación y calcificación de los ligamentos vertebrales. En las articulaciones periféricas se encuentra osteopenia generalizada y disminución del espacio articular y progresión de la anquilosis en las articulaciones inflamadas. Es notoria la tendencia del tarso a formar anquilosis.

La sacroileítis se expresa clínicamente por dolor tipografiado en la nalga, en su pared superointerna, por debajo y por fuera de la región lumbar, pudiendo irradiarse hacia la cara posterior del muslo hasta la rodilla, evidenciándose al examen dolor a la presión y a la movilización mediante las maniobras correspondientes. El compromiso puede ser unilateral, bilateral o alternante (31,35,36).

Al comparar la evolución durante el primer año de la EA juvenil y del adulto encontramos que: la artritis y entesitis son más frecuentes en niños y en adultos el compromiso axial. Durante el curso de esta patología en el adulto se incrementa el daño periférico de las articulaciones y en los niños se desarrolla el compromiso axial. Sin embargo el daño en las entesis y articulaciones es más severo en los niños que en los adultos (36).

Artritis Psoriásica Juvenil (APsJ).

Es la artritis asociada a psoriasis que se presenta en niños menores de 16 años, el cuadro clínico es variable, puede presentarse como oligoartritis persistente y más tarde desarrollarse a poliartritis en extremidades inferiores y superiores, es más frecuente en niñas, la edad de inicio es entre los 7 y 11 años y la psoriasis entre los 9 y 13 años. Los cambios radiográficos se presentan después y consisten en osteopenía, periostitis ,

erosión, anquilosis, la columna cervical es el segmento más comprometido. Las manifestaciones sistémicas incluyen iridociclitis crónica, pericarditis y en pocos casos amiloidosis (31, 45,46).

Espondiloartropatías no diferenciadas (Ea no-dif).

Con este nombre se identifican aquellas artrítides de etiología desconocida, con manifestaciones axiales y periféricas que comparten características y factores genéticos predisponentes, pero que no se pueden incluir en entidades bien definidas como en el caso de la EA. Originalmente se utilizó para describir pacientes con sacroiliítis unilateral sintomática asilada o con artritis periférica y también aquellos pacientes con dactilitis sola o con tendinitis aquilea. Actualmente se tiene el concepto de que representan las formas iniciales de entidades específicas, ya que generalmente progresan clínica y radiográficamente a EAJ.

Actualmente no existe un consenso de cuantas EaJ no diferenciadas progresan a las formas diferenciadas, debido a que puede transcurrir un período de entre 5 y 10 años para su evolución (31,47).

De lo antes descrito queda implícito que las espondiloartropatias son síndromes cuyo rasgo característico es la inflamación crónica de las articulaciones y del esqueleto axial.

El proceso inflamatorio es una respuesta defensiva del organismo ante alguna infección, trauma y agente tóxico, siendo el resultado de una interacción compleja entre factores solubles, células y sus receptores pero lamentablemente en ocasiones esta respuesta es desmesurada y descontrolada, ocasionando más daño que beneficio (48-50).

La entesopatía y artropatía crónicas de las articulaciones periféricas son los marcadores clásicos de la EaJ que llevan a la destrucción del cartílago y el hueso comúnmente progresiva resultando en la deformidad y reducción de la capacidad funcional igualmente crecientes que llevan a la invalidez. Los fenómenos de fibrosis y osificación con formación de hueso nuevo suelen aparecer y así ocasionando lo que se conoce con el nombre de anquilosis, que en niños se presenta años después del inicio de los primeros síntomas comprometiendo la espina lumbar y articulación sacroileaca, que igualmente reduce la capacidad funcional (31,32).

Los estudios histopatológicos del esqueleto axial y entesis de las articulaciones de pacientes con Ea son escasos debido principalmente a la dificultad para obtener biopsia de estos tejidos, actualmente el desarrollo de nuevos métodos menos invasivos permiten su análisis (51).

Los primeros cambios observados en la sinovia, entesis y sacroileacas inflamadas de estos pacientes con Ea, es la presencia de tejido granular, la inmunohistoquímica de este tejido revela que existe predominio de linfocitos T tanto CD4+ como CD8+, además de macrófagos y formación de nuevos vasos sanguíneos. La Hibridación in situ demuestra la presencia de mRNA de TNF alfa, cantidades muy bajas de mRNA de TGF beta y la no presencia de mRNA de IL-1(51,52).

En el infiltrado celular existe predominio de linfocitos T CD4+ que ocasionalmente forman folículos linfoides y de macrófagos, en menor número se encuentran también linfocitos TCD8+, células NK y linfocitos B (52).

Los macrófagos existentes producen cantidades importantes de sustancias mediadoras de inflamación como es el caso del óxido nítrico (NO) y citocinas pro-inflamatorias como

TNF-alfa e IL-1, promoviendo la cascada inflamatoria en la articulación (53). Existe una población particular de estas células en la sinovia y la mucosa intestinal de pacientes con Ea, que expresan CD163, en donde la característica principal de estos macrófagos es la producción elevada de TNF-alfa contribuyendo a la respuesta inflamatoria, la producción local de CD163 soluble promueve la inhibición en la proliferación y activación de células T. Esta alteración en la activación permite la persistencia de antígenos bacterianos y la no apropiada respuesta inflamatoria en la articulación y deja claro el enlace entre mucosa intestinal y articulación, que por mucho tiempo fue ignorada (54-56).

La histopatología de la inflamación sinovial en las Ea, tiene características especiales que contribuye a diferenciarla de otras enfermedades reumáticas y realizar un diagnóstico más certero y temprano; el uso de nuevas técnicas moleculares como microarreglos y proteómica serán de gran ayuda para su detección en etapas iniciales (51-53). La modulación del proceso inflamatorio en las Ea, es uno de los retos principales para los próximos años, que sólo podrá realizarse cuando podamos entender todos los mecanismos que lo amplifican en dichos padecimientos (57).

Terapéutica.

En la EaJ, las medidas de tratamiento más adecuadas son la terapia física y los antiinflamatorios no esteroideos (AINE). El ejercicio está encaminado a mantener postura erecta, evitando el desarrollo de deformidades que repercuten, al progresar en la función respiratoria. La natación es quizá el ejercicio ideal, evitándose los deportes de contacto por ser riesgosos para el esqueleto de los pacientes. Los AINE son parte esencial del

tratamiento; siendo los más usados indometacina, naproxeno y el tolmetín sódico. La sulfasalazina que tiene su efectividad en las manifestaciones periféricas y a largo plazo para el problema vertebral (58-60).

Dentro del espectro de manifestaciones que tienen los niños con EaJ, ciertos eventos son irreversibles como el daño funcional y estructural de las articulaciones, el camino indicado en estos casos es la terapia reconstructiva de la articulación.

El futuro terapéutico va dirigido a la modulación de la respuesta inflamatoria más que a supresión.

III. EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

GENERALIDADES.

Organización Genética.

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) esta formado por un grupo de genes ligados, localizados en el brazo corto del cromosoma seis Humano (6p21.3). Este complejo ocupa cuatro millones de pares de bases (4 Mb cuatro megabases), se tienen localizados 412 loci, 252 genes donde 80 de ellos codifican para antígenos leucocitarios y el resto son genes no evolutivamente relacionados con HLA, pero están involucrados con su función, contiene además 139 pseudogenes (61-64) **Figura 1.**

Son tres tipos de moléculas primordialmente codificadas por genes MHC. Las de clase I y clase II que pertenecen al HLA, término que proviene del inglés (human leukocyte antigens) y las de clase III corresponden a proteínas del complemento.

Los genes de moléculas clase I se encuentran en el extremo más telomérico del MHC, ocupan aproximadamente 2 Mb y existen alrededor de 50 genes pero se calcula que podrían ser más. Tres de estos son los loci HLA-A, -B, y C, llamados clásicos o clase Ia, que son los principales orquestadores del concierto inmunológico. Los genes de moléculas clase II, están más centroméricos y son más de 30 loci, codificando para dos clases de cadenas polipéptidicas (alfa y beta). Los genes clase III están distribuidos entre lo genes de clase I y clase II. El 10% de las secuencias de DNA del MHC codifica para proteínas funcionales, mientras el 90% restante se desconoce (65).

Los genes HLA codifican para proteínas que se expresan en la superficie celular y cuya función es presentar péptidos previamente procesados al receptor de las células T (TCR) (66,67). Sin embargo algunos de estos genes parecen haber perdido esta función, pero su

estructura sugiere que en algún momento tuvieron la capacidad de presentar péptidos. También existen otros genes con funciones inmunológicas y estructura distinta a los genes HLA, pero conectados evolutivamente, considerándose genes funcionalmente relacionados (68).

Algunos mamíferos placentarios tienen una organización de los genes del MHC similar al del humano, otros difieren considerablemente. Aún entre individuos de la misma especie existen diferencias, esto incluye a los humanos (69).

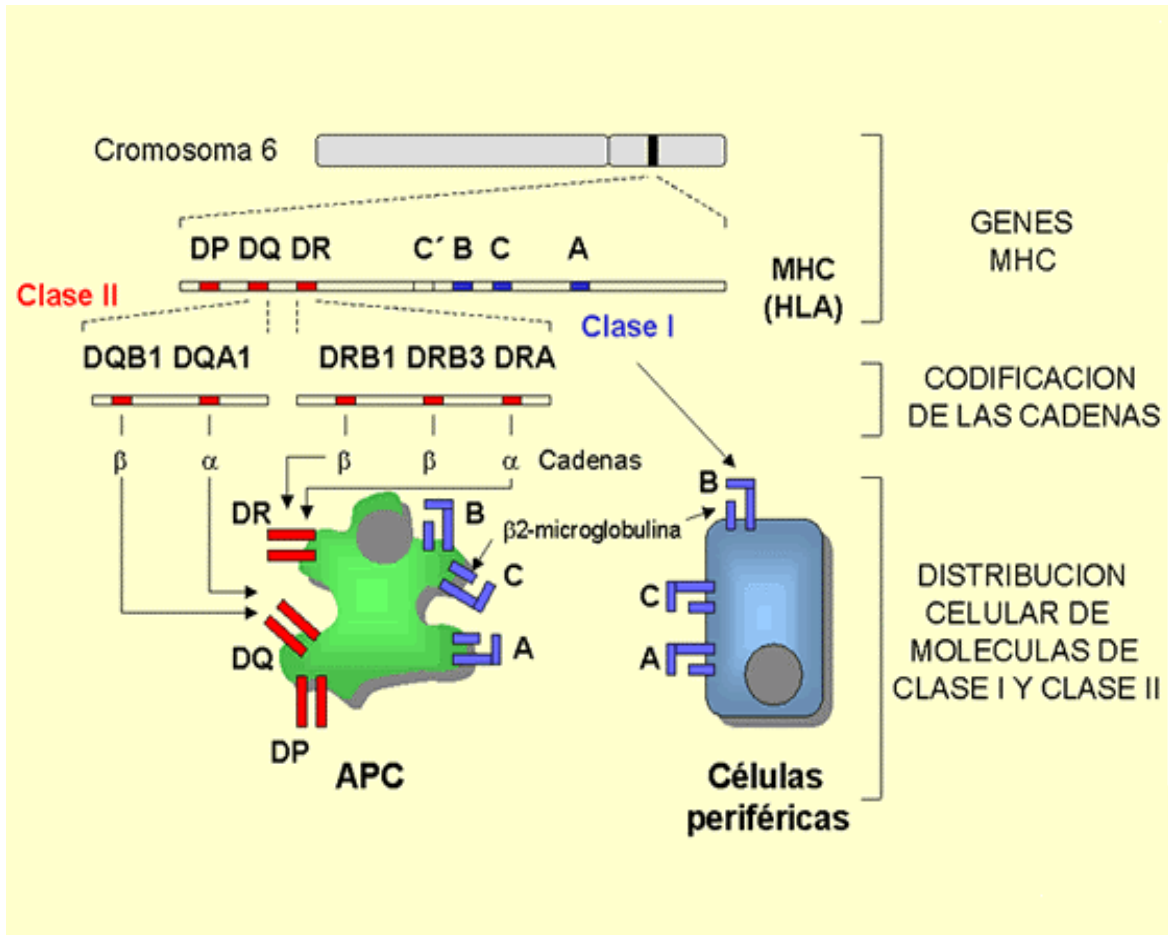


Figura 1. Mapa del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

GENES CLASE I.

En la región de clase I, los loci HLA (loci de clase I) están entremezclados con otros loci no relacionados de función inmunológica desconocida, algunos ejemplos de ellos son el loci que codifica para la cadena b-tulina, proteína GTP que es un factor de transcripción entre otros.

De los loci HLA de clase I, ocho de ellos están ocupados por genes funcionales (HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, MICA y MICB), cuatro por pseudo genes (HLA-H, -J, -K y L), cuatro

más por pseudogenes truncados (HLA-75, -16, -80 y -90) y tres más son fragmentos de genes (HLA-17, -21 y -30) (70).

Los genes HLA de clase I se dividen en dos categorías; clase Ia y clase Ib, los genes clase Ia (genes clásicos; HLA-A y -B) se unen a péptidos y los presentan mediante el receptor de los linfocitos T, estas proteínas se expresan en la superficie de las células somáticas pero en mayor cantidad en células linfoides siendo muy polimórficas (diferentes alelos). Las proteínas codificadas en los genes de clase Ib (genes no clásicos; HLA-E, -F, -G) presentan péptidos a un subgrupo de células T; el patrón de expresión en los tejidos es distinto al de las moléculas Ia y presentan un número reducido de variantes o alelos (71). El locus HLA-C parece estar en medio de esta clasificación ya que la proteína presenta péptidos bajo condiciones fisiológicas que aún no están bien determinadas, además que su expresión es baja y el número de alelos es reducido con relación al HLA-A y HLA-B.

Los loci HLA-E, -F, -G parecen tener aún restos de funcionalidad o bien que sean loci especializados en presentar ciertos tipos de péptidos (en el ratón algunas moléculas clase Ib aparentemente se han especializado en presentar péptidos codificados por genes de DNA mitocondrial. Al final de la escala parecen estar pseudogenes recientemente inactivados y pseudogenes truncados (fragmentos de genes) (72,73).

GENES CLASE II.

La región de clase II contiene una gran cantidad de genes como los genes LMP2 y LMP7 que codifican para subunidades de proteosomas y los genes TAP1 y TAP2 que codifican

para proteínas transportadoras de péptidos, también se encuentra ahí el pseudogen HLA-Z1 y los genes HLA de clase II que están clasificados en cinco familias: HLA-DP, -DN, -DM, -DO, -DQ y -DR. En cada familia hay dos tipos de loci, A y B, los cuales codifican para cadenas polipeptídicas alfa y beta respectivamente. Las moléculas HLA de clase II son heterodímeros formados por una cadena alfa y otra beta. Las dos cadenas provienen de una misma familia; por ejemplo la cadena DP alfa se asocia con una cadena DP beta, DM alfa con DM beta. Con respecto a la familia DR, todos los humanos tienen un locus DRA

(DR alfa) pero difieren en el número de locus DRB. Para cada cromosoma pueden encontrarse de 2 a 5 genes. Se conocen nueve loci DRB: HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5 que son funcionales y por otro lado el HLA-DRB2, -DRB6, -DRB7, -DRB8 que son pseudogenes y HLA-DRB9 que es un fragmento de gen. Los diferentes números y combinaciones de los genes DRB definen varios haplotipos HLA-DR (74,75).

GENES CLASE III.

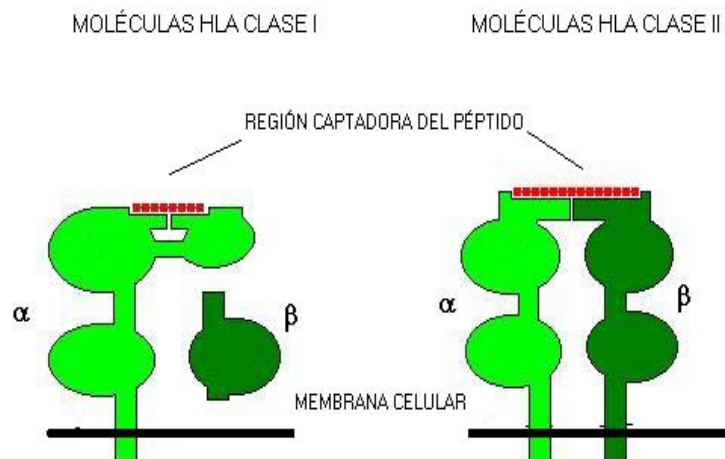
La región de clase III contiene genes que están principalmente involucrados en la inmunidad natural. En primer lugar encontramos genes que codifican a los componentes iniciales de la cascada del complemento como el C4, el C2 y el factor B, así como los genes del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y linfotoxina. Además hay otros genes como los de las proteínas de choque térmico, la 21-hidroxilasa, la sintetasa valil-tRNA entre otros (76-79).

Estructura y nomenclatura de los genes HLA.

En el sistema HLA los genes se designan por letras capitales y series de números, para las moléculas clase II; La primer letra (-D) identifican el gen (locus), la segunda letra especifica a la familia de donde proviene (M, N/O, P, Q y R) y la tercer letra indica el tipo de gen (A para alfa y B para beta). El primer número que sigue de esas tres letras especifica el locus y el resto de los números denotan el alelo. La designación del locus (letras) y el alelo (números) están separados por un asterisco (*). La nomenclatura de las moléculas de clase I sigue reglas semejantes, lo que difiere es el número de locus, por ejemplo HLA-A*0201 la cual es el alelo 1 del locus A2 (80).

Los genes de clase I como de clase II se dividen en exones e intrones; el gen completo excepto su región reguladora se transcribe en RNA, siendo los intrones removidos durante el procesamiento del transcrito primario (81). La organización de los exones e intrones de los genes HLA de clase I es bastante similar al de otras especies de vertebrados. Cada gen de clase I consiste de 6 o 7 exones, El exón 1 abarca la región 5' no traducida (5'UT) y un pequeño porción de DNA codifica para el péptido líder. La región 5'UT es transcrita a RNA que forma parte de la secuencia de mRNA pero no es traducida a proteína. El péptido líder es el responsable del paso de la proteína a través de la membrana durante la síntesis en el retículo endoplásmico, después de esto el péptido líder es eliminado ya que no aparece en la proteína madura. Los exones 2, 3 y 4 codifican para tres dominios denominados $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ respectivamente. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ contienen los sitios que unen a los péptidos producidos durante el procesamiento de otras proteínas; estos sitios se les llama dominios fijadores del péptido. El dominio $\alpha 3$ tiene una estructura característica también observada en las moléculas de inmunoglobulina de

ahí su nombre como dominio semejante a inmunoglobulina. El exón 5 codifica para la región transmembranal de la molécula. Los exones 6 y 7 codifican para la región citoplásmica (cola). En cuanto a los genes de clase II hay alguna variación en su organización genética entre los vertebrados, pero generalmente en los mamíferos los genes A consisten de 5 exones y los genes B de seis exones. En ambos genes el exón 1 contiene a la región 5'UT y la secuencia que codifica al péptido líder; el exón 2 codifica el dominio $\alpha 1$ (genes A) o el $\beta 1$ (genes B), estos dominios contribuyen a la región captadora del péptido de la molécula de clase II; el exón 3 codifica para los dominios ($\alpha 2$ y $\beta 2$); los exones restantes codifican para, la región transmembranal e intracitoplásmica (82), Figura 2.



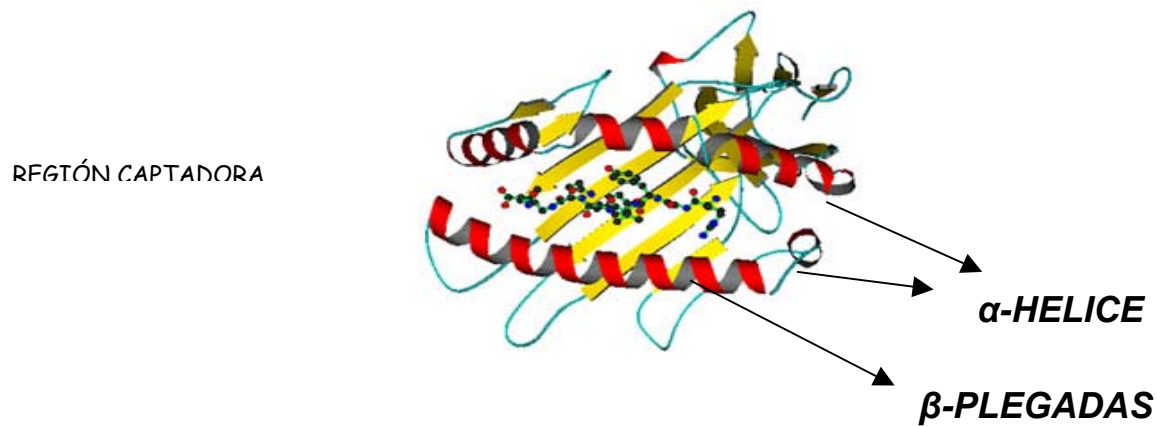


Figura 2.- Estructura de las moléculas HLA de clase I y de clase II y de la Región Captadora de antígeno ó surco de unión al antígeno

Expresión y Regulación de los genes HLA.

Los genes clase Ia se expresan en la mayoría de las células somáticas adultas. Sin embargo hay algunas excepciones que incluyen a las neuronas, células del páncreas, células del miocardio, espermatozoides en ciertas etapas de desarrollo y ciertas células de la placenta. Las moléculas de clase I no se expresan en la superficie de huevos no fertilizados.

Entre todas las células somáticas adultas, los linfocitos T y B expresan niveles altos de moléculas clase Ia con relación a otras células que generalmente expresan niveles bajos.

La expresión puede aumentar o disminuir por el estímulo de factores como las infecciones virales y citocinas por ejemplo los interferones.

La expresión de los genes clase Ia está regulada por secuencias corriente arriba de la región codificante. Las secuencias cortas se denominan motifs o cajas. Estas secuencias son sitios que se unen a las proteínas encargadas de iniciar la transcripción del DNA en RNA. Las proteínas generalmente denominadas factores de transcripción o factores nucleares (porque se encuentran en el núcleo de la célula) pueden acelerar o frenar el proceso de la transcripción (83). Algunos factores son específicos para ciertos genes o específicos para células, mientras que otros actúan sobre diferentes tipos de células o genes. La región que regula la transcripción se encuentra corriente arriba del sitio donde inicia, aunque algunos motifs reguladores pueden estar localizados en otras partes del gen, por ejemplo en los intrones. La región reguladora corriente arriba puede dividirse en dos partes, los promotores y la aumentadora (enhancer) (84). El promotor actúa a una corta distancia (en mamíferos el promotor está a unas 35 pares de bases del sitio de inicio de la transcripción), el promotor siempre está en el extremo 5' y opera solamente en la orientación correcta. Este contiene dos motifs que también se observan con frecuencia en otros genes, la caja TATA y la caja CCAAT. Las secuencias aumentadoras operan a distancias de varias kilobases, independientemente de la orientación y localización de los extremos 5' o 3' del gen. Estas regulan la actividad del promotor. La misma secuencia motif puede actuar en diferentes genes y en diferentes tipos de células. Los elementos reguladores que controlan la expresión de genes de clase II están bien caracterizados, estos han mapeado en el segmento corriente arriba del sitio de inicio de transcripción y en el primer intrón del gen DRA (85). La región reguladora puede dividirse en 2 partes, la

proximal y la distal (relativa al sitio de inicio de transcripción). La región proximal es necesaria pero no suficiente para la expresión constitutiva de los genes de clase II en los linfocitos B y en el aumento en la expresión basal por la acción de IFN-gamma (86). La región proximal (que se refiere a la región promotora) contiene además de las cajas TATA y CCAAT una serie de secuencias motif designadas por varias letras del alfabeto (O, Y, X, X2, P, Z y V). La caja TATA está presente en todos los genes de clase II pero no tiene mucha relevancia en la expresión de estos genes. Por otro lado la caja CCAAT está presente en algunos genes de clase II. Cerca de la caja TATA río arriba se encuentra la secuencia octámero (O), la cual consiste de ocho nucleótidos, esta secuencia se ha encontrado en otros genes incluyendo los de las inmunoglobulinas. La caja Y tiene la secuencia 5'-CTGATTGGCC-3'. La caja X consiste en dos motifs parcialmente sobrepuestos, X y X2 los cuales se unen a distintos factores de transcripción, aunque X2 se encuentra en unos cuantos genes de clase II. La caja Z cambia en su secuencia y designación en distintos genes. Esta contiene al menos 2 secuencias motifs, el primero de ellos denominado Z o SRV2 (GGACCC) y Z2 o SRV1 (GGACAC). Los elementos distales no están completamente bien caracterizados. Estos son los responsables de la expresión constitutiva de los genes clase II en los linfocitos pero su función parece estar regulada por los elementos proximales (86,87).

Polimorfismo Genético.

El polimorfismo del MHC tiene dos aspectos notables: el primero que es extenso y en segundo lugar es un polimorfismo natural. Una situación que se repite en algunos genes polimórficos es que alguno de ellos son extremadamente frecuentes y otros alelos tienen frecuencias muy bajas (88). Sin embargo, el polimorfismo de los loci del MHC se

caracteriza por la enorme cantidad de alelos de cada locus y muchos de estos alelos se encuentran con frecuencias similares en los diferentes grupos étnicos. Hasta el último reporte de nomenclatura de genes de HLA se conocen 209 alelos de HLA-A, 414 alelos de HLA-B, 101 alelos del locus HLA-C, 273 alelos de HLA-DRB1, 45 alelos de HLA-DQB1 y 93 de HLA-DPB1, entre otros (89).

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

Además dentro de estos exones la variabilidad se concentra en ciertos sitios, mientras que el resto de la secuencia permanece constante. Aunque se piensa que la variabilidad tiene un significado funcional es importante evaluar cuanto de la variabilidad de los nucleótidos se traduce en diferencias en la proteína (90).

Todos los alelos HLA presentes en la población humana provienen de un solo gen a partir del cual en la progenie gradualmente se acumularon substituciones y estas divergieron en linajes a través de las líneas de descendencia. La evolución de los linajes alélicos trascendió a la evolución de las especies. Este modo de evolución trans-específico es el responsable del característico polimorfismo de los genes dentro del MHC. El polimorfismo en los diferentes loci del MHC aparentemente se generó en momentos diferentes: Los linajes en el locus HLA-DRB1 se generaron hace 2030 millones de años aproximadamente; los del HLA-A hace unos 510 millones de años y el HLA-C después de la aparición del *Homo sapiens* (menos de 1 millón de años) (91). El destino final de una nueva mutación en un gen determinado, puede ser su extinción o su fijación. Una mutación neutral no persiste como un polimorfismo más allá de 4 generaciones. Los alelos del MHC han persistido mucho más que 4 generaciones obviamente estas no son

mutaciones neutrales. Hay evidencias de que la evolución de los alelos MHC hay una importante influencia de la selección natural (92)

Los cambios sinónimos no alteran la secuencia de aminoácidos de una proteína y por lo tanto no son afectados por la selección, Sin embargo los cambios no sinónimos son deletéreos porque al afectar la secuencia de aminoácidos usualmente reduce u oblitera totalmente la funcionalidad de la proteína, por ende, estos genes son eliminados por selección negativa o selección purificadora y en un gen en el que esos dos tipos de cambios ocurren la proporción de sustituciones sinónimas es mayor que la proporción de sustituciones no sinónimas ($dS > dN$). Muchos genes que se han analizado muestran este patrón de preponderancia de sustituciones sinónimas sobre las no-sinónimas. Sin embargo en ciertas partes de los genes del MHC se observa lo contrario: en la región que codifica para la región captadora del péptido las sustituciones no sinónimas son más frecuentes ($dN > dS$). Esta acumulación preferencial de sustituciones no-sinónimas puede ser resultado de selección positiva la cual favorece la diversificación de la región captadora del péptido (93).

IV. RELACIÓN MHC Y EAJ.

La asociación de Espondilitis Anquilosante (EA) y el antígeno HLA-B27 se reporta desde hace 30 años (94,95), alrededor del 90% de los espondilíticos son B27 positivos constituyendo la asociación más fuerte entre una enfermedad y un producto de la región del MHC. La prevalencia de las Espondiloartropatías (Ea) en las diferentes poblaciones se correlaciona directamente con la prevalencia del gen HLA-B27 en cada grupo étnico tanto en la población en general como en las familias multicasos (96). Dentro de los subtipos de Ea la prevalencia del HLA-B27 difiere, siendo en mayor porcentaje en la EA y su presencia se correlaciona con mayor severidad de la enfermedad (97).

mutaciones neutrales. Hay evidencias de que la evolución de los alelos MHC hay una importante influencia de la selección natural (92)

Los cambios sinónimos no alteran la secuencia de aminoácidos de una proteína y por lo tanto no son afectados por la selección, Sin embargo los cambios no sinónimos son deletéreos porque al afectar la secuencia de aminoácidos usualmente reduce u oblitera totalmente la funcionalidad de la proteína, por ende, estos genes son eliminados por selección negativa o selección purificadora y en un gen en el que esos dos tipos de cambios ocurren la proporción de sustituciones sinónimas es mayor que la proporción de sustituciones no sinónimas ($dS > dN$). Muchos genes que se han analizado muestran este patrón de preponderancia de sustituciones sinónimas sobre las no-sinónimas. Sin embargo en ciertas partes de los genes del MHC se observa lo contrario: en la región que codifica para la región captadora del péptido las sustituciones no sinónimas son más frecuentes ($dN > dS$). Esta acumulación preferencial de sustituciones no-sinónimas puede ser resultado de selección positiva la cual favorece la diversificación de la región captadora del péptido (93).

IV. RELACIÓN MHC Y EAJ.

La asociación de Espondilitis Anquilosante (EA) y el antígeno HLA-B27 se reporta desde hace 30 años (94,95), alrededor del 90% de los espondilíticos son B27 positivos constituyendo la asociación más fuerte entre una enfermedad y un producto de la región del MHC. La prevalencia de las Espondiloartropatías (Ea) en las diferentes poblaciones se correlaciona directamente con la prevalencia del gen HLA-B27 en cada grupo étnico tanto en la población en general como en las familias multicasos (96). Dentro de los subtipos de Ea la prevalencia del HLA-B27 difiere, siendo en mayor porcentaje en la EA y su presencia se correlaciona con mayor severidad de la enfermedad (97).

Actualmente se conocen 27 subtipos de la molécula HLA-B27 (HLA-B*2701 al 27) y la prevalencia de cada subtipo difiere en cada población como resultado de las diferencias geográficas y genéticas entre los grupos étnicos, sin embargo el B*2705 es el subtipo predominantemente asociado con Ea (98).

El análisis de casos múltiples EA en familias demuestra concluyentemente la asociación de la región del MHC y la enfermedad con implicación directa en la susceptibilidad genética a la enfermedad. La concordancia para la EA en gemelos monocigotos HLA-B27 positivos es del 63 % y 23 % para gemelos dicigotos HLA-B27 positivos. Estos hallazgos demuestran la existencia de otros componentes que pueden ser genéticos dentro o fuera del MHC y/o factores ambientales que desencadenen y perpetúen una respuesta inmune alterada, sin embargo los mecanismos involucrados siguen aún ocultos (99).

Hasta hace poco las Ea eran consideradas raras dentro de las enfermedades reumáticas sin embargo las evidencias sugieren que no lo son (100). El diagnóstico en niños puede resultar difícil y enmascara el verdadero padecimiento, algunos casos con Artritis Reumatoide Juvenil (ARJ) o Artritis Juvenil Crónica (AJC) y HLA-B27 positivos, evolucionaron en algún tiempo a EA o Ea no-diferenciada, aumentando así el número de casos (31).

La frecuencia del antígeno HLA-B27 en la población mexicana en general es menor del 5% y en los pacientes adultos con Ea la frecuencia es del 50% (101).

Las Ea de inicio juvenil se presenta más tempranamente y con una incidencia mayor en la población mestiza mexicana que en otros grupos étnicos, lo que las hace más incapacitante y la posiciona como un buen modelo de estudio para susceptibilidad genética.

EL POLIMORFISMO DE HLA-B27.

El desarrollo de las técnicas de secuenciación y la utilización de métodos moleculares para tipificar antígenos HLA, ha incrementado el número de subtipos conocidos.

En 1994 se reconocían siete subtipos para el alelo HLA-B27 y para el 2005 aumento a 27, cada subtipo difiere en su distribución étnica como parte de las diferencias genéticas de las poblaciones (102,103).

El B*2705 parece ser el alelo ancestral con una distribución en todas las poblaciones del mundo que además se subdivide en B*27052 y B*27053 esto es ocasionado por una sustitución silenciosa de un nucleótido (104).

El subtipo B*2701 es un subtipo muy raro, observado sólo en algunas familias caucásicas, el subtipo B*2702 es un alelo que se encuentra predominantemente en la población judía y en población caucásica del norte de África (105). El B*2703 tiene una mayor frecuencia en el continente africano, B*2704 esta virtualmente restringido para orientales y pobladores de la Polinesia, este subtipo tiene una correlación muy fuerte con el B*2706, identificándose sólo en pobladores del suroeste de Asia, así como B*2707 también se restringe a población asiática [India, China y Tailandia] (106,107,108). El subtipo B*2708 es extremadamente raro, sólo se había identificado en dos individuos ingleses sanos y más tarde en una familia con individuos afectados con EA procedente de la isla de Azores (109,110). El año pasado se detectan 4 individuos más, dos son mujeres, una con diagnóstico de EA y la otra con una artropatía no bien definida, siendo madre de una mujer la cual se diagnóstico con EA y un genotipo B*2708/B*2705; los dos restantes son varones no afectados todos ellos son ingleses (111). En pobladores de Sardinia e Italia continental se ha detectado el B*2709 en población normal y en dos pacientes con Ea (112,113).

La distribución alélica de B*2701, 2710 ,2711 ,2712 y 2713 es desconocida, han sido detectados en algunos miembros de una misma familia sin que se describa su asociación

con EA en otras poblaciones (110). B*2714 se detecta en población india de Norteamérica sana y en dos pacientes con EA procedentes de Siberia (114, 115), B*2715 sólo se ha reportado en dos pacientes con EA, procedentes de Tailandia (115). Los alelos restantes también se han reportado en forma esporádica como es el caso del HLA-B*2719, descrito sólo en un paciente libanés con EA (116), el B*2722 en células de un individuo filipino (117) quedando pendiente la confirmación de estos en otras poblaciones tanto de individuos normales y pacientes.

La estructura molecular del HLA-B*2705 y su distribución mundial hace suponer que es la molécula ancestral que dio origen a los diversos alelos debido a diferentes procesos genéticos como: conversión génica, mutaciones etc.

Una clasificación propuesta para los subtipos de HLA-B27 en base a su estructura, es la que se aplica tomando en cuenta el número de cambios en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (codificados por el exón 2 y exón 3 del gene y que conforman el zurco de unión al antígeno), tomando en cuenta el único polimorfismo reportado para el dominio $\alpha 3$ en la posición 211, es la siguiente:

GRUPO I

Incluye aquellos subtipos que difieren del B*2705, por un solo cambio en un aminoácido debido a una mutación puntual o por conversión génica.

I A – En la secuencia líder: B*2713

I B – En el dominio $\alpha 1$: B*2703, B*2717

I C – En el dominio $\alpha 2$: B*2709, B*2710

GRUPO 2

Consiste en los subtipos que difieren de B*2705, por múltiples cambios en un mismo dominio, debido a un evento de conversión génica.

2A - En el dominio $\alpha 1$: B*2701, B*2702, B*2708, B*2712, B*2716, B*2723.

2B - En el dominio $\alpha 2$: B*2707, B*2714, B*2719.

GRUPO 3

Consiste en los subtipos que difieren de B*2705, que introducen uno o más aminoácidos en un dominio:

3A – Incluye los subtipos relacionados con B*2710: B*2704, B*2718

3B – Incluye los subtipos relacionados con B*2707: B*2711

3C – Incluye los subtipos relacionados con B*2704: B*2706, B*2715, B*2720, B*2721, B*2724, B*2725 (98,102).

Estos polimorfismos posicionales en el surco de unión al antígeno de la molécula HLA-B27 puede orientarnos sobre el papel que desempeñan en la predisposición genética a las Ea (105,118).

Un esquema de la relación evolutiva propuesta para HLA-B27 y sus subtipos se presenta en la **Figura (3)**.

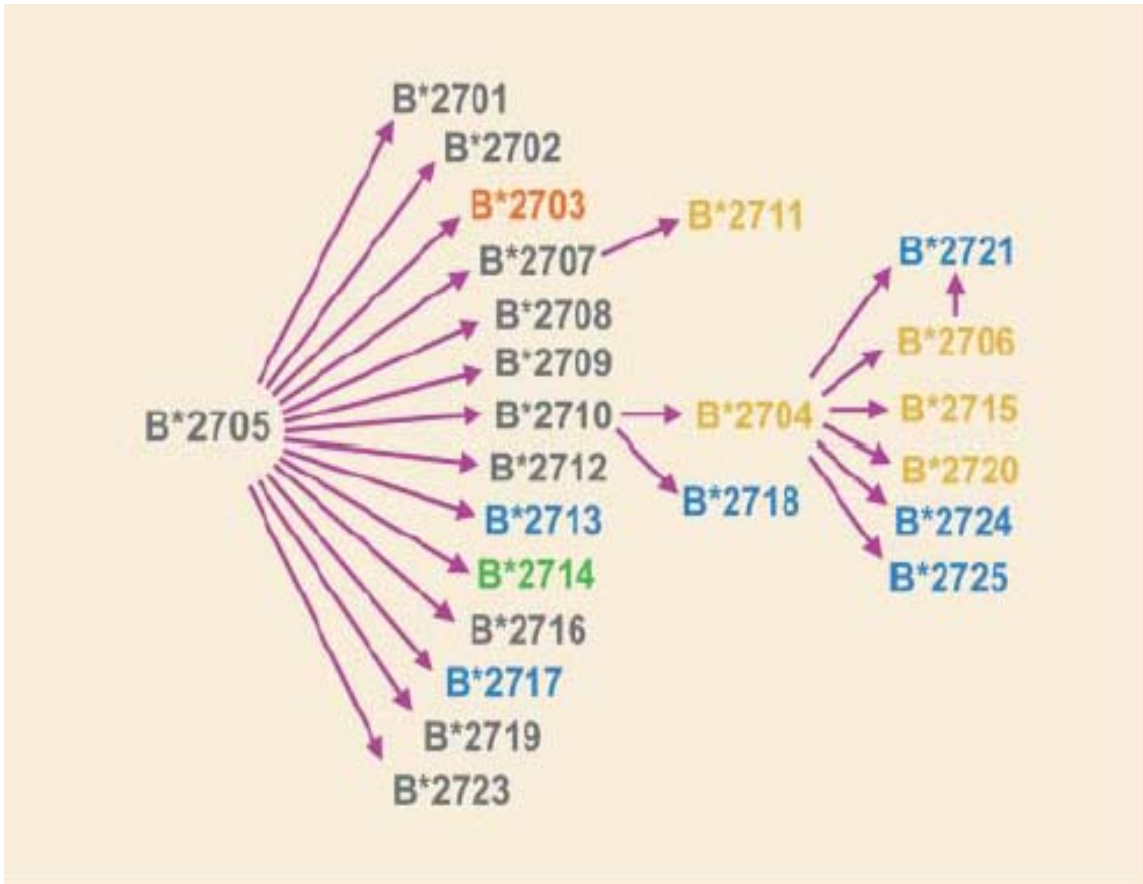


Figura 3. Relación Evolutiva de la molécula HLA-B27.

Los subtipos en color azul son predominantemente caucásicos, amarillo para orientales e Islas del Pacífico, rojo para negros, amerindios en verde y en turquesa son desconocidos, el B*2705 se encuentra en múltiples grupos étnicos y B*2707 sólo en orientales (97,102).

Residue Position	59	69	70	71	74	77	80	81	82	83	97	113	114	116	131	152
Pockets	A		B		C	C/F	C/F	F			E/C/F	D	D/E	E/F		E
B*2705	Tyr	Ala	Lys	Ala	Asp	Asp	Thr	Leu	Leu	Arg	Asn	Tyr	His	Asp	Ser	Val
B*2701	–	–	–	–	Tyr	Asn	–	Ala	–	–	–	–	–	–	–	–
B*2702	–	–	–	–	–	Asn	Ile	Ala	–	–	–	–	–	–	–	–
B*2703	His	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
B*2704	–	–	–	–	–	Ser	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Glu
B*2706	–	–	–	–	–	Ser	–	–	–	–	–	–	Asp	Tyr	–	Glu
B*2707	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Ser	His	Asn	Tyr	Arg	–
B*2708	–	–	–	–	–	Ser	Asn	–	Arg	Gly	–	–	–	–	–	–
B*2709	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	His	–	–
B*2710	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	Glu
B*2711	–	–	–	–	–	Ser	–	–	–	–	Ser	His	Asn	Tyr	Arg	–
B*2712	–	Thr	Asn	Thr	–	Ser	Asn	–	Arg	Gly	–	–	–	–	–	–

Tabla A. Secuencia de aminoácidos del subtipo B*2705 y los subtipos más importantes relacionados con la Ea. Desde el residuo 59 al 83 que conforma el dominio alpha-1 y del 97 al 152 el dominio alpha-2, las sustituciones en las diferentes posiciones se denotan con las tres letras que identifican al aminoácido; el guión indica identidad con B*2705, Las letras entre la A – F indican el pocket al que afecta la sustitución.

EL POLIMORFISMO DE HLA-B 27 Y SU ASOCIACIÓN CON LAS ESPONDILOARTROPATIAS.

Los polimorfismos que presenta la molécula HLA-B27 influyen en la especificidad de unión de esta molécula a un péptido determinado, motivo por el cual los diversos alelos HLA-B 27 tienen marcadas diferencias en su asociación con las Ea.

Los subtipos del B*2701 al B*2715 y B*2719 se han reportado asociados con EA o alguna otra Espondiloartropatía en cuando menos un individuo (109-118). En los subtipos B*2705, B*2704, B*2702 y B*2707, su asociación se ha demostrado por estudios epidemiológicos bien estructurados y la fuerza de la asociación es muy fuerte (119-123). En las cuales, el B*2705 tiene mayor prevalencia en todas las poblaciones excepto en individuos del oeste de África [Senegal y Gambia] (124). Demostrándose también que algunos subtipos tienen una predisposición a la enfermedad muy baja como es el caso de B*2706 y B*2709 (107,125,126).

En una familia se pudo documentar individuos homocigotos HLA-B 27, en donde aquellos que tenían B*2706 en sus dos cromosomas (homocigotos-alélicos) no desarrollaban EA pero si en un cromosoma portaba B*2706 y en el otro B*2705 (heterocigotos-alélicos) estos si desarrollaban la enfermedad (118,127). El descubrimiento de que algunos subtipos B 27 no están asociados con EA, resulta útil para tratar de entender la patogénesis de la enfermedad (128).

BASES BIOLÓGICAS DE LA SUSCEPTIBILIDAD GÉNÉTICA A LAS ESPONDILOARTROPATIAS.

A pesar de que han transcurrido más de 30 años de los primeros reportes de asociación entre el antígeno HLA- B 27 y la Espondilitis Anquilosante, los mecanismos generados en la patogénesis permanecen desconocidos y quedando las interrogantes de si el B 27 es el culpable directo o no y si existen gen o genes implicados en el desarrollo de la susceptibilidad genética y más aún si influyen en la severidad.

A lo largo de estos años existen diferentes propuestas para explicar los mecanismos probables que se llevan a efecto en la patogénesis y a continuación serán citadas.

Péptido Artritogénico.

El modelo del péptido artritogénico es una de las primeras propuestas y esta basada en la función natural de las moléculas HLA clase I como presentadoras de péptidos endógenos a las células T, mediante la interacción del receptor de linfocitos T (TCR), generando una respuesta inmune vía linfocitos T CD8⁺ (35,129,130).

Son considerables los esfuerzos realizados para determinar la procedencia del péptido artritogénico que se une a la molécula HLA-B27 proponiéndose: que el péptido puede provenir de los microorganismos que se han encontrado, especialmente en la articulación de pacientes con Artritis Reactiva y que pueden tener reacción cruzada con péptidos propios o con el mismo B27 (131,132).

La persistencia de antígenos bacterianos en la articulación en pacientes con ARe, esta bien documentada (133-135). Antígenos bacterianos y anticuerpos específicos contra *Salmonella* (136), *Shigella* (137), *Yersinia* (138), *Clamidia* (139, 140) están reportados.

En el caso EA se implica a *Klebsiella*, los estudios anteriores fueron realizados con pacientes adultos (141,142) y representan las primeras evidencias para las hipótesis de péptido artritogénico y Mimetismo Molecular (ver más adelante). Existen escasos estudios donde se examine la interacción de alguna bacteria, antígeno o anticuerpo y la molécula HLA B27 en niños con Espondiloartropatías, solamente en los casos de Artritis Reactiva donde se implica a microorganismos como *Shigella flexneri*, *Chlamydia pneumoniae* y *Clamidia trachomatis* (143,144).

Otras investigaciones proponen que el péptido artritogénico puede ser un péptido propio (145), que proceda de la degradación del mismo HLA-B27 y presentado por moléculas clase II (146) o por el propio HLA-B27 (147,148).

Mimetismo Molecular.

Este término se introduce en 1964, para describir la semejanza que tienen algunos epítomos de microorganismos y epítomos del tejido huésped, desencadenando así una reacción inmune contra determinantes propios del individuo generando una enfermedad del tipo autoinmune (149,150).

Retomando este modelo para explicar la patogénesis de las Ea, se sugiere que antígenos externos procedentes de microorganismos tienen similitud a péptidos propios y son presentados por las moléculas HLA-B27 y así eventualmente rompen la tolerancia e inducen autoinmunidad y de esta manera causan inflamación crónica (151).

La detección de linfocitos T CD8+ en la articulación de pacientes con ARe (152,153) , soporta la base de estas hipótesis aún cuando resulta realmente difícil poder inculpar a los linfocitos T citotóxicos encontrados en las articulaciones afectadas de pacientes con ARe como causantes de la destrucción local.

En los últimos años los experimentos realizados por la Dra. Fiorillo, demuestran que existen diferencias funcionales determinadas por el polimorfismo subtipo-específico de la molécula B27 y que estos son relevantes en la patología de las Espondiloartropatías. En ellos demuestra que en el curso de una respuesta inmune a un epítipo viral (Proteína de Membrana -2 (LMP-2) del virus de Epstein-Barr), los linfocitos T citotóxicos generados distinguen los complejos HLA-B*2705/LMP-2 y HLA-B*2709/LMP-2. De esta manera es concebible la idea del péptido artritogénico que produce una respuesta diversa y con efectos diferentes donde el complejo: B*2705/péptido pero no el B*2709/péptido pueden ser reconocidos por células TCD8+ , en donde el péptido puede tener una reacción cruzada contra algún microorganismo (154 -156). Otros hallazgos demuestran que la molécula HLA-B27 tiene como ligando natural pero sólo los subtipos B*2702, 04 y 05 (asociados con las Ea) a un péptido propio que procede de la región citoplasmática y que tiene homología con una región de la DNA primasa de *Chlamydia trachomatis* (157-159).

Estos datos nos orientan a determinar el porque algunos alelos B27 están asociados con enfermedad y otros no lo están, además de apoyar los modelos de péptido artritogénico /Mimetismo Molecular para explicar la patogenia de las Ea.

Un estudio realizado en gemelos monocigotos (160), en donde algunos pares de gemelos eran concordantes en padecer EA y en otros la enfermedad era discordante, buscando así

homogeneidad genética y con la inclusión de donadores sanos HLA-B27 positivos. En todos estos se investigo una probable asociación entre la restricción en la variabilidad del receptor de células T (TCRB) y la enfermedad (El análisis de la activación clonal y expansión de células T causada por un antígeno pueden ayudarnos en la identificación y caracterización de los epítopes cruciales en enfermedades inflamatorias como es el caso de EA). En este trabajo se reconoce, que sólo en los pacientes con EA existe un aumento de oligoclonicidad, que sería una evidencia para reconocer que los pacientes con EA están exponiéndose continuamente a estimulación antigénica, que puede ser causada por antígenos procedentes de agentes infecciosos o péptidos propios que inducen activación de células T causando autoinmunidad (160), esta limitada restricción ya se había documentado en pacientes con Ea no relacionados (161,162). La importancia de caracterizar péptido artritogénicos y una respuesta HLA-B27 restringida en las articulaciones nos llevaran a entender la relación entre B27 y la enfermedad y la generación de una inmunoterapia específica (163).

Muchas de las investigaciones están centradas en la identificación de células TCD8+ en pacientes con Ea . Interesantemente en ratones transgénicos para B 27+ y deficiencia para beta-2 microglobulina y muy bajos niveles de T CD8+, logran desarrollar la enfermedad y más aún en aquellas cepas de ratones que tienen deficiencia del gene TAP-1, que es el Transportador de péptidos para moléculas clase I, también se desarrolla la enfermedad (164).

En forma general las moléculas HLA Clase I y II son reconocida por linfocitos T CD8+ y CD4+ respectivamente esto es el resultado de una selección positiva en el timo, sin embargo esta selección no parece totalmente absoluta y se han reportado células T CD8+

reactivas para clase II y células T CD4+ restringidas para clase I, el significado biológico de romper las reglas del reconocimiento son desconocidas.

Recientemente se reconoce la existencia de células T CD4+ restringidas B 27 en las articulaciones de pacientes con EA, sugiriéndose que estas tienen una participación en la patogénesis de las espondiloartropatías particularmente si el factor infeccioso influye en la expresión de formas poco usuales del HLA-B27 (165-168).

Alteraciones en la molécula HLA-B 27.

La molécula HLA B27 tiene en la posición 67 una cisteína (cys) libre, que forma parte del pocket B dentro del surco de unión al antígeno que le da ciertas propiedades al B27, una de ellas es gran estabilidad, en algunos experimentos en donde sustituyen en esta posición 67, Cys por una Ser (Serina), logrando desestabiliza la molécula (169,170). Por otro lado esta misma posición es altamente reactiva (171,172) , por lo cual se le involucra en la patogénesis de las Ea por dos diferentes mecanismos:

El primero de ellos nos dice que la posición 67 Cys es un blanco potencial para las bacterias procedentes de una infección, para la elaboración de homocisteína, modificando así la molécula B 27 y dirigiendo el reconocimiento de esta molécula por células T citotóxicas (LTC) , las cuales ya se han caracterizado (173,174).

Segundo mecanismo. En donde la Cys 67 participa en la formación de homodímeros de cadena pesada *in vitro*, libres de beta-2-microglobulina (175). Estos homodímeros (HC) unidos por un puente disulfuro en especial el de B*2705 son muy estable y se une a epitopes virales (176), estas moléculas libres de beta-2-microglobulina se encuentran en células deficientes de Transportares de péptidos (TAP) (177). La expresión de estos

homodímeros pueden ser reconocidos por dos familias de receptores: KIR (killer Ig receptor) y ITL (Ig-like transcripts) proponiéndose que estén involucradas en la patogénesis de la enfermedad (178-180).

Esta propuesta es una hipótesis alternativa a las ya descritas pero no puede explicar la baja asociación de los alelos B*2706 y B*2709 ya que ambas moléculas contienen Cys 67. Además la molécula HLA-B 27 tiene una elevada tendencia, más que otras moléculas del locus HLA-B (Ej: B 51, B52, B 78) de desplegarse después de su síntesis, dirigiendo un incremento de su degradación en el citosol, esta propiedad esta relacionada al pocket B (181,182). La ineficiencia de esta degradación favorece la formación de homodímeros, y los componentes de esta degradación están en cantidades elevadas y presentadas por HLA-B 27 y otras moléculas clase I el significado patológico es aún desconocido.

Estos dos procesos dimerización y desplegamiento (misfolding) son procesos fundamentalmente diferentes pero ciertos rasgos estructurales de la cadena pesada son iguales y potencialmente pueden estar ligadas a provocar todo el proceso inflamatorio llevando al desarrollo de la enfermedad, quedando pendiente su reconocimiento (183).

Otros genes dentro del MHC asociados con las Espondiloartropatías.

Existen evidencias suficientes para pensar que el HLA-B27 no actúa solo en conferir susceptibilidad a las EA y que otros genes dentro del MHC puedan también estar involucrados, sin embargo resulta muy complicado identificar estos genes por los complejos y múltiples desequilibrios génicos dentro del MHC (184).

El HLA-B 60 fue el primero en reportarse en pacientes adultos con EA y B 27+, este parecía incrementar la susceptibilidad a la enfermedad (185), desde entonces otros

reportes han confirmado este hallazgo (186,187). Sin embargo una implicación directa es incierta.

El HLA-B39 y el B 27, comparten varias similitudes sobre todo en el surco de unión al antígeno (incluyendo Glu45 y Cys 67) y la capacidad de unión con péptidos Arg 2 o His 2 (188,189). Un incremento de B 39 en pacientes japoneses con EA adultos y B 27 negativos (190), lo cual sugiere el involucramiento de esta molécula en la susceptibilidad al desarrollo de la EA, así mismo se le asocia con la Artritis Psoriásica en especial con el desarrollo axial del padecimiento (191) y una progresión rápida de la enfermedad en otro reporte (192). Estos resultados no han podido replicarse en otras poblaciones.

Algunas asociaciones se reportan para moléculas clase II, en especial el haplotipo: B27- DR 1 en población adulta inglesa tanto en familias como en estudios de casos y controles (193,194) y DRB1*08 y DPB1*0301 se ha encontrado en Pacientes con Espondilitis Anquilosante de inicio Juvenil además de homocigocidad para genes para LPM 2 (195). La asociación de HLA-DRB1*0103 es particularmente interesante, incrementa la severidad de IBD en pacientes que además padecen EA (196,197).

Asociación de DR 4 también se ha reportado en familias multi - casos, pero en este hallazgo se combinan ligamiento y asociación y no sería posible conferir al DR4 por si sólo una asociación con la enfermedad (198-201). Asociación entre EA y artritis periférica esta reportada (202) y DRB1*0408-DQB1*0301 en finlandeses con ARe (203), sin embargo estos hallazgos no han sido reproducidos en otras poblaciones (204).

Existen reportes de asociación del promotor del Factor de Necrosis Tumoral (TNF-308) y EA, pero podría tratarse de un haplotipo asociado a la enfermedad y no como un locus de susceptibilidad, por lo cual es necesario el análisis en más poblaciones (205,206).

Otros genes que han sido investigados dentro de la región MHC son los MICA, TAP, LMP 2, LMP 7 y HSP 70 y complotipos, algunos de ellos resultan conflictivos o con una asociación muy pobre, por lo cual se requiere determinar si estas asociaciones son verdaderas (207-211).

En la población mestiza mexicana se tienen realizados algunos trabajos con pacientes con Espondiloartropatías. De donde se conoce que el subtipo más frecuente es B*2705 tanto en población adulta como juvenil (119), también se asociado con DRB1*08 (212), B 15 y DRB1*01 (95), B49 y el complotipo FC31 (213). Para el polimorfismo de genes LMP2 se incrementado el haplotipo AA en aquellos pacientes con EA, B 27+ y desarrollando uveítis (214) y el haplotipo BB en pacientes con EA HLA B27-negativos y enfermedad extra-espinal (215, 216). Un estudio posterior en pacientes con Ea (EA, Ea no-diferenciada, ARE) confirma el involucramiento de estos genes LMP 2 pero no para LMP 7 (217). Para los genes de las proteínas de choque térmico (HSP 70) se encontró asociación de HSP-2 y HSP-hom con Ea en forma independiente de la susceptibilidad que pueda conferir el B 27 (218). La mayoría de estos estudios son en pacientes de inicio de la enfermedad en la etapa adulta.

Genes no-MHC asociados con Ea. / ESTUDIOS DE LIGAMIENTO PARA SITUAR OTROS GENES DE SUSCEPTIBILIDAD DENTRO DEL GENOMA

Son limitados los estudios que se han realizado para encontrar genes fuera del MHC asociados a la susceptibilidad de padecer alguna de las Ea. En uno de estos se estudian 185 familias con miembros diagnosticados con EA y utilizando de 367 a 505 marcadores autosómicos se identifican a los siguientes cromosomas involucrados con susceptibilidad

a desarrollar EA: 1p, 2q, 9q, 10q, 16q y 19q ; en donde el cromosoma 16q tiene el índice de ligamiento más alto [LOD=4.7] (219-221). En otros estudios esta misma región cromosómica (16q) se ha relacionado con susceptibilidad para desarrollar otras espondiloartropatías (222) y en otro trabajo se le involucran con las forma más severas de EA (223).

Recientemente se reporta el estudio de 120 familias caucásicas, con casos múltiples de individuos afectados con alguna Ea, el análisis de ligamiento evidencio un locus de susceptibilidad con un LOD=5.15 en la región cromosómica 9q31-34 muy cercano al marcador D9S1776 (224).

Es importante enfatizar que los investigadores Laval y Miceli-Richard, dos de los líderes más fuertes en el escaneo genómico para las EA (221,224) concluyen que sus estudios demuestran el fuerte ligamiento entre el HLA-B 27 y las Ea y que otros genes dentro del MHC deben estar involucrados con la susceptibilidad a Ea, ya que el ligamiento más fuerte corresponde a la región del MHC (LOD=15.6).

Recientemente se reportan algunos trabajos en donde se rastrea en el genoma genes que estén involucrados con severidad en la EA. La severidad de la enfermedad fue evaluada con BASDAI (Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index) que nos da la actividad de la enfermedad y BASFI (Bath Ankylosing Spondylitis Funcional Index) en donde se evalúa el daño funcional ; para BASDAI se encontraron ligamiento para los cromosomas. 11q, 16 q, 18p, 20q en donde el mayor ligamiento se encontró en 18p (LOD=4.0) y para BASFI los cromosomas son 3p, 11p, 11q, 16p, 18p el mayor ligamiento fue para 2q (LOD=2.9), para la edad de inicio de la enfermedad se reporta el

cromosoma 11p (LOD=3), concluyéndose que la severidad esta determinada por genes fuera del MHC en donde el medio ambiente tiene también su interacción (225-227).

Para tratar de explicar la preferencia de la enfermedad en varones y determinar la contribución del cromosoma X en la susceptibilidad a EA se efectuó un análisis de ligamiento para este cromosoma en 234 pares (paciente con EA y un hermano) en donde se demostró que no existe ligamiento y la exclusión de presencia de genes en este cromosoma que contribuyan en la susceptibilidad (228).

V. OBJETIVOS

Planteamiento del problema y justificación.

Las espondiloartropatías juveniles (EaJ), son un grupo de entidades nosológicas y síndromes de inicio antes de los 16 años que comparten características clínicas, patológicas y genéticas comunes que las distinguen del resto de las enfermedades reumáticas pediátricas. Se caracterizan por inflamación crónica de la sinovia y entesis de las articulaciones; principalmente en extremidades inferiores de niños y adolescentes, desencadenada primordialmente por infecciones recurrentes de vías urinarias y gástricas.

La afectación en columna vertebral y articulaciones sacroiliacas (SI) y/o complicaciones extrarticular se desarrolla tiempo después del inicio de los primeros síntomas.

En caucásicos sajones se ha observado que del 3 al 21% de los pacientes con EA tienen las primeras manifestaciones antes de los 16 años de edad (9,10). En la población mestiza mexicana la proporción de pacientes con inicio en la infancia o juvenil es mayor (11). La EA juvenil y la del adulto difieren en su forma de inicio y en ambas es más frecuente en varones. En niños y adolescentes clínicamente existe afección periférica de articulaciones y entesis, con baja frecuencia de participación axial (12-17). En muchos de estos pacientes se establecen los diagnósticos de Artritis Reumatoide Juvenil (ARJ) dado que la afección en columna vertebral y articulaciones sacroiliacas (SI) se presenta años después del inicio de la sintomatología.

En base a los registros de Amerindios de Alaska y Canadá, se conoce que la incidencia es de 1.44 y 2.1/ 100 000 respectivamente y 2.0 / 100 000 en los Estados Unidos (24-26) en mestizos mexicanos su incidencia es mayor. En las pasadas décadas un incremento en la incidencia de EaJ es notorio en las Clínicas de Reumatología

Pediátrica, del 0-16% en los 70s, 31% en los 80s (27). Actualmente los registros marcan que el ratio de incidencia entre ARJ/EaJ es entre 1.4/1 y 2.6/1 (28-30). Algunos de los casos en donde se tiene un niño diagnosticado como ARJ o AJC este podría evolucionar en un tiempo a una EaJ indiferenciada y más tarde a EAJ (5 a 10 años) con lo cual la incidencia de esta patología se elevaría .

Debido a estas consideraciones de mayor incidencia, más severidad y una edad de inicio anticipada de las EaJ en la población mestiza mexicana, es relevante evaluar además del HLA B27 otras moléculas del MHC que pudieran asociarse al inicio temprano de la enfermedad.

Problema.

En las formas juveniles de las Ea ¿Existe la asociación de otras moléculas del HLA diferentes al B27 que intervengan en la edad de inicio del padecimiento?

Hipótesis.

Las Espondiloartropatías de inicio en la etapa adulta y las de inicio juvenil difiere en varios aspectos como: el clínico y severidad, en las primeras existe asociación con el alelo HLA-B27, en las juveniles se presentara esta asociación o existirá la influencia de otros genes dentro del HLA que participen en la susceptibilidad para desarrollarlas en esta etapa de la vida.

Objetivo General.

Determinar la asociación de moléculas HLA clase I y II, en pacientes diagnosticados con EaJ.

Objetivos específicos.

1. Determinar si existe asociación con la susceptibilidad a desarrollar Espondiloartropatías de inicio juvenil y el alelo HLA-B 27.
2. Determinar si existen otras moléculas del HLA clase I y II asociadas con el inicio juvenil de las Ea.
3. Determinar si existen diferencias Inmunogenéticas entre las espondiloartropatías de inicio juvenil (EAJ y Ea no diferenciadas).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

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

Población de estudio:

Controles. Se estudiaron 99 individuos mestizos mexicanos. Todos los individuos se analizaron desde el punto de vista clínico. Mediante historia clínica se obtuvieron datos para establecer la no existencia de historia familiar de enfermedades autoinmunes y el estado de salud al momento de la entrevista. Desde el punto de vista etnológico se consideraron mestizos mexicanos aquellos con dos o más generaciones nacidas en México. Este grupo control se comparó genéticamente con los individuos representativos de México estudiados anteriormente, en los cuales se ha obtenido un patrón de mestizaje de 56 % de genes Indígenas, 40 % de genes Caucásicos y 4 % de genes Negroides (229-231).

Controles (criterios de inclusión).

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

Controles (criterios de exclusión).

1. Datos sugerentes de enfermedad autoinmune o infecciosa.
2. Antecedentes heredo-familiares de extranjeros en las dos previas generaciones.
3. No firmar carta de consentimiento.

Criterios de selección de la muestra.

Casos (criterios de inclusión).

1. Masculino o femenino.
2. Tener menos de 16 años al momento del diagnóstico de alguna Espondiloartropatía.
3. Diagnóstico de Ea, lo establecieron médicos especialistas en la Unidad de Reumatología del Hospital General de México.
4. Ser mestizo mexicano con dos o más generaciones nacidas en México.
5. Firma de consentimiento informado de los padres.

Casos (criterios de exclusión) .

1. Tener más de 16 años al momento del diagnóstico.
2. Diagnóstico dudoso de Espondiloartropatía .
3. Antecedentes heredo-familiares de extranjeros en las dos previas generaciones.

ANALISIS ESTADISTICO.

El conteo de individuos positivos para un alelo se realizo manualmente para obtener las frecuencias antigénicas [que es la proporción de sujetos del total que son portadores de un determinado antígeno] (232),

Las diferencias entre los grupos se analizaron por medio de tablas de contingencia de 2 x 2 y la prueba de Chi-cuadrada. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos valores de p menores a 0.05 con la corrección de Yates y la prueba exacta de Fisher en caso de que uno de los valores de alguna casilla de la tabla de contingencia de 2x2, fuera menor a 5. Estos cálculos se realizaron con el programa estadístico EPINFO v. 5.0. La p

se corrigió por el método de Bonferroni, multiplicando el valor de p por el número de comparaciones de cada locus. La fuerza de la asociación fue estimada mediante el cálculo de la razón de momios con un intervalo de confianza de 95 %.

El cálculo de frecuencias génicas se realizó además mediante el programa estadístico ARLEQUÍN v 1.1. [<http://anthro.unige.ch/arlequin> software] (233).

Consideraciones éticas.

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

Procedimiento.

Para conocer la asociación de los genes de clase I y II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) con la susceptibilidad a las Espondiloartropías (Ea) y los patrones de desequilibrio génico en los pacientes, se realizó un estudio transversal de casos y controles.

Todos los individuos incluidos en el estudio firmaron una carta de consentimiento donde se informó con detalle la finalidad del estudio, así como los riesgos de una veno-punción. Se tomaron de 3 a 5 ml de sangre periférica y se anti-coagularon con EDTA. Posteriormente se procedió a la extracción del DNA genómico por el método de salting-

out, obteniendo una cantidad considerable de DNA la cual se congeló a -70°C hasta su análisis.

RECEPCIÓN DE MUESTRAS:

CARACTERÍSTICAS:

- Sangre periférica de 3 a 5 ml en jeringa o vacutainer, usando como anticoagulante EDTA.
- Las muestras coaguladas, serán excluidas.
- Registro de muestras: Se llevará un registro de las muestras, donde se anotara: Nombre, Dirección, teléfono, edad, sexo, procedencia, diagnóstico, fecha.

AISLAMIENTO DE DNA.

El DNA genómico, se obtiene de leucocitos de sangre periférica utilizando un kit comercial (Roche Molecular Systems) basado en una extracción salina [salting-out] (234).

El aislamiento de DNA, se inicia con una separación de leucocitos para ello se realiza una lisis selectiva de eritrocitos y después un tratamiento con un detergente aniónico fuerte que lisa los leucocitos, las proteínas son removidas por deshidratación y precipitación. El DNA es recuperado por precipitación con etanol.

TABLA DE VOLÚMENES.

SANGRE	BLR* : SANGRE ml	BLW** : SANGRE ml	Reactivo Precipitante	Volumen Resuspender
1 - < 2	3:1	1.0	0.520	200 µl
2- < 3	3:1	1.0	0.520	200
3 - < 4	3:1	1.5	0.780	400
4 - 5	3:1	2.5	1.3	400

Buffer Lisis Rojos- BLR

Buffer Lisis White- BLW

- Adicionar para el volumen de sangre el volumen correspondiente del BLR, de acuerdo a la tabla mezclar cuidadosamente por inversión por espacio de 10 min.
- Centrifugar a 2000 rpm X 10 min (cuidado de no incrementar rpm).
- Decantar cuidadosamente, el botón debe quedar blanco. Si acaso no quedará repetir los dos pasos anteriores, pero incrementar la mezcla por inversión a 15 min.
- El botón blanco se resuspende por medio de vortex, este paso facilita la lisis de células blanco, la formación de aglomerados evitan lisis completa.
- Adicionar el volumen correspondiente de BLW, mezclar vigorosamente por medio de vortex 1 min. Existe un paso opcional de incubar a 37°C de 15-30 min., para potenciar la lisis de blancos. Si se están utilizando tubos de 25 ó 50 ml. Transferir a tubos eppendorf.

- Adicionar el volumen correspondiente de solución precipitante de proteínas, agitar cada muestra vigorosamente un mínimo de 25 seg. Esto es necesario para una remoción efectiva de las proteínas de la muestra, utilizando un vortex.
- Centrifugar a 10 000 rpm por 10 min. (Si se utilizan menos revoluciones las proteínas no precipitan) Y se tendrá proteínas acuosas las cuales serán muy difíciles de separar.
- El sobrenadante contiene el DNA, por lo cual se debe transferir a un tubo limpio,
- Adicionar dos volúmenes de etanol al 100% al volumen del sobrenadante debe estar frío.
- Mezclar por inversión las hebras de DNA empezarán a precipitar. centrifugar a 10 000 rpm por 5 min decantar.
- Adicionar al pellet 2 ml. De etanol al 70% frío, para lavar y muy suavemente mezclar, por inversión centrifugar a 10 000 rpm por 5 min.
- Secar el DNA, sin calentar.
- Resuspender el DNA en el volumen correspondiente en TE, incubar a 65°C de 30 a 60 min periódicamente agitar la muestra.
- Almacenar las muestras a 4°C.

CUANTIFICACIÓN DE DNA.

- Tomar una alícuota de 5 µl del DNA perfectamente disuelto, en un tubo limpio el cual contenga 495µl de agua homogenizar y leer la Densidad Óptica (DO) a 260

para medir concentración, el coeficiente de las lecturas 260/280 nos da la pureza de la muestra y no debe sobrepasar del 1.7-1.9, para ser aceptable.

DETERMINACIÓN DE ANTIGENOS HLA clase I y II PCR- SSP.

El método se basa en una reacción de PCR, el cuál provee de una resolución de baja a media para antígenos HLA, clase I A, B y C y/o clase II DR β y/o DQ β . Este método comercial de PEL-FREEZ SSP Uni-Trays, consiste de varias formulaciones de una mezcla de sondas (primers) que son usados para amplificar el DNA genómico, definiendo grupos específicos de alelos. Para ello se utiliza una placa térmica de 96 pozos, el DNA por analizar se mezcla con un buffer de reacción y enzima Taq-Pol y es adicionado a la placa que viene previamente cargada con los primer, inmediatamente se amplifica mediante el uso de un termociclador, los productos de la PCR son analizados mediante electroforesis de un gel de agarosa al 2% y teñida con Bromuro de Etidio, se observa el patrón de bandas del producto amplificado para cada uno de los pozos mediante un fotodocumentador para asignar los alelos correspondientes.

El método de SSP se basa en la amplificación con sondas de secuencia específicas (sequence specific primer), que previamente han sido publicados. El grupo del primer amplifica los alelos descritos por la WHO [Comité Internacional de Nomenclatura] (235-239).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO.

Requerimientos de la muestra.

- El DNA a determinar debe estar soluble en buffer TE o agua estéril, su concentración debe estar en el rango de 100-125 ng/ μ l, 100 μ l en total.
- Las muestras de sangre deben tomarse con el anticoagulante EDTA o ACD, las muestras heparinizadas no deben ser usadas ya que inhiben la amplificación del DNA.
- La calidad del DNA es crítico para el análisis y debe tener las siguientes características: La relación D.O. 260/280 debe estar en el rango 1.7 – 1.9.

PARÁMETROS DE AMPLIFICACIÓN.

Paso 1	No. de ciclos 1	96°C	X	1 min
Paso 2	No. de ciclos 5	96°C	X	25 seg
		70°C	X	50 seg.
		72°C	X	45 seg.
Paso 3	No. de ciclos 21	96°C	X	25 seg.
		65°C	X	50 seg.
		72°C	X	45 seg.
Paso 4	No. de ciclos 4	96°C	X	25 seg.
		55°C	X	60 seg.
		72°C	X	120 seg
Hold		4°C		Toda la noche

Vol. total = 23 μ l

PROCEDIMIENTO.

- La placa comercial de pel-freez se descongelada, la bolsa de papel aluminio que la cubre debe cortarse cuidadosamente para evitar derrames y se procede a identificarla según sea el caso, la remoción de la placa adhesiva es muy lentamente de derecha a izquierda, en el lugar en el que destinado para PCR.
- La enzima Taq DNA polimerasa debe también descongelarse y mantenerse en una charola con hielo en el área de PCR.
- El vial que contiene el buffer para PCR, también debe descongelarse y es uno para cada prueba y contiene 580 μ l en total.
- En el área de PCR se procede adicionarle al vial del buffer 268 μ l de agua Q.P. estéril y 9.3 μ l de Taq Polimerasa, mezclar en vortex suavemente. Tomar 8 μ l y sembrarlos en el pozo control.
- Adicionar 80 μ l del DNA problema con una concentración de 100-125 ng/ μ l y agitar muy suavemente.
- Sembrar 8 μ l de la mezcla anterior en cada pozo a excepción del pozo control.
- Tapar cuidadosamente y correr la PCR
- Poner la placa 5min en refrigeración para que la parafina solidifique
- Preparar un gel de agarosa al 2% (80 ml) en TBE 0.5X y Br-Et (2 μ l por cada 100 de agarosa).
- Cargar el noveno pozo con 4 μ l del marcador de peso molecular 20-200pb).
- Usando un pipeta de 8 canales transferir 8 μ l del buffer de carga a cada pozo.

- Transferir 14 μ l del producto de PCR- buffer de carga en el gel iniciado con A-1 hasta A-12.
- La electroforesis se corre a 70 volts por 22 min.

El gel de agarosa es analizado por medio de un fotodocumentador. Se asigna un determinado alelo si su patrón de bandas coincide con las dadas por el fabricante.

En el anexo II se muestra la foto de un gel de uno de los pacientes.

VII. RESULTADOS.

Se diagnosticaron 66 pacientes consecutivos pertenecientes a la consulta de Reumatología Pediátrica del **Hospital General de México SSa** con Espondiloartropatía Juvenil (EaJ) ,

De los cuales 52 pacientes, eran varones y 14 niñas (78% y 22% respectivamente), la edad promedio de inicio fue de 12.38 años (en un intervalo de 5 a 15 años). Al dividir el grupo de pacientes según su cuadro clínico; 45 de ellos llenaban los criterios de inclusión para Espondilitis Anquilosante (EA), de estos fueron 37 varones y 8 niñas con una edad promedio de 12.4 años. El resto de pacientes que suman 21 fueron diagnosticados con una Espondiloartropatía no diferenciada (Ea no-dif), 15 de estos fueron varones y 6 niñas.

En la Tabla 2, se muestran las frecuencias génicas de alelos del locus HLA- A en el grupo de pacientes con EaJ y el grupo control. Al compararse las frecuencias de ambos grupos encontramos algunas diferencias significativas en los alelos HLA-A1 (pacientes 1% vs controles 7.5%) y HLA- A 3 (pacientes 0.5% vs controles 6 %), con una $p < 0.05$.

Estas diferencias entre el grupo control y los pacientes, podrían ser debidas a una mayor prevalencia de genes de origen caucásico en el grupo control que en el grupo de pacientes.

En la Tabla 3, se muestran las frecuencias génicas de alelos del locus HLA-B en el grupo de pacientes con EaJ y el grupo control. Cuando comparamos las frecuencias de ambos grupos encontramos diferencias significativas con los alelos HLA- B 7, B 14, B 44

($p < 0.05$). En el grupo total de pacientes se encuentra que estas frecuencias están disminuidas con respecto a los controles.

Para el alelo HLA-B 27 encontramos en los pacientes una frecuencia génica elevada del 52% y para los controles del 2%, que al compararse tiene una elevada significancia estadística ($p < 10^{-3}$, RR=53.0, FE=51%),.

La frecuencia de la molécula HLA-B 15 se encuentra incrementado en los pacientes al compararse con el control (14% y 6%), sin embargo esta diferencia no llega a tener una p significativa.

Para genes clase II en especial DR, la única diferencia significativa ($p < 0.05$) que se encontró al comparar el grupo de pacientes con el control es el HLA-DR 5 (pacientes 5% y controles 12 %) y una diferencia no significativa para el DR 1.

El grupo total de enfermos con EaJ (66 niños) fueron divididos según su cuadro clínico para buscar si hay diferencias entre las espondiloartropatías. 40 de estos pacientes llenaban los criterios de inclusión para EAJ y 26 para Ea no diferenciada.

En las Tablas 5, 6 y 7 se muestran las frecuencias génicas de los subgrupos de pacientes comparados con el grupo control.

En la Tabla 5, al dividir el grupo de enfermos según su cuadro clínico y compararlos entre si no encontramos la existencia de ninguna diferencia significativa para cada uno de los alelos del locus HLA-A.

Para el Locus HLA-B (Tabla 6), al subdividirse las espondiloartropatías en EA y Ea no diferenciadas, el alelo B 7 perdió significancia estadística al compararse con el control.

Los alelos B 44 y B 14 mantienen su p significativa ($p < 0.05$), en el subgrupo de EAJ, lo cual no sucede con las espondiloartropatías no diferenciadas

Para el alelo B15 al comparar las EAJ y el control (13% y 6% respectivamente) esta diferencia no llega a ser estadísticamente significativa, de igual forma sucede con las Ea no diferenciada .

El alelo B 27 sigue siendo el más frecuente entre los dos grupos de Espondiloartropatías. Para EAJ la frecuencia génica fue de 57% y un poco menor para las no-diferenciadas (42 %).

Es interesante mencionar que el alelo B 35 cuya frecuencia génica en el grupo control es de 13% al compararse con el subgrupo de pacientes con EAJ (8%) y las no diferenciadas (18.3%)

En la Tabla 7 se muestran las comparaciones del locus HLA-DR para los subgrupos, para el alelo DR 5 la diferencia sigue permaneciendo significativa para los pacientes con EAJ (5.7%) pero no para los de la forma no-diferenciada (4.8 %) al compararse con el control (12%).

En la Tabla 8. Se hace un resumen de la distribución de alelos más relevantes para los subgrupos de pacientes (EAJ y Ea no-diferenciadas). Es muy notoria la elevada frecuencia que tiene el HLA B 27 en el grupo total de enfermos ($p < 10^{-3}$, RR=53.0, FE=51%), al subdividirse el grupo en pacientes con EA es un poco más elevada ($p < 10^{-3}$, RR=67.42, AF=57%) que las formas no diferenciadas de las Ea ($p < 10^{-3}$, RR=35.77, AF=41%).

Los alelos HLA- B 15 y HLA-DR 1 se vieron incrementados pero sin llegar a ser significativos.

En contraste, la frecuencia de HLA B 44 y B14 se encontraron disminuidas con respecto al control y existe una probable asociación negativa con HLA- DR 5 ($p < 0.05$).

1. DISCUSIÓN.

La asociación más fuerte entre enfermedad y un alelo del MHC sin duda es la Espondilitis Anquilosante (EA) y el antígeno HLA-B27. Sin embargo sólo el 2% de los individuos que portan en su genoma el B27 desarrollan la enfermedad. Además existe una proporción de pacientes que desarrollan EA o alguna otra espondiloartropatía que son negativos para el HLA B27, sugiriendo que otros genes dentro del MHC pueden estar involucrados en la susceptibilidad de desarrollar alguna de las entidades nosológicas que se agrupan en las espondiloartropatías (227).

Estudios epidemiológicos y clínicos recientes reportan en los cuales incremento en la prevalencia de las espondiloartropatías de inicio juvenil en México y otros países subdesarrollados (India y Norte de África) que en aquellas naciones de Europa y Norteamérica (1). En estos países subdesarrollados, los cuadros clínicos se presentan tempranamente durante la infancia y son más severos e incapacitantes lo que conlleva a la pérdida de la calidad de vida de estos pacientes (36). Son escasos los estudios que evalúan la relación entre los pacientes con Espondiloartropatías de inicio juvenil (EaJ) y el MHC y la influencia de estos genes en el desarrollo temprano de la enfermedad (119, 195).

El estudio de otros genes clase I y II del MHC en una población mestiza mexicana con un inicio juvenil de las Ea, representa un modelo excelente de evaluación de la participación de estos genes en la predisposición genética al desarrollo temprano de la enfermedad en una población en donde un incremento en la incidencia de EaJ es notorio en las Clínicas de Reumatología Pediátrica (28-30).

De los resultados presentados en esta tesis, es relevante la fuerte asociación del alelo HLA- B 27 en el grupo total de Espondiloartropatías de inicio juvenil ($pC < 10^{-3}$, RR=53.0, FE=51%), de igual que para la forma clínica no-diferenciada de la enfermedad. Siendo un poco más elevada en la EAJ ($pC < 10^{-3}$, RR=67.42, AF=57%) que las formas no diferenciadas de las Ea ($pC < 10^{-3}$, RR=35.77, AF=41%).

Los pacientes que inician sus síntomas en la infancia tienen cambios de patrón de la enfermedad a través del tiempo lo cual hace difícil su diagnóstico; de un episodio de oligoartritis en algunos pacientes a una forma más compleja de la enfermedad con inclusión de inflamación y cambios estructurales que dirigen a manifestación axial, periférica y extra-articular con episodios de la enfermedad activa en donde suceden los cambios estructurales con pérdida de la funcionalidad. Del inicio de una sintomatología de oligoartritis a la presentación de cambios estructurales pueden transcurrir de tres a cinco años, en donde el paciente es diagnosticado con Artritis Reumatoide Juvenil (ARJ) o Artritis Crónica Juvenil. Resulta importante para este tipo de pacientes con oligoartritis su tipificación, ya que al ser HLA-B27 + lo predispone a desarrollar una EaJ, en un periodo de tiempo determinado, como sucedió en más 5 pacientes de esta muestra. También algunos pacientes son diagnosticados con una EaJ no diferenciada posteriormente pasan a desarrollar una EAJ al tener en su genoma HLA-B 27 (4 pacientes de nuestra muestra).

Hipotéticamente el aumento en la frecuencia de las Ea de inicio juvenil en ciudades subdesarrolladas resulta de la gran incidencia de infecciones por bacterias artritogénicas en la infancia. Los episodios recurrentes y severos con bacterias como: *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* y con menor frecuencia *Yersinia enterocolitica* en niños portando en su

genoma HLA-B27+ (y también en los HLA B 27 negativos) pueden desencadenar episodios de artritis entesitis y la progresión a las formas severas y definitivas EaJ (230). Es frecuente que la población infantil mestiza mexicana, este sometida a retos antigénicos con microorganismos potencialmente artritogénicos como los antes citados que pudieran ser los detonantes en aquellos que portan en su genoma HLA B27 y/o otros genes del MHC aún por definir para el desarrollo de una Ea y de esta manera incrementar la incidencia de estas patologías y la severidad de los cuadros clínicos y posteriormente la incapacitación en la adolescencia.

Para algunas enfermedades complejas como lo son las Ea, examinar el fenotipo refleja el proceso de la enfermedad y facilita la identificación de los genes que influyen la susceptibilidad genética o patogénesis, es por ello que al tener una mejor definición en los cuadros clínicos de los pacientes con EaJ nos llevara al reconocimiento de los genes de susceptibilidad.

En la población juvenil también existe un incremento discreto en la frecuencia génica del alelo HLA-B15 en el grupo total de pacientes y en especial en las EAJ (control 6%, EAJ 13%), sin embargo esta diferencia no llega a ser estadísticamente significativa.

Esta asociación ya había sido reportada por Mielants (241) para la forma clínica no diferenciada de las Ea y en pacientes con EA que fueran HLA-B27 negativos, asociado a lesiones en colon e ileum en pacientes adultos. Nuestros pacientes juveniles no tienen lesiones gástricas y lo que es interesante distinguir es la presencia de B15 y B 27 juntos en 7 de los 10 paciente diagnosticados con EAJ todos ellos varones.

Para la forma clínica no diferenciada 2 de 4 pacientes que eran B15 también eran B27.

Para establecer una correlación sinérgica entre estos dos marcadores sería necesario hacer una genotipificación con técnicas de alta resolución de los subtipos de B15 para identificar si en alguno de ellos, en su molécula existen Glu⁴⁵ y Cys⁶⁷ que en el caso de la molécula B27 confieran mayor susceptibilidad, para de esta manera influir en la edad de inicio de la enfermedad.

En población adulta se reportó la asociación del B15 con la susceptibilidad al desarrollo de las Espondiloartropatías (la frecuencia génica en pacientes 11% y control 6%, $p < 0.05$), en estos pacientes no se correlacionó la presencia de ambos alelos con una mayor susceptibilidad (195).

El alelo HLA- B39 tiene mucha similitud con B27, en especial comparten el pocket B que incluye Glu⁴⁵ y Cys⁶⁷, y que está comprobado por diferentes estudios su importancia en artritogenicidad. Los alelos B*3901 y B*3909, especialmente comparten el mismo repertorio de péptidos que B27 lo podría conferirles un papel en la patogénesis de las Ea (178,179,232). En japoneses con EAJ y HLA-B 27 negativos, se reporta una asociación fuerte con B39 (190).

En nuestra población la frecuencia génica de B39 en controles y enfermos es similar (11% y 13% respectivamente), pero hay un hecho que llama la atención, de los 10 pacientes con EAJ y B39 positivo, siete de ellos además eran B27 positivos y lo más interesante todos estos pacientes iniciaron síntomas entre los 5 y 7 años. Por lo cual podríamos pensar el alelo B39 acompañado del B27 confieren una mayor susceptibilidad de desarrollar EA en etapas más tempranas de la vida y esto adicionado con el constante reto antigénico podría ser determinante en el incremento de las espondiloartropatías, lo cual también podría aplicarse para el caso de HLA- B15.

El alelo B 35 fue reportado asociado con EA en estudios familiares (190). En nuestra muestra la frecuencia génica del grupo total de Ea es muy similar al del control (11% y 13% respectivamente), pero al subdividir el grupo, en los pacientes con EAJ la frecuencia es de 8% contra un 18% de la forma clínica no diferenciada. El B35 de estos sujetos siempre se presentó con los alelos B27 y B15, de alguna manera este alelo acompañado de un alelo de riesgo podría dirigir la enfermedad a una forma clínica indiferenciada y una edad de inicio más retardada.

Es más que evidente la existencia de otros genes no B 27 que influyen en la susceptibilidad y las manifestaciones clínicas en EaJ pero para identificarlos y esclarecer su participación es necesario estudios muy amplios y técnicas moleculares de alta resolución acompañados de diagnósticos certeros entre el grupo de pacientes.

Los alelos B 44 y B14 se encontraron disminuidos en nuestra población de enfermos al compararse con los controles lo cual podría tratarse de un efecto protector en el desarrollo de las Ea. Al analizar a los pacientes con EAJ encontramos un haplotipo con B 44 y otro con B14 acompañados del B27 para la forma clínica no diferenciada, B14 y B27 estuvieron juntos B 44 con B 39, lo que es interesante destacar es que estos cuatro pacientes iniciaron sus síntomas entre a 15 años y 16 años, lo cual parecería indicar que estos alelos podrían retardar el inicio de la enfermedad.

En el análisis de moléculas clase II, encontramos una disminución en la frecuencia génica del DR 1 al compararse con el grupo control, en un estudio reciente con pacientes con Ea de inicio en la vida adulta (195), se reportó una asociación positiva para este alelo con un Riesgo Relativo alto (3.3), lo cual podría traducirse en que este HLA-DR 1 sólo esta

asociado con la enfermedad en su inicio en la vida adulta y no en la forma juvenil como se corrobora en este estudio.

El DR 5 se encuentra también disminuido en nuestra población enferma sin embargo ninguna tendencia encontramos de acuerdo a un determinado haplotipo o edad de inicio.

Existen dos reportes en la literatura médica (119,195) que reportan una asociación del HLA-DRB1*08 en población juvenil con EA caucásicos y mestizos mexicanos, estos hallazgos no son corroborados en nuestra población estudiada, las frecuencias génicas entre los controles y los pacientes (18% y 22% respectivamente) fue muy cercana.

Es sin duda el HLA-B 27 un factor predisponente en la susceptibilidad al desarrollo de la espondiloartropatías en especial de la Espondilitis Anquilosante, en esta población y en otros grupos étnicos sin embargo la presencia de otros alelos como el B 15 y B 39 pueden influir en el desarrollo temprano de la enfermedad, en el caso del alelo B 35 cuando se encuentra conjuntamente con el B27 podría dirigir al desarrollo de una forma clínica indiferenciada de las Ea. Sin embargo para poder constatar estos hallazgos es necesario efectuar el estudio en familias y el uso de técnicas de alta resolución para el análisis de los subtipos de los alelos implicados.

En los últimos cinco años, la aplicación de estudios de escaneo genómico (Whole genome scan) en familias muy extensas marca la asociación y el ligamiento muy fuerte de genes del MHC con la EA y en general en todas las Ea con la susceptibilidad para desarrollar estos síndromes pero también se marca la existencia de otros genes dentro y fuera del MHC que participan en la susceptibilidad y severidad de estas. Por otra parte el uso de la bioinformática para analizar diversos péptidos derivados de patógenos potencialmente artritogénicos y el entendimiento de los mecanismos por los cuales

contribuye el B27 en la patogénesis de las Ea, nos llevarán en poco tiempo al desarrollo de nuevos tratamientos más eficaces, pero principalmente plantear las estrategias preventivas en los pacientes que tienen los marcadores de susceptibilidad.

IX CONCLUSIONES.

Desde los primeros trabajos en donde se describe la asociación de HLA-B27 y la Espondilitis Anquilosante han transcurrido tres décadas. En los últimos años el estudio de animales transgénicos para la molécula B27, reconocen que esta molécula tiene el papel central en la patología de la enfermedad con un medio ambiente contribuyente.

A través del uso de técnicas moleculares y la bioinformática se ha analizado el papel de probables péptidos artritogénicos derivados de patógenos y los mecanismos por los cuales se incrementa y afecta la respuesta inmune.

El análisis de las espondiloartropatías juveniles en población mestizos mexicanos, en donde las estadísticas denotan un incremento en su incidencia, el alelo HLA-B27 tiene una notable asociación en la población con EAJ y un poco menor para las Ea no-diferenciadas, es también interesante al análisis de la población encontrando que otros alelos como el B 39 puedan tener un efecto en la edad de inicio de los primeros síntomas presentándose entre los 5 y 7 años y alelos como el B44 y B14 hasta la adolescencia cuando están juntos en un mismo genoma con el B27.

El carácter oligogénico de las Espondiloartropatías, considera que deben existir un máximo de cinco genes involucrados en susceptibilidad, uno de ellos es el HLA-B27 probablemente otro de los genes pueda ser el otro alelo B que interaccione con el B27 confiriendo una mayor susceptibilidad en el desarrollo de la enfermedad para que los primeros síntomas se presenten más tempranamente durante la vida sin dejar de mencionar un medio ambiente desencadenante.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Burgos-Vargas R, Pacheco-Tena C, Vazquez-Mellado J. Juvenile –onset Spondyloarthropathies . *Pediatr Rheumatol* 1997;23:569-98.
2. Pepmueller Ph Moore TL. Juvenile Spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol* 2000;12:269-73.
3. Ansell BM, Bywaters EGL: Diagnosis of probable Still's disease and its outcome. *Ann Rheum Dis* 1962;21:253-62.
4. Hussein A, Abdul-Khaliq H, von der Hardt H: Atypical spondyloarthritis in children: proposed diagnostic criteria. *Eur J Pediatr* 1989; 148:513-17.
5. Fink CM. Classification Criteria: Proposals for the development of classification criteria for idiopathic arthritides of childhood. *J Rheumatol* 1995;22:1566-69.
6. Petty RE. Is ankylosing spondylitis in childhood a distinct entity? *J Rheumatol* 1996;23:2014-14.
7. Burgos-Vargas R, Petty RE. Juvenile Ankylosing Spondylitis. *Rheum Dis Clin North Am* 1992;18:123-142.
8. Burgos-Vargas R. Rudwaleit M, Sieper J. The place of juvenile onset Spondyloarthropathies in the Durban 1997 ILAR Classification Criteria of Juvenile Idiopathic Arthritis. *J Rheumatol* 2003;30:1123-1132.
9. Blumberg B, Ragan C. The natural history of rheumatoid spondylitis. *Medicine* 1956;35:1-31.
10. Riley MJ, Ansell BM, Bywaters EGL. Radiological manifestations of ankylosing spondylitis according to age at onset. *Ann Rheum Dis* 1971;30:138-148.

11. Burgos-Vargas R, Lardizabal-Sanabria J, KAtona G. Ankylosing spondylitis in Mexico early age onset. *Arthritis Rheum* 1982;25 (Supl):S13.
12. García-Morteo O, Maldonado-Cocco JA, Suárez-Almazor ME. Ankylosing spondylitis of juvenile onset: comparison with adult onset disease. *Sacand J Rheumatol* 1983;12:246-48.
13. Jiménez J, Mintz G. The onset evolution and final stages of juvenile ankylosing spondylitis are different from those of adult ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1982;28 (Supl):s22.
14. Ansell BM, Bywaters EGL: Diagnosis of "probable" Still's disease and its outcome. *Ann Rheum Dis* 1962;21:253-262.
15. Scaller J, Bitnum S, Wedgwood RJ. Ankylosing spondylitis with childhood onset. *J Pediatr* 1969;74:505-516.
16. Rosenberg AM, Petty RE: A syndrome of seronegative enthesopathy and arthropathy in children. *Arthritis Rheum* 1982;25:1041-47.
17. Jacobs JC, Johnston AD, Berdon WE. HLA-B 27 associated spondyloarthritis and enthesopathy in childhood: Clinical, pathologic and radiographic observations in 58 patients. *J Pediatr* 1982;100:521-528.
18. Ansell BM. Juvenile spondylitis and related disorders. In JMH Moll (ed): *Ankylosing spondylitis*, ed I. Edinburgh, Churchill Livingstone 1980.
19. Schaller JG, Bitnum S, Wedgwood RJ. Ankylosing spondylitis with childhood onset. *J Pediatr* 1984;18:208-16
20. Petty RE: Is ankylosing spondylitis in childhood a distinct entity? *J Rheumatol* 1996.23:2013-14.

21. Bennett PH, Burch TA: New York symposium on population studies in the rheumatic diseases: new diagnostic criteria. *Bull Rheum Dis* 1967;17:453-458.
22. Koehler J, Kuipers G, Zeidler H. Managing Seronegative Spondylarthritides. Review. *Rheumatology* 2000;39:360-68.
23. Rehakova Z, Capkova J, Stepankova R, Iouzacka A, Ivanyi P and Weinreich S. Germ-Free Mice Do Not Develop Ankylosing Entesopathy, a Spontaneous Joint Disease. *Hum Immunol* 2000;61:555-58.
24. Boyer GS, Lanier AT, Templin DW. Prevalence rates of Spondyloarthropathies, rheumatic disorders in an Alaskan Inupiat Eskimo population. *J Rheumatol* 1988,15:678-83.
25. Malleson PN, Fung MY, Rosenberg AM. The incidence of pediatric rheumatic disease: results from the Canadian Pediatric Rheumatology disease registry. *J Rheumatol* 1996;23:1981-87.
26. Bowyer S, Roettcher P. Pediatric rheumatology clinic population in The United States: results of a 3 year survey. Pediatric Rheumatology database Research Group. *J Rheumatol* 1996;23:1968-74.
27. Burgos-Vargas R. Spondyloarthropathies and psoriatic arthritis in children. *Curr Opin Rheumatol* 1993; 5:634-43.
28. Denardo BA, Tucker LB, Miller LC. Demography of a regional Pediatric Rheumatology patient population *J Rheumatol* 1994;21:1553-61.
29. Gáre BA, Fasth A. The natural history of juvenile chronic arthritis: A population based cohort study. Onset and disease process. *J Rheumatol* 1995;22:295-307.

30. Symmons DPM, Jones M, Osborne J. Pediatric Rheumatology in the United Kingdom: Data from the British Pediatric Rheumatology Group National Diagnostic Register. *J Rheumatol* 1996;23:1975-80.
31. Burgos-Vargas R, Pacheco-Tena C, Vázquez-Mellado J. Juvenile Spondyloarthropathies. *Rheum Dis Clin N Am* 2002;28:531-560.
32. Cabral DA, Oen KG, Petty RE. SEA syndrome revisited a longterm fallowup of children with a síndrome of seronegative enthesopathy and arthropathy. *J Rheumatol* 1992;18:1282-85.
33. Burgos –Vargas R, Clark P. Axial involvement in the seronegative enthesopathy and arthropathy syndrome and its progression to ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 1989;16:192-97.
34. Oliveri I, Foto M, Ruju GP. Low frequency of axial involvement in Caucasian pediatric patients with seronegative enthesopathy and arthropathy syndrome after five years of disease. *J Rheumatol* 1992;19:469-75.
35. Burgos-Vargas R, Vázquez-Mellado J, Cassis N. Genuine ankylosing spondylitis in children: a case control study of patients with definite disease according to current adult-onset criteria shortly after onset. *J Rheumatol* 1996;23:2140-47.
36. Burgos-Vargas R, Pacheco-Tena C, Vázquez-Mellado J. Juvenile-onset spondyloarthropatides: rationale for clinical evaluation. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2002;16:551-572.
37. Sieper J, Braun J, Wu P. T cells are responsible for the enhanced synovial cellular immune response to triggering antigen in reactive arthritis. *Clin Exp Immunol* 1993;91:96-102.

38. Simon AK, Seipelt E, Wu P. Análisis of cytokine profiles in synovial t cell clones from Chamydia reactive arthritis patients: predominance Th1 subset. *Cin Exp Immunol* 1993;94:122-26.
39. Wilkens RF, Arnett FC, Bitter T: Reiter's Syndrome: evaluation of preliminary criteria for definitive disease. *Arthritis Rheum* 1981;24:844-49.
40. Cuttica RJ, Sceines EJ, Garay SM. Juvenile onset Reiter's Syndrome. A retrospective study of 26 patients. *Clin Exp Rheumatol* 1992;103:285-88.
41. Mielants H, Veys EM, Cuvalier C. Gut inflammation in children with late onset pauciarticular juvenile chronic arthritis and evolution to adult spondyloarthropathy- a prospective study. *J Rheumatol* 1993;20:1567-72.
42. Barabino A, Gattorno M, Cabria M. 99mTc white cell scanning to detec gut inflamation in children with inflammatory bowel disease or spondyloarthropathies. *Clin Exp Rheumatol* 1998;16c:327-334.
43. Lionetti P, Pupi A, Veltroni M, Fondo C, Cavicchi MC, Zahorí C, Falcini F Evidence of subclinical intestinal inflammation by 99m technetium leukocyte scintigraphy in patients with HLA-B27 positive juvenile onset active spondyloarthropathy. *J Rheumatol* 2000;27:1538-41.
44. Baeten D, Keyser F. The Histopathology of Spondyloarthropathy. *Curr Mol Med* 2004,4:1-12.
45. Southwood TR, Petty RE, Malleson PN. Psoriatic arthritis in children. *Arthritis Rheum* 1989;32:1014-21.
46. Helliwell PS. Relationship pf psoriatic arthritis with the other spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol* 2004,16:344-49.

47. Burgos-Vargas R, Rudwaleit M, Sieper J. The place of juvenile onset spondyloarthropathies in the Durban 1997 ILAR classification criteria of juvenile idiopathic arthritis. International league of Associations for Rheumatology. *J Rheumatol* 2002;29:869-74.
48. Henson PM. Dampening Inflammation. *Nature Immunol* 2005;6:1179-1181.
49. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002;420:846-852.
50. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002;420:853-867.
51. Baeten D, Keyser F. The Histopatology of Spondyloarthropathy. *Curr Mol Med* 2004,4:1-12.
52. Damme N, De Vos M, Baeten D, Demetter H, Mielants G, Verbruggen C, Cuvalier CA, Veys EM, Keyser F. Flow cytometric analysis of gut mucosal lymphocytes supports an impaired TH1 cytokine profile in spondyloartropathy. *Rheum Dis* 2001;60:495-499.
53. Bresnihan B, Baeten D, Firestein GS, Fitzgerald OM, Gerlag DM, Haringman JJ, McInnes IB, Reece RJ, Smith MD, Ulfgren AK, Veale DJ, Tak PP; OMERACT 7 Special Interest Group. Synovial tissue analysis in clinical trials. *JRheumatol* 2005;32:2481-4.
54. Baeten D, Demetter P, Cuvalier CA, Kruithof E, Van DammeN, De Vos M, Veys EM, Keysae F. Macrophages expressing the scavenger receptor CD163: a link between immune alterations of the gut and synovial inflammation in spondyloarthropathy. *J Pathol* 2002;196:343-350.

55. Baeten D, Keyser F, Mielants H, Veys EM. Immune linkages between inflammatory bowel disease and spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14:342-347.
56. Mielants H, De Keyser F, Baeten D, Van den Bosch F. Gut inflammation in the Spondyloarthropathies. *Curr Rheumatol Rep* 2005;7:188-194.
57. Firestein GS. Inhibiting Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2006;354:81-83.
58. Dougados M, van der Linden S, Leirisalo-Repo M. Sulfasalazine in the treatment of spondylarthropathy: a randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum* 1995;36:618-27.
59. Dulgeroglu M. Sulphasalazine in juvenile rheumatoid arthritis . *J Rheumatol* 1988;15:881-86.
60. Burgos-Vargas R, Cortés M, Goycoochea. Estudio doble-ciego para evaluar la eficiencia y la tolerancia de sulfasalazina en espondiloartropatías juveniles *Rev Mex Rheumatol.* 1983;12:98-196.
61. Klein J, Sato A. The HLA System-First of two Parts. *N Engl J Med* 2000;343:702-709.
62. Klein J, Sato A, Harton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, Luz MJ, Povey S, Talbot CC, Wgrith MW, Wsin HM, Trowsdale J, Ziegler A, Beck S. Gene Map of tle Extended Human MHC. *Nature Rev Genet* 2004;5:889-899.
63. Kelley J, Walter L, Trowsdale J. Comparative genomics of major histocompatibility complexes. *Immunogenetics* 2005;56:683-695.

64. Charron D. Immunogenetics today: HLA, MHC and much more. *Curr Opin Immunol* 2005;17:493-497.
65. McCluskey J, Peh CA. The human leucocyte antigens and clinical medicine: an overview. *Rev Immunogenetics* 1999;1:3-20.
66. Solheim JC. Class I MHC Molecules: assembly and antigens presentation. *Immunol Rev* 1999,172:11-19.
67. Antoniou AN, Powis SJ, Elliott T: Assembly and export of MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol* 2003;15:75-81.
68. Klein J, Sato A, O' Huigin C, & Takahata N: The molecular descent of the major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1993;11:269-295.
69. Laird DJ, De Tomasso AW, Cooper M, and Weissman IL. 50 million years of chordate evolution: seeking the origins of adaptative immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 6924-26.
70. Bjorkman PJ, & Parham P. Structure function and diversity of class I mayor histocompatibility complex molecules. *Ann Rev Immunol*. 1990;59: 253-288.
71. Boutellier PL. HLA class I chromosomal region, genes and products: facts and questions. *Crit Rev Immunol* 1994;14:89-129.
72. Natarajan K, Li H, Mariuzza RA, Margulies DH. MHC class I molecules, structure and function. *Rev Immunogenetics* 1999;1:32-48.
73. Hughes AL Origin and evolution of HLA class I pseudogenes. *Mol Biol Evol* 1995;12:247-258.
74. Bush R & Mellins ED. Devlopping and shedding inhibitions: How MHC class II molecules reach maturity. *Curr Opin Immunol* 1996;8:51-58.

75. Nelson CA, Fremont DH. Structural principles of MHC class II antigen presentation. *Rev Immunogenetics* 1999;1:47-59.
76. Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, Fiers W, Pious D, Strominger JL. Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8699-704.
77. Klein J & O'Huigin C. Composite origin of major histocompatibility complex genes. *Curr Opin Genet Develop.* 1993;3:923-930.
78. Rhodes DA, Trowsdale. Genetics and molecular genetics of the MHC. *Rev Immunogenetics* 1999;1:21-31.
79. Mackay IR, Rosen FS, Ed. Walport MJ. Complement. *N Engl J Med* 2001;344:1058-1066.
80. Bodmer JG, Marsh SG, Albert DE, Bodmer WF, Dupont B, Ehrlich HA, Mach B, Mayo WR, Parham P, Sasazuki T. Nomenclature for factors of HLA system. *Hum Immunol* 1994; 41: 1-20.
81. Monaco JJ. Structure and function of genes in the MHC class II region. *Curr Opin Immunol* 1993;5:17-20.
82. Trowsdale J. Both man & bird & beast: comparative organization of MHC genes. *Immunogenetics*, 1995; 41:1-17.
83. Singer DS, Maguire JE. Regulation of expression of class I MHC genes. *Crit Rev Immunol* 1990; 10: 235-257.
84. Halloran PF & Madrenas J. Regulation of MHC transcription. *Transplantation* 1990;10:307-328.

85. Cogswell JP, Zeleznik-Le n & Ting JP. Transcription regulation of the HLA-DRA gene. *Crit Rev Immunol* 1991;11:87-112.
86. Glimcher LH, Kara CJ. Sequences and factors: a guide to MHC class II transcription. *Annu Rev. Immunol* 1992;10:13-49.
87. Marsh SGE. HLA class II region sequences. *Tissue Antigens* 1998;51:467-505.
88. Klein J and Sato A. Birth of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 1998;47:199-209.
89. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Geraghty D, Hansen EJA, hurley CK, Masch B. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens* 2005;66:254-56.
90. Hughes AL & Huighes MK. Natural selection on the peptide-binding regions of major histocompatibility complex molecules: *Immunogenetics* 1995; 42: 233-243.
91. Abi-Rached L and pontaroti P. The MHC "Big-Bang". Duplication and exon shuffling during chordate evolution. A hypothetic-deductive approach. In *major histocompatibility complex: Evolution, Structure and Function*, M Kasahara, ed (Tokyo, Springer-Verlag), pp 45-52.
92. Klein J. *Natural history of the Major Histocompatibility Complex*. John Wiley & Sons, New York.
93. Kasahara M, Flajnik MF, Isibashi T & Natori T. Evolution of the Mayor Histocompatibility complex . *Transplant Immunol* 1995; 3:120.
94. Brewerton DA: Caffrey M, Nicholls A, Walter D, Oates JK, James DC. Reiter's disease and HL-A27. *Lancet* 1973;2:996-98.
95. Schloosstein L, Terasaki PJ, Bluestone R, Pearson CM. High association HLA antigen W27 with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med* 1973;288:704.

96. Khan MA. Spondyloarthropathies-spondylartropathies. *Curr Opin Rheumatol* 1996;8:267-8.
97. Dougados M, Linden RJ, Juhlm R, Huntfeldt B, Calin A. The European Spondyloarthropathy. Study Group preliminary criteria for the classification of spondyloarthropathy. *Arthritis Rheum* 1991;34:18-27.
98. Ramos M, López de Castro JA. HLA-B27 and the patogénesis of spondyloarthritis. *Tissue Antigens* 2002;60:191-205.
99. Jarvinen P. Occurrence of ankylosing spondylitis in a nation-wide series of twins. *Arthritis Rheum* 1989; 32:1135-41.
100. Gladman DD. Spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:393-94.
101. Vargas-Alarcón J, Londoño JD, Hernández-Pacheco G, Pacheco-Tena C, Castillo E, Cardiel MH, Granados J, Burgos-Vargas R. Effect of HLA –B and HLA-DR genes on susceptibility to and severity of spondyloartropathies in mexican patients. *Ann Rheum Dis* 2002;61:714-17.
102. López de Castro JA. The pathogenetic role of HLA-B27 in chronic arthritis. *Curr Opin Immunol* 1998;10:59-66.
103. Gonzalez-Roces S, Alvarez MV, Gonzalez S, Dieye A, Makni H, Woodfield DG, Housan L, Konenkov V, Abbas MC, Grunnet N. HLA-B 27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 1997;49:116-123.
104. Mason PM, Perham P. HLA class I region sequences. *Tissue Antigens* 1998;51:417-466.

105. Khan MA: Update: the twenty subtypes of HLA-B27. *Curr Opin Rheumatol* 2000;12:235-238.
106. López-Larrea C, Sujirachato K, Mehra NK. HLA-B 27 Subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 1995;45:169-76.
107. Ren EC, Koh WH, Sim D, Boey ML, GeeGB, Chan SH: Possible protective role of HLA-B*2706 for ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 1997;49:67-69.
108. Sudarsono D, Hadi S, Mardjuadi A. Evidence that HLA-B*2706 is not protective against spondyloarthropathy. *J Rheumatol* 1999;26:1534-36.
109. Brown MA, Pile KD, Kennedy LG. HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the Kingdom. *Ann Rheum Dis* 1996;55:268-70.
110. Armas JB, Gonzalez S, Martínez-Borra J, Laranjeira F, Ribeiro E, Correia J, Ferreira ML, López-Vázquez A, López-Larrea C. Susceptibilidad to ankylosing spondylitis is independent of the Bw4 and Bw6 epitopes of HLA-B27 alleles. *Tissue Antigens* 1999;53:237-243.
111. Coleman J, Coates E, Boyce M, Darke C. Four patients identified with HLA- B 2708 during routine service HLA B27/B2708 typing. Abst 3.14 Fifteenth annual BSHI Conference, Dublin Castle Oct 2004.
112. Marchionni I, Modena V, Roggero R, Curtioni ES. The polymorphism of HLA-B27 and seronegative spondyloarthropathies in the Italian population [abstract]. In 13th European Histocompatibility Conference; Crete 1999. European Federation for Immunogenetics:36.

113. Olivieri I, Padula A, Ciancio G, Moro L, Durante B, Gaudinio C. The HLA-B*2709 subtype in a patients with undifferentiated spondarthritis [letter]. *Ann Rheum Dis* 2000;59:654-55.
114. Crawford MH. The origins of Native Americans evidence from anthropological genetics. Cambridge University Press, 1998.
115. García-Fernández S, Gonzalez S, Mina-Blanco A, Martinez-Borra J, Blanco-Gelaz M, López-Larrea C: New insights regarding HLA-B27 diversity in the Asian population. *Tissue Antigens* 2001;58:259-262.
116. Tamouza R, Manssur I, Bouguacha N, Klayme S, Toubert A, Naman R, Charron D. A new HLA-B*27 allele (B*2719) identified in a Lebanese patients affected with ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 2001;58:30-33.
117. Witter K, Lau M, Zalhn R, Schoz S, Albert ED: Identification of a novel HLA-B*2722 allele from Filipino cell. *Tissue Antigens* 2001;58:263-68.
118. Olivieri I, Ciancio G, Padula A, Gaudiano C, Masciandro S, Ferrara G B. The HLA.B*2709 subtype confers susceptibility to spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 2002;46:553-54.
119. López-Larrea C, Gonzalez-Roces S, Peña M, Domingurz O, Coto E, Moreno M, Burgos-Vargas R, Gorodezky . Characterization of B 27 Haplotypes by Oligotyping and Genomic Sequencing in tne Mexican Mestizo Population with Ankylosing Spondylitis Juvenile and Adult Onset. *Hum Immunol* 1995;43:174-180.
120. Khan MA. HLA- B 27 polymorphism and Association with Disease. *J Rheumatol* 2000;27:1110-14.
121. Ball EJ, Khan MA. HLA-B27 polymorphism. *Joint Bone Spine* 2001;68.378-82.
122. Gonzalez S, Garcia-Frenandez S, Martinez-Borra J, Blanco-Gelaz MA, Sánchez del Río. High Variability of HLA-B 27 Alleles in Ankylosing

- Spondyloarthropathies in the population of Northern Spain. *Hum Immunol* 2002;63:673-76.
123. Varnavidou-Nicolaidou A, Karpasitou K, Georgiou D, Stylianou G. HLA-B 27 in the Greek Cypriot Population: Distribution of Subtypes in Patients with Ankylosing Spondyloarthropathies and other HLA-B27-related Disease. The Possible Protective Role of B*2707. *Hum Immunol* 2004;65:1451-54.
 124. Brown MA, Jepson A, Young A, Whittle hc, Wordsworth BP. Ankylosing spondylitis in West Africans: evidence for a non-HLA-27 protective effect. *Ann Rheum Dis* 1997;56:68-70.
 125. D'Amato M, Fiorillo MY, Carcassi C: Relevance of residue 116 of HLA-B 27 in determining susceptibility to ankylosing spondylitis. *Eur J Immunol* 1995;25:3199-201.
 126. Mathieu A, Sorrentino R. HLA-B*2709 and spondylarthropathies: comment on the coincide communication by Oliveri I (Letter). *Arthritis Rheum* 2003;47:866-7.
 127. Sudarsono D, Hadi S, Mardjuadi A, Nasution AR, Dekker.Sayes A, Breur-Vrisendorp Bs. Evidence that HLA-B*2706 is not protective against spondyloarthopathy. *J Rheumatol* 1999,26:1934-36.
 128. Blanco-Gelaz MA, López-Vázquez A, Garcia-Fernández S, Martínez-Borra J, González S, López.Larrea C. Genetic Variability, Molecular Evolution, and Geographic Diversity of HLA-B27. *Hum Immunol* 2001;62.1042-50.
 129. Geczy AF, McGuigan LE, Sullivan JS, Edmonds JP. Cytotoxic T lymphocytes against disease-associated determinant(s) in akylosing spondylitis. *J Exp Med* 1986;164:932-937.
 130. Sieper J, Braun J. Pathogenesis of Spondylarthropathies. *Arthritis Rheum* 1995;18:1547-54.
 131. Märker-hermann E, Meyer zum búschenfelde KH, Wildner G.HLA-B 27 derived peptides as autoantigens for T lymphocytes in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1997;40:2047-54.
 132. Frauendorf E, Von Goessel H, May E, Märker-Hermann E. HLA B 27-restricted T cells from patients with ankylosing spondylitis recognize peptides

- from B*2705 that are similar to bacteria-derived peptides. Clin Exp Immunol 2003;134:351-59 .
133. Yu DT. Pathogenesis of reactive arthritis. Inter Med 1999;38:97-101.
134. Linden van der S, Heijde van der D. Clinical aspects, outcome assessment, and management of ankylosing spondylitis and postenteric reactive arthritis. Curr Op Rheumatol 2000;12:263-68.
135. Kim TH, Uhm WS, Inman RD. Pathogenesis of ankylosing spondylitis and reactive arthritis. Curr Op Rheumatol 2005;17:400-05.
136. Maki-Ikola O, Y Lie-Kerttula U, Saario R, Tiovanan P, Granskord K: *Salmonella* specific antibodies in serum and sinovial fluid in patients with reactive arthritis. Br J Rheumatol. 1992;31:25-29.
137. Granfors K, Jalkanen S, Toivanen P, Koski J, Lindberg AA. Bacterial lipopolysaccharide in synovial fluid cells in *Shigella* triggered reactive arthritis. J Rheumatol 1992;19:500-06.
138. Maki-Ikola O, Lahesmaa R, Heesemann J, Merilahti-Polo R, Saario R, Taivanen A. *Yersinia*-specific antibodies in serum and synovial fluid I patients with *Yersinia* triggered arthritis. Ann Rheum Dis 1994;53:535-39.
139. Braun J, Latiko S, Treharme J, Eggens U, Wu P, Disfer A. *Chlamydia pneumoniae*: a new causative agent of reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis. Ann Rheum Dis 1994;53:100-105.
140. Sieper J, Kingsley G, Palacios-Boix A, Pitzalis C, Thereharme J, Hughes R. Synovial T Lymphocyte specific immune response to *Chlamydia trachomatis* in Reiter's disease. Arthritis Rheum 1991;34:588-98.
141. Maki-Ikola O, Nissila M, Lehtinen K, Leirisolo-Repo M, Taivanen P, Granfors K. Antibodies to *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* in the sera of patients with axial and peripheral form of ankylosing spondylitis. Br J Rheumatol 1995;34:413-17.
142. Maki-Ikola O, Nissila M, Lehtinen K, Taivanen P, Granfors K. IgA class serum antibodies against three diferents *Klebsiella* serotypes in ankylosing spondylitis. Br J Rheumatol 1998;37:1299-302.

143. Burgos-Vargas R, Vázquez-Mellado J. Reactive arthritides In: Cassidy JT, Petty RE, eds. *Textbook of pediatric rheumatology*. 4th ed. Philadelphia: Saunders 2000:89-101.
144. Pacheco-Tena C, Alvarado de la Barrera C López-Vidal Y, Vázquez-Mellado J, RichaudPatín Y, Burgos-Vargas R. Bacterial DNA in synovial fluid cells of patients with juvenile onset spondyloarthropathies. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:920-27.
145. Schwimmbeck PL, Yu DTY, Oldstone MB. Autoantibodies to HLA-B27 in the sera of patients with ankylosing spondylitis and Reiter' syndrome: molecular mimicry with *Klebsiella pneumoniae* as potential mechanism of autoimmune disease. *J Exp Med* 1987;166:173-181.
146. Davenport MP. The promiscuous B27 hypothesis. *Lancet* 1995;346:500-01.
147. Scofield RH, Warren WI, Koelsch G, Harley JB. A hypothesis for the immune dysregulation in spondyloarthropathy: contribution from enteric organism, B27 structure, peptides bound by B 27 and convergent evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9330-34.
148. Scofield RH, Kutien B, Gross T, Warren WI, Koelsch G, Harley JB. HLA-B27 binding of peptide from its own sequence and similar peptides from bacteria: implications for spondyloarthropathies. *Lancet* 1995;345:1542-44.
149. Damian RT. Molecular Mimicry: antigens sharing by parasite and host and its consequences. *American Naturalist* 1964;98:129-49.
150. Fujinani RS, Oldstone MB, Wroblewska Z, Frankel ME, Koprowski H. Molecular mimicry in virus infection: crossreaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci*. 1983;80:2346-50.
151. Prinz JC. Disease mimicry- a pathogenetic concept for T cell-mediated autoimmune disorders triggered by molecular mimicry?. *Autoimm Rev* 2004;3:10-15.

152. Hermann E, Yu DT, Büschenfel KH, Fleischer B. HLA-B27 restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet* 1993;342:645-50.
153. Duchman R, May E, Ackermann B, Goergen B, Büschenfel KH, Hermann E. HLA-B 27 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to arthritogenic enterobacteria or self antigens are dominated by closely TCR-V β gene segments. A study in patients with reactive arthritis. *Scand J Immunol* 1996;43:101-8.
154. Fiorillo MT, Greco G, Maragno M, Potolicchio I, Monizio A, Dupuis ML, Sorrentino R. The naturally occurring polymorphism Asp¹¹⁶, differentiating the ankylosing spondylitis associated HLA-B*2705 from the non associated HLA-B*2709 subtype, influences peptide-specific CD8 T cell recognition. *Eur J Immunol* 1998;28:2508-16.
155. Fiorillo MT, Managno M, Buter R, Dupuis MI, Sorrentino R. CD8+ T cell autoreactivity to an HLA-B27 restricted self-epitope correlates with ankylosing spondylitis. *J Clin Invest* 2000; 106:47-53.
156. Fiorillo MT, Rückert C, Hülsmeier M, Sorrentino R, Saenger W, Ziegler A, Uchanska-Ziegler B. Allele dependent similarity between viral and self-peptide presentation by HLA-B 27 subtypes. *J Biol Chem* 2005;280:2962-71.
157. Ramos M, Alvarez I, Sesma L, Logean A, Rognan D, López de Castro JA. Molecular Mimicry of an HLA-B27 Ligand of Arthritis Linked subtypes with Chlamydial proteins. *J Biol Chem* 2002;277:37573-81.
158. Hülsmeier M, Fiorillo MT, Bettosini F, Sorrentino WS, Ziegler A, Uchanska-Ziegler B. Dual, HLA-B27 subtype-dependent conformation of a self peptide. *J Exp Med* 2004;199:271-281.
159. Wucherpfennig KW. Presentation of a self-peptide in two distinct conformations by a disease-associated HLA-B 27 subtype. *J Exp Med* 2004;199:251-254. commentary
160. Duchmann R, Lambert C, May E, Höuler T, Märker-Hermann E. CD 4+ and CD8+ clonal T expansions indicate a role of antigens in ankylosing spondylitis, a study in HLA-B27+ monozygotic twins. *Clin Exp Immunol* 2001;123:315-322.

161. Dulphy N, Peyrat MA, Tieng V. Common intra-articular T cell expansion in patients with reactive arthritis: identical beta-chain functional sequences and cytotoxicity toward HLA- B 27. *J Immunol* 1999; 182: 3830-39.
162. May E, Dulphy N, Frauendorf E, Duchamann R, Bowness P, López de Castro JA, Toubert A, Märker-Hermann. Conserved β chain usage in reactive arthritis, evidence for selection by a putative HLA-B 27 associated autoantigen. *Tissue Antigens* 2002,60:299-308.
163. Alvarez I, López de Castro JA. HLA-B 27 and immunogenetics of spondyloarthropathies. *Curr Op Rheumatol* 2000; 12:248-53.
164. Khare SD, Lee M, Bull J, Hanson H, Luthra S, David CS. Spontaneous inflammatory disease in HLA-B 27 transgenic mice does not require transporter of antigens peptides. *Clin Invest* 2001;98:364-71.
165. Boyle LH, Goodall JC, Opat SS, Gaston JSH. The recognition of HLA-B27 by Human CD4+ T Lymphocytes. *J Immunol* 2001;167:2619-24.
166. Boyle LH, Gaston JSH. Breaking the rules: the unconventional recognition of HLA-B 27 by CD4+T lymphocytes as an insight into the pathogenesis of the spondyloarthropathies. *Rheumatol* 2003;42: 404-12.
167. Boyle LH, Goodall JC, Gaston JSH. Major Histocompatibility Complex Class I restricted alloreactive CD4+ T cells. *Immunology* 2004;112:54-63.
168. Roddis M, Carter R, Sun MY, Weissenteiner T, McMichael AJ, Bowness P, Bodmer HC. Fully Functional HLA B 27-Restricted CD4+ as well as CD8+ T cell responses in TCR transgenic mice. *J Immunol* 2004;172:155-61.
169. Reinelt S, Dedier S, Asuni G. Mutation of Cys 67 alters the thermodynamic stability of the human leukocyte antigen HLA-B*2705. *J Biol Chem* 2001;276:18472-18477.
170. Alvarez I, Marti M, Vázquez J: The Cys residue of HLA- B 27 influences surface stability peptide specificity and T cell antigens Presentation. *J Biol Chem* 2001;276:48740-47.

171. . Turner MJ, Colbert RA. HLA-B 27 and Pathogenesis of Spondyloarthropathies. *Curr Op Rheumatol* 2002;14:367-72.
172. Welan MA, Archer JR. Chemical reactivity of an HLA-B27 thiol group. *Eur J Immunol* 1993;23:3278-3285.
173. Gao XM, Wordsworth P, McMichael. Homocysteina modification of HLA antigens and its immunological consequences. *Eur J Immunol* 1996;26:1443-1450.
174. Chilvers MM, Wordsworth P, Stubbs A, Gao XM. TCR usage by homocysteina-specific human CTL. *J Immunol* 1998;160:3737-3742.
175. Allen RL, O'Callaghan CA, McMichael AJ, Bowness P. Cutting edge: HLA-B 27 can form a novel beta-2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure. *J Immunol* 1999;162:5045-48.
176. Scotet E, Peyrat MS Saulquin X. Frequent enrichment for CD 8+T cells reactive against common herpes viruses in chronic inflammatory lesions : towards reassessment of the physiopathological significance of T cell clonal expansions found in autoimmune inflammatory processes. *Eur J Immunol* 1999;29:973-985.
177. Colbert RA. HLA-B 27 misfolding: a solution to the spondyloarthropathy conundrum? *Mol Med Today* 2000;6:224-230.
178. Allen RL, Raine T, Haude A, Trowsdale J, Wilson M. Cutting Edge : Leukocyte Receptor Complex Encoded Immunomodulatory Receptor Show Differing Specificity for alternative HLA-B 27 Structure. *J Immunol* 2001;167:5543-47.

179. Kollnberger S, Bird L, Sun MY, Retiere C, Braund VM, McMichael A, Bowness P. Cell-Surface Expression and Immune Receptor Recognition Of HLA-B27 Homodimers. *Arthritis Rheum* 2002;46:2972-82.
180. Kollnberger S, Bird L, Roddis M, Hacquard-Bounder C, Kubagawa H, Bodmer HC, BrebanM, McMichael A, Bowness P. HLA B 27 Heavy Chain Homodimers are Expressed in HLA B-27 Transgenic Rodent Models of Spandylarthritis and are Ligands for Paired Ig-Like Receptors. *J Immunol* 2004;173:1699-1710.
181. Mear JP, Schreiber KL, Münz C, Zho X, Stevanović S, Rammensee HG, Rowland-Jones SL, Colbert RA. Misfolding of HLA-B 27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies . *J Immunol* 1999;163:6665-70.
182. Dangoria NS, DeLay ML, Kingsbury Dj, Mear JP, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, Colbert RA. HLA- B27 Misfolding is Associated with Aberrant Intermolecular Disulfide bond Formation (Dimerization) in the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Che* 2002;277.23459-468.
183. Colbert RA The Immunobiology of HLA-B 27: Variatios on a Theme. *Curr Mol Med* 2004;4:21-30.
184. Sims AN, Wordsworth P, Brown MA: Genetics Susceptibility to Ankylosing Spondylitis. *Curr Mol Med* 2004;4:13-20.
185. Robinson WP, Khan MA, Rentsch HU, Cats A, Russell A, Thomson G. HLA-Bw60 increases susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA-B27+ patients. *Arthritis Rheum* 1989;32:1135-41.
186. Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ, Darke C, Duncan E, Shatford JL, Taylor A, Calin A, Wordsworth. Susceptibility to ankylosing spondylitis in

- twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum* 1997;40:1823-28.
187. Wei JC, Tsai WC, Lin HS, Chou CT. HLA-B 60 and B61 are strongly associated with ankylosing spondylitis in HLA-B 27 negative Taiwan Chinese patients. *Rheumatology* 2004;43:639-42
188. Falk K, Rotzschke O, Takiguchi M. Peptide motifs of HLA B 38 y B 39 molecules. *Immunogenetics* 1995;41:162-164.
189. Sabao y, Tsuchiya N, Takiguchi M, Tokunaga K. Overlapping peptide-binding specificities of HLA-B27 and B39. . *Arthritis Rheum* 1999;42:178-81
190. Yamaguchi A, Tsuchiya N, Mitsu H, Shiota M, Ogawa S, Tokunaga K, Yoshinoya S, Ito K. Association of HLA B 39 with HLA-B27-negative ankylosing spondylitis and pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis in Japanese patients: evidence for a role of the peptide anchoring b pocket. *Arthritis Rheum* 1995;38:1672-77.
191. Crivellato E, Zacchi T. HLA- B 39 and axial type of psoriatic arthritis. *Acta Derm Venerol (Stockh)* 1987;67:249-250.
192. Gladman DD; Farewel VT. The role of HLA antigens as indicators of disease progresión in psoriatic arthritis. Multivariate relative risk model. *Arthritis Rheum* 1995; 38 845-50.
193. Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twin: the role of genes HLA, and the environment. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1823-28.

194. Brown MA, Kennedy LG, Darke C, Gibson K, Shatford JL, Taylor A, Worsdwoert. The effect of HLA-DR genes on susceptibility to and severity of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1998;41:460-65.
195. Plosky R, Flato B, Odd V, Mksymowych W, Oystein F, Thorsby E. Association to HLA-DP*08, HLA-DP1*0301 and homozygosity for an HLA-Linked Proteasome Gene in juvenile Ankylosing Spondylitis *Human Immunol* 1995;44:88-96.
196. Roussomoustakaki M, Satsangi J, Welsh K. Genetics markers may predict disease behaviour in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997;112:1845-53.
197. Orchard TR, Thiyagaraja S, Welsh KI, Wordsworth BP, Welsh KL, Gaston JS, Jewell DP: Clinical phenotype is related to HLA genotype in the peripheral arthropathies of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000;118:274-8.
198. Brown MA, Crane AM, Wordsworth BP: Role of HLA genes in familial spondyloarthropathy. *Ann Rheum Dis* 2002;61:764-65.
199. Taurog JD. HLA-DR 4 and the spondyloarthropathies. *Ann Rheum Dis* 2002;61:193-94.
200. Said-Nahal R, Miceli-Richard C, Berthelot JA, Dernis-Labous ADE, Le Blevéc G, Sarauz A, Perdriger A, Guis S, Claudepierre P, Sibila J, Amor B, Dougados M, Breban M. The familial form of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 2000;43:1356-65.

201. Said-Nahal R, Miceli-Richard C, Gautreau C, Tamaouza R, Barot N, Porcher R, Charron D, Dougados M, Breban M. The role of HLA genes in familial spondyloarthritis: a comprehensive study of 70 multiplex families. *Ann Rheum Dis* 2002;61:201-206.
202. Miehle W, Shattenkirchner M, Albert D, Bunge M. HLA-DR 4 in spondylitis ankylosing with different patterns of joint involvement. *Ann Rheum Dis* 1985;44:39-44.
203. Tuokko J, Reijonen H, Llonen J. Increase of HLAB1*0408-DQB1*0301 in HLA-B 27 positive reactive arthritis. *Ann Rheum Dis* 1997;56:37-41.
204. Brown MA, Crone AM, Wordsworth BP. Role HLA genes in familial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 2002;61:764-765.
205. Milicic A, Lindheimer F, Laval S: Interethnic studies of TNF polymorphism confirm the likely presence of a second MHC susceptibility locus in ankylosing spondylitis. *Genes Immunol* 2000,1:418-422.
206. Gonzalez S, Torre-Alonso JC, Martinez-Borra. TNF-238 a promoter polymorphism contributes to susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA-B27 negative patients. *J Rheumatol* 2001;28:1288-93.
207. Tsuchiya N, Shiot M, Moriyama S, Ogawa A, Komatsu-Wakui M, Mitsui H, Geraghty DE, Tokunaga K. MICA allele typing of HLA-B 27 positive Japanese patients with seronegative spondylarthropathies and healthy individuals. *Arthritis Rheum* 1998;41:68-73.
208. Martinez-Borra J, Gonzalez s, López-Vazquez A, Gelaz MA, Bruges-Armas J, Kanga U, Mehra NK, López-Larrea C. HLA-B 27 Alone Rather than B

- 27-Related Class I Haplotypes Contributes to Ankylosing Spondylitis
Susceptibility. *Human Immunol* 2000;61:131-39.
209. Westman P, Partnanen J, Leirisalorepo M, Koskimies S. HSP 70-Homom, NcoI polymorphism and HLA-associations in the Finnish population and in patients with ankylosing spondylitis or reactive arthritis. *Eur J Immunogenet* 1994;21:81-90.
210. Fraile A, Nieto A, Mataran I, Martin J. HSP 70 gene polymorphism in ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 1998;51:382-5.
211. Brown MA, Wordsworth BP, Reveille JD. Genetics of ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 2002,20(Suppl 28):S43-S49.
212. Maksymowych W, Gorodezky C, Olivo A, Alaez C, Wong C, Burgos-Vargas R, Sanchez-Corona J, Ramos-Remus C, Russell A. HLA-DRB1*08 Influences the Development of Disease in Mexican Mestizo with Spondyloarthritis. *J Rheumatol* 1997;24:904-7.
213. Vargas-Alarcón G, Garcia A, Bahena S, Melin-Aldana H, Andrade F, Ibañez G, Alcocer-Varela J, Alarcón-Segovia D, Granados J. HLA-B alleles and haplotypes in Mexican patients with seronegative spondyloarthropathies. *Ann Rheum Dis* 1994;53:755-58.
214. Maksymowych W, Gorodezky C, Gian S, Luong M, Wong C, Burgos-Vargas R, Morenot M, Sanchez-Corona J, Ramos-Remus C, Russell AS. The LMP 2 polymorphism is associated with susceptibility to acute anterior uveitis in HLA-B27 positive juvenile and adult Mexican subjects with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1997;56:499-92.

215. Maksymowych W , Suarez-Almazor M, Chou CT, Rusell AS.
Polymorphism in the LMP 2 gene influences susceptibility to extraespinal disease in HLA-B 27 positive individuals with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1995;54:321-324.
216. Maksymowych W ,Sha T, Vaile J, Suarez-Almazor M, Chou CT, Ramos-Remus C, Rusell AS. LMP 2 Polymorphism is associated with extraespinal disease in HLA-B 27 negative Caucasian and Mexican mestizo patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 2000;27:183-89.
217. Vargas-Alarcón G, Gamboa R, Zuñiga J, Fragoso JM, Hernández-Pacheco G, Londoño J, Pacheco-Tena C, Cardiel MH, Granados J, Burgos-Vargas R. Association study of LMP Gene polymorphism in Mexican patients with Spondyloarthritis. *Human Immunol* 2004;65:1437-42.
218. Vargas-Alarcón G, Londoño J, Hernández-Pacheco G, Gamboa R, Castillo E, Pacheco-Tena C, Cardiel MH, Granados J, Burgos-Vargas R. . *Ann Rheum Dis* 2002;61:48 51.
219. Brown MA, Pile KD, Kennedy LG, Campbell D, Andrew L, March R, Shaffold JL, Weeks DE, Calin A, Wordsworth BP. A genoma-wide screen for susceptibility loci in Ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1998;41:588-95
220. Brown MA, Laval SH, Broby S, Callin A. Recurrence risk modelling of the genetics susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2000;59:883-86.
221. Laval SH, Timms A, Edwards S, Bradbury L, Brophy S, milicia A, Rubin L, Siminovitich KA, Brown MA. Whole genoma screening in Ankylosing

- Spondylitis: Evidence of Non-MHC Genetic-Susceptibility Loci. *Am J Hum Genet* 2001;68:918-26.
222. Karason A, Gudjonsson JE, Upmanyu R, Aritonsdottir AA, Acusón VB, Runasdottir EH, Valdmarsson H, Gulcher JR. *Am J Hum Genet* 2003;72:125-31.
223. Brophy S, Hamersma J, Bradbury L, Timms A, Edwards S, Laval S, Cardon L, Brown MA. *Rheumatol* 2001;40:17.
224. Miceli-Richard C, Zouli H, Said-Nahal R, Lesage S, Merlin F, Dougados M, Thomas G, Breban M, Hugot JP, GFEGS. Significant linkage to spondyloarthritis on 9q31-34. *Hum Mol Genet* 2004;13:1641-48.
225. Hamersma J, Cardon LR, Bradbury L, Brophy, Calin A, Brown MA. Is Disease Severity in Ankylosing Spondylitis Genetically Determined? *Arthritis Rheum* 2001;44:1396-1400.
226. Brown MA, Brophy S, Bradbury L, Hamersma J, Timms A, Laval S, Cardon L, Calin A, Wordsworth P. Identification of Major Loci Controlling Clinical Manifestations of Ankylosing Spondylitis *Arthritis Rheum* 2003;48:2234-39.
227. Sims AM, Wordsworth P, Brown MA: Genetic Susceptibility to Ankylosing Spondylitis. *Curr Mol Med* 2004;4:13-20.
228. Hoyle E, Laval SH, Calin A, Wordsworth P, Brown MA. The X-Chromosome and susceptibility to Ankylosing Spondylitis *Arthritis Rheum* 2000;43:1353-55.

229. Lisker R, Pérez-Briceño R, Granados J, Babinsky V, DeRubens J, Armendarces S, Buentello L. Gene frequencies and admixture estimates in a Mexican City population. *Am J Physical Anthropol* 71 : 203-207, 1986.
230. Lisker R, Pérez-Briceño R, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in the State of Puebla, Mexico. *Am J Physical Anthropol* 76 : 331-335, 1988.
231. Lisker R, Ramirez E, Pérez-Briceño R, Granados J, Babinsky V. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican Urban Centers. *Hum Biology* 62 : 791-801, 1990.
232. Lewontin RC. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics* 1964;49:49-67.
233. Excoffier L., Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* 1995;12:921-927.
234. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 1988;16:1215.
235. Voorter CEM, Vlies van der SA, Berg van den-Loonen EM, Sequence based typing of HLA-B. *Tissue Antigens* 2000;56:356-62.
236. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative no serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantations. *Tissue Antigens* 1992;39:225.

237. Olerup O, Aldener A, Fogdell A: HLA-DQ B1 and HLA-DQ A1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in two hours. *Tissue Antigens* 1993;1:119-34.
238. Inoko H, Ota M. PCR-SSP. In Hui KM, Bidwell JL, eds *Handbook of HLA typing Techniques* Boca Raton: CRC Press, 1993, 9-70.
239. Bunce M, Taylor CJ, Welsh KI. Rapid HLA-DQB typing by eight Polymerase Chain Reaction amplifications with Sequence-Specific Primers (PCR-SSP). *Hum Immunol* 1993;37:201-206.
240. Forre O, Dobloug JH, Hoyerl HM. HLA-antigens in juvenile arthritis. Genetics basis for the different subtype. *Arthritis Rheum* 1983; 26:35-38.
241. Mielants H, Veys EM, Cuvalier C, De Vas M, Goemaere S, De Clercq L. The evaluation of spondyloarthropaties in relation to gut history. I Histological aspects *J Rheumatol* 1995;22:2273-78.
242. Yagüe J, Ramos M, Vázquez J, Mariana A, Albar JP, López de Castro JA. The South Amerindian allotype HLA-B*3903 has the largest know in peptide specificity and common natural ligand with HLA-B27. *Tissue Antigens* 1999;53:227-236.

XI. TABLAS

TABLA 1. ESPECTRO CLINICO DE LAS ESPONDILOARTROPATIAS DE INICIO JUVENIL.

ESPONDILOARTRIPATIA	RASGOS CLINICOS
Artritis aislada	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Usualmente oligoarticular afecta ≤ 5 articulaciones de las extremidades inferiores, preferentemente en rodilla.
Entesitis aislada	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se presenta en uno o varios sitios de los miembros inferiores (fascia plantar, el tendón de Aquiles en el calcáneo, la tuberosidad anterior de la tibia, el trocánter mayor y el tarso son las más afectadas.
Síndrome de SEA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Entesopatía y Artropatía ▪ Factor Reumatoide y Anticuerpos-antinucleo negativos ▪ Predominantemente afecta el pie ▪ Progreso de oligo a poliartritis ▪ Frecuentemente presencia de HLA-B27
EaJ	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Síndrome de SEA ▪ Oligoartritis de miembros inferiores en los primeros 6 meses, progresando a poliartritis en un lapso de 12 meses después del inicio. ▪ Osteopenia generalizada y disminución de los espacios articulares, progresión de la anquilosis (tarso preferentemente). ▪ Dolor persistente y/o rigidez sacroiliaca,

	<p>lumbar y con menos frecuencia crestas ilíacas, y se limita la expansión del tórax.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ En el 15% de los pacientes existe involucramiento axial tempranamente ▪ En el 5-10% de los pacientes tienen síntomas constitutivos de enfermedad activa (Fiebre, pérdida de peso, debilidad y artropatía, fátiga, nódulos linfáticos enlargement, leucocitosis y anemia.
APsJ	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inicia frecuentemente con oligoartritis más frecuentemente de rodilla , ankles , pie y mano progresando a poliartritis en extremidades inferiores. ▪ Cambios radiograficos usualmente consistentes con osteopatía y estrechamiento de los espacios articulares. ▪ Sacroiliitis y síntomas axiales sólo en algunos casos. ▪ Entesitis afecta the lower limb ▪ Asociado con HLA-B27
IBD asociada EaJ	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Artritis periférica que coincide con síntomas gastrointestinales ▪ Evoluciona a EAJ.

ARe	<ul style="list-style-type: none"><li data-bbox="906 191 1349 464">▪ Inicia con un infección bacterial gastrointestinal o genitourinario para en un lapso promedio de 4 semanas desarrolla Oligoartritis y entesitis de las extremidades inferiores.<li data-bbox="906 495 1284 527">▪ Alta prevalencia de HLA B-27.
-----	---

LOCUS HLA-A*	GRUPO PACIENTES EaJ JUVENIL N=66	GRUPO CONTROL N=99
01	0.01 *	0.075
02	0.40	0.340
03	0.005 *	0.060
23	0.02	0.015
24	0.15	0.146
26	0.03	0.045
66	0.005	0
11	0.06	0.045
68	0.16	0.21
69	0	0.045
29	0.035	0
30	0.035	0.023
31	0.133	0.071
32	0.015	0.025
33	0.005	0.025
74	0.005	0

* = p < 0.05
** = pc < 0.05

Tabla 2. Frecuencias génicas de alelos del locus HLA-A, en pacientes con EaJ y los controles sanos.

LOCUS HLA-B	GRUPO PACIENTES EaJ JUVENIL N=66	GRUPO CONTROL N=99
51	0.05	0.070
52	0.015	0.020
07	0.015 *	0.060
08	0.005	0.035
44	0.015 *	0.080
45	0	0.005
13	0.005	0.020
14	0.015 *	0.070
15	0.14	0.060
38	0	0.010
39	0.11	0.136
57	0.005	0.015
18	0	0.035
55	0	0.005
27	0.52 **	0.020
35	0.11	0.131
37	0.005	0.005
40	0.015	0.101
47	0.005	0
48	0.02	0.010
53	0.005	0

* = p < 0.05

** = pc < 0.05

Tabla 3. Frecuencias génicas de alelos del locus HLA-B en pacientes con EaJ y controles sanos.

LOCUS HLA DRB1	GRUPO PACIENTES EaJ JUVENIL N=66	GRUPO CONTROL N=99
01	0.11	0.05
02	0.05	0.09
03	0.05	0.05
04	0.25	0.27
05	0.05 *	0.12
06	0.27	0.19
07	0.04	0.11
08	0.22	0.18
09	0	0.01
10	0	0.005

* = p < 0.05
** = pc < 0.05

Tabla 4. Frecuencias génicas de alelos del locus HLA-DR en pacientes con EaJ y controles sanos.

LOCUS HLA-A	EA JUVENIL N=45	Ea- no dif JUVENIL N=21	CONTROL N=99
01	0.025	0	0.075
02	0.37	0.48	0.340
03	0	0.02	0.060
23	0.01	0.04	0.015
24	0.16	0.14	0.146
26	0.025	0.04	0.045
66	0	0.02	0
11	0.06	0.06	0.045
68	0.16	0.17	0.21
69	0	0	0.045
29	0.04	0.04	0
30	0.05	0.02	0.023
31	0.16	0.10	0.071
32	0.02	0	0.025
33	0	0.02	0.025
74	0.01	0	0

TABLA 5. Frecuencias génicas de alelos del locus HLA-A, en pacientes con EAJ y

Ea no dif comparados con el grupo control sanos.

LOCUS HLA-B	EA JUVENIL N=45	Ea no dif JUVENIL N=21	CONTROL N=99
51	0.08	0.02	0.70
52	0.02	0	0.020
07	0.01	0.02	0.060
08	0.01	0	0.035
44	0.01 *	0.02	0.080
45	0	0	0.005
13	0.01	0	0.020
14	0.01 *	0.02	0.070
15	0.13	0.076	0.060
38	0	0	0.010
39	0.12	0.10	0.136
57	0	0.02	0.015
18	0	0	0.035
55	0	0	0.005
27	0.57 **	0.42 **	0.020
35	0.08	0.183	0.131
37	0.01	0	0.005
40	0.01	0.02	0.101
47	0.01	0	0
48	0.01	0.06	0.010
53	0.01	0	0

* = p < 0.05

** = pc < 0.05

TABLA 6. Frecuencias génicas de alelos del locus HLA-B, en pacientes con EAJ y

Ea no dif comparados con el grupo control sano.

LOCUS HLA-DRB1	EA JUVENIL N=45	Ea no dif JUVENIL N=21	CONTROL N=99
01	0.092	0.127	0.05
02	0.05	0.10	0.09
03	0.05	0.06	0.05
04	0.30	0.16	0.27
05	0.057 *	0.048	0.12
06	0.28	0.29	0.19
07	0.04	0.06	0.11
08	0.28	0.20	0.18
09	0	0	0.01
10	0	0	0.005

* = p < 0.05

** = pc < 0.05

TABLA 7. Frecuencias génicas de alelos del locus HLA-DRB 1, en pacientes con EAJ y

Ea no dif comparados con el grupo control sano.

ALELO	EAJ n=45 n (fg)	Ea no diferenciada n=21 n(fg)	Total n=66 n(fg)	Control Sanos n=99 n(fg)
B 27	37 (0.578)* RR=67.42 FE=57%	14 (0.422)* RR=35.77 FE=41%	51 (0.520)* RR=53 FE=51%	4 (0.020)
B 15	10 (0.130)	4 (0.096)	14 (0.140)	12 (0.060)
B44	1 (0.011)* RR=0.13	1 (0.023)	2 (0.015)* RR=0.17	16 (0.080)
B14	1 (0.011)	1 (0.023)	2 (0.015)* RR= 0.20	14 (0.070)
DR 1	8 (0.092)	5 (0.127)	13 (0.110)	10 (0.050)
DR 5	5 (0.057)*	2 (0.048)	7 (0.05)*	23 (0.120)

*pC<0.05 versus grupo Control

*p <0.05 versus grupo Control

RR= Riesgo relativo

AF = Fracción Etiológica (%).

TABLA 8. Alelos relevantes del HLA clase I y II en los subgrupos de pacientes, comparadas con el grupo control.

XII. ANEXOS

ANEXO 1

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Lugar y Fecha: _____
Por medio de la presente autorizo que mi _____
Participo en el proyecto de investigación titulado: _____
Registrado ante el Comité Local de Investigación en Salud con el número: _____
El objetivo del estudio es: _____
Se me ha explicado que mi participación consistirá en: _____
Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:
El investigador principal se ha comprometido a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento (en caso de que el proyecto modifique o interfiera con el tratamiento habitual del paciente el investigador se compromete a dar información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento)
Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto.
El investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque ésta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia de mi representado(a) en el mismo.

Nombre y firma de ambos padres o Tutores o el representante legal.

Testigos: