

Determinación de los alelos HLA clase I y II en mestizos mexicanos con artritis reumatoide

Elizabeth López Morales,* Fernando Vidal Saucedo,* Rosa María Núñez Farfán,*
Víctor Piña Olvera,* Gustavo Lugo Zamudio,** María de los Dolores Delgado Ochoa*

RESUMEN

Introducción. La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad que afecta a una o más articulaciones de forma progresiva e incapacitante. La patogénesis de la AR se asocia a moléculas involucradas en la inflamación y a los antígenos leucocitarios del humano (HLA). El HLA se clasifica en tres: clase I, que se divide en HLA-A, HLA-B; clase II, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ; y la clase III, integrada por genes que intervienen en la cascada de complemento (C1-C6) y el TNF. La asociación entre el HLA y la AR se manifiesta como el resultado sinérgico de condiciones ambientales, nutricionales y genéticas. **Material y métodos.** A partir de sangre periférica, se determinaron los fenotipos HLA de los pacientes. La amplificación de los productos de PCR se realizó utilizando el método por polimorfismo de cadena sencilla (SSP) y para su visualización se efectuó corrimiento electroforético gel de agarosa a 2%, teñido con bromuro de etilo. **Resultados.** Se analizaron los alelos HLA clase I y II, por medio del método SSP (polimorfismo de cadena sencilla) partiendo de una confianza de 95%, en una N de 30; se encontró que los antígenos HLA presentan mayor desarrollo de la AR y otras artropatías; la determinación molecular por frecuencia fue: A*01010101, B*14020104, B*510101-03/05 y DRβ1*04010101. **Conclusiones.** Los alelos HLA frecuentes como el DRβ1*04010101 y el B*14020104, se relacionan de forma directa con el desarrollo de la AR y otras artropatías, por lo que realizar su determinación molecular es de gran ayuda como prueba auxiliar en el diagnóstico, y contribuye al entendimiento filogenético de la enfermedad y su relación en nuestra población.

Palabras clave: Artritis reumatoide, mestizos, polimorfismo de cadena sencilla (SSP).

ABSTRACT

Introduction. The rheumatoid arthritis (RA) is a disorder that affects one or more joints in a progressive and incapacitated way. The pathogenesis of the RA is related to the molecules involved in the inflammation and to the human leukocyte antigen (HLA). The latter is classified into three types: the type I is divided in HLA-A and HLA-B; the type II, HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, and the type III is formed by genes that take part in both, the complement pathway (C1-C6) and the TNF. The association between the HLA and the RA becomes evident in the synergic result of the environmental, nutritional and genetic conditions. **Material and methods.** The HLA phenotypes of the patients were determined by peripheral blood. The product amplification of PCR has been done using the Sequence Specific Primers method (SSP). For the visualisation was carried out an electrophoresis of agarose gel of 2% with an ethidium bromide staining. **Results.** The HLA alleles type I and II were analysed through a SNP (single-nucleotide polymorphism) method that has a 95% of effectiveness, within an N of 30. It was found that the HLA antigens more frequent were: A*01010101, B*14020104, B*510101-03/05 and DRβ1*04010101. **Conclusions.** The frequent HLA alleles, as the DRβ1*04010101 and the B*14020104, are directly related to the development of RA and other arthropathies, so having their molecular determination is helpful as an auxiliary for the diagnosis and also contributes to the phylogenetic understanding of the disorder, as well as their relation in the population.

Key words: Rheumatoid arthritis (RA), Sequence Specific Primers (SSP).

INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónico-degenerativa que involucra procesos autoinmunes; afecta a

las articulaciones de mayor movilidad de forma progresiva y ocasiona incapacidad del área afectada, originando cambios físicos y radiológicos. La etapa crónica de la AR se inicia en la tercera década de la vida; es, sin embargo, en la segunda y cuarta década cuando pueden manifestarse cuadros agudos de AR.¹

La AR afecta tanto a hombres como a mujeres –las más afectadas, ya que por cada hombre con AR hay tres muje-

* Laboratorio de Histocompatibilidad, Hospital Juárez de México.
** Adscrito al Servicio de Reumatología, Hospital Juárez de México.



res—; en ellas se observa un deterioro mayor de las articulaciones y ataque al estado general.²

La etiología de la AR es multifactorial e involucra factores genéticos, infecciosos, hormonales y ambientales.³ La AR se considera una enfermedad autoinmune ya que se generan anticuerpos dirigidos contra el propio organismo llamados auto anticuerpos.⁴ Debido a que el sistema inmune está comprometido en la AR, el diagnóstico clínico se realiza con ayuda de pruebas de laboratorio como: factor reumatoide, proteína C reactiva, antiestreptolisinas, estudios radiológicos y determinación del Complejo Mayor de Histocompatibilidad/Antígenos Leucocitarios del Humano (CMH /HLA).⁵

El HLA se encuentra presente en la superficie de las células y se compone de proteínas intramembranales que tienen como función principal el reconocimiento de antígenos.^{6,7}

El HLA se localiza en una región conservada del genoma y reúne a un conjunto de genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6p21.3 del humano con un tamaño de aproximadamente 4 100 Kb.⁸

El HLA se divide en clase I, clase II y clase III.⁹ Se hereda de forma mendeliana de padres a hijos, convirtiéndose en la piedra angular de la teoría de ancestros comunes para el hombre. Debido a esta relación filogenético, la tipificación del HLA se utiliza para la asignación exitosa en el trasplante de órganos, ya que es un requisito indispensable la compatibilidad del donador/receptor.¹⁰

El desarrollo de AR se relaciona con la presencia de los alelos HLA, pues en la evolución clínica de la AR se involucran alelos A, B, DR, DQ Y DP, además de otros genes como el TNF β (localizado en la fracción III del HLA) y la IL-11 involucrada en procesos autoinmunes característicos de la AR,¹¹ además de que otras moléculas como la interleucina 11 (IL-11) se encuentran presente en los procesos inflamatorios como los encontrados en pacientes con AR; sin embargo, son los alelos clase I y II los que mayor asociación tienen con la AR,¹² por lo que su evaluación es importante, tanto para el manejo clínico como para el estudio ontogénico de la AR, ya que son pocos los estudios realizados en la población.

El desarrollo de la AR es multifactorial por lo que se le asocia frecuentemente con la teoría de que un péptido bacteriano o viral llamado péptido artrogénico,¹³ que es mostrado por las células presentadoras de antígeno (CPA), desencadena la respuesta de linfocitos T citotóxicos (TCL) e induce el daño tisular e inflamación articular característica de los enfermos con AR.¹⁴⁻¹⁶

MATERIAL Y MÉTODOS

La determinación de los fenotipos HLA se realizó a partir de una muestra de sangre periférica de cada integrante del estudio que aceptó participar previa firma del consen-

timiento informado. La extracción del DNA λ se realizó por medio de la precipitación salina del DNA, en donde se cuantificó pureza, concentración, por espectrofotometría, la integridad del DNA obtenido se realizó visualizando el DNA λ por corrimiento electroforético en geles de agarosa a 1% teñidos con bromuro de etidio.

La población estudiada estuvo integrada por hombres y mujeres de los 20 a los 60 años de edad, en donde el mayor grupo correspondió al de mujeres (19) con 63% y una frecuencia menor de hombres (11) con 37%.

Para la determinación de los alelos A, B, DR y DQ, se utilizaron oligonucleótidos específicos, tanto para los alelos HLA, como para los controles internos de reacción, la amplificación de los productos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se realizó utilizando el método de polimorfismo de cadena sencilla (SSP).

Para la visualización de los productos de PCR, se realizó por corrimiento electroforético gel de agarosa a 2% teñido con bromuro de etidio, utilizando en el corrimiento un marcador de peso de 50 a 250 pb.

El descarte y asignación de los alelos HLA, encontrados en las muestras evaluadas se realizó por medio del software Dolphin doc^(MR).

Criterios de inclusión

Pacientes diagnosticados con AR, referidos del Servicio de Reumatología del Hospital Juárez de México, con previa firma del consentimiento informado y que desearan participar en el estudio.

Criterios de exclusión

Pacientes diagnosticados y referidos, que no quisieron participar, pacientes que no firmaron el consentimiento informado, y pacientes que no se presentaron a la toma de muestra.

Consideraciones

La población estudiada se identificó por medio de la constante de Hardy-Weinberg, que mostró que la muestra no tenía un comportamiento endogámico.

La evaluación estadística se realizó a partir de un índice de confianza de 95%, se utilizaron los grados de probabilidad encontrados en la población de estudio y su relación con la AR, reportada en distintas publicaciones.¹⁷⁻¹⁸

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se distribuyeron en tablas de contingencia, para los alelos clase I y II, a partir de las



cuales se realizó el análisis de los alelos encontrados en la población de estudio (Cuadros 1 y 2).

DISCUSIÓN

HLA clase I

Los alelos más comunes para el HLA-A fueron: A*020101/50/70, A*31010201, A*240201020103, A*250101010.

El alelo A*020101 es frecuente en la población mexicana, por lo que encontrarlo de forma habitual en la población de estudio, demuestra su relación con los mestizos mexicanos.

Los alelos HLA-B, mostraron una mayor variabilidad alélica: B*1402010101, B*510101010305, B*150104, B*400102.

La descripción de los alelos clase I del HLA se ha realizado con anterioridad tratando de evidenciar la frecuencia de estos alelos con el desarrollo de enfermedades como la AR y otras artropatías como en el caso de la espondilitis anquilosante.¹⁹

La determinación en la población de estudio, evidenció la presencia de alelos que comúnmente es-

tán involucrados en procesos inflamatorios y autoinmunes.²⁰

Estas asociaciones evidencian la importancia de conocer la filogenia de la población, para que este entendimiento contribuya al estudio de enfermedades cada vez más frecuentes en los mexicanos.

La filogenia de la población abarca genes relacionados con poblaciones amerindias, caucásicas, asiáticas, africanas, las cuales convergen en territorio nacional, de forma cada vez menos evidente.

HLA Clase II

El alelo DRB1*04 es el que muestra variabilidad genética. Los alelos DRB1*04, DRB1*14, DRB1*16, DRB1*02, y DRB3*04, son característicos de poblaciones amerindias y se relacionan con el origen asiático de los asentamientos americanos.²¹

El DRB1*04 y sus variantes son frecuentes y se relacionan con el desarrollo de enfermedades como la AR, tanto en la población estudiada, como en otras poblaciones, lo que genera que el DRB1*04, sea determinante como factor de riesgo en la población mestiza mexicana.

Cuadro 1. Distribución de los alelos HLA clase I, con mayor presencia en el estudio.

HLA-A		HLA-B	
12	A*020101/50/70	14	B*1402010101
4	A*03010101010104	5	B*510101010305
4	A*24020201-06010	2	B*350101010202
3	A*30010101010101	2	B*390101010101
3	A*3101020101	2	B*4001020201
1	A*3301030102	2	B*070101010205
1	A*1010101010109	1	B*27010203
1	A*1104/19	1	B*150104
1	A*250101010101	1	B*150221

Cuadro 2. Distribución de los alelos HLA clase II, con mayor presencia en el estudio.

HLA-DR		HLA-DQ	
9	DRB1*04010101	6	DQB1*03010016
4	DRB1*1402030104	5	DQB1*030201
4	DRB1*01010102	5	DQB1*03020104
3	DRB1*040101011	5	DQB1*0501010101
3	DRB1*11020103	5	DQB1*04AD
3	DRB2*01012102	2	DQB1*0601010101
2	DRB3*010104019	2	DQB1*02010101014
1	DRB2*01010102		
1	DRB3*1104/19		



CONCLUSIONES

El estudio del HLA está dirigido a una práctica médica de apoyo al diagnóstico, ya que se considera que la determinación del HLA, favorece y complementa el diagnóstico de AR, en pacientes de difícil diagnóstico.

Las variaciones genéticas en la población (mestiza-mexicana) estudiada, en adición con los alelos HLA expresados y los factores de riesgo sinérgico, como las infecciones (AR+ HLA) son los probables responsables de la presencia de la AR.

Debido a que las enfermedades inflamatorias y autoinmunes son cada vez más frecuentes en los mexicanos, existe obligación de contribuir en el estudio y determinación del fenotipo de la población nacional, con el propósito de favorecer el tratamiento de los pacientes con AR.

Con el objetivo de complementar este estudio, se trabaja en la relación de casos y controles a nivel molecular, para relacionar de una forma más amplia a la población.

REFERENCIAS

- Lugo ZG. El paciente reumático. México: Ed. Europa Press; 2009: 29-31.
- Feldmann M. Patogenesis of arthritis: recent research progress. *Nature Immunology* 2001; 2(9): 771-3.
- Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423: 356-61.
- Mc Carty Daniel. Arthritis. México: Editorial Panamericana; 1987: 32.
- Ruiz RG. Fundamentos de la interpretación clínica de los exámenes de laboratorio. Ed. Panamericana; 2002, p. 139, 342, 372.
- Rodey GE. Introduction to human histocompatibility. 2nd Ed. USA: Ed. De Novo; 2000:13-37.
- Bellanti A. Inmunología. 3a Ed. México: Ed. Intercontinental; 1986, p. 62-7.
- Reguerillo R, López C, González S, Martínez E. Inmunología: Biología y Patología del sistema inmune. México: Ed. Médica Panamericana; 2002, p. 45-53, 65-72.
- Cunningham A. The structure and function of histocompatibility antigens. *Science* 1991; (2): 1555-61.
- Opelz G. HLA Analysis of kidney transplants performed in member countries of mesot. *Tran Proc* 1997; 29: 2917-19.
- Garavito G, Iglesias A, Egea E, Jaraquemada D, Martínez P. Una aproximación al significado biológico del polimorfismo del complejo mayor de histocompatibilidad: El modelo de la asociación HLA y ARJ. *Salud Uninorte. Barranquilla*; 2002; 16: 53-72.
- Falfan VR. Polimorfismos genéticos en autoinmunidad. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2004; 17(2): 126-34.
- López de Castro J. HLA-B27 y patogenia de las espondiloartropatías. En *la Génesis* 2007; 3: 117-19.
- Delgado V, Granados J, Anaya J, et al. Epidemiología genética de la artritis reumatoide: ¿Qué esperar de América Latina? *Biomédica* 2006; 26(4): 562-84.
- Yamamoto K, Granados J. El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y las enfermedades autoinmunes. *Rev Colomb Reumat* 1997; 4(1): 19-25.
- Bunce M, O'Neill CM, Barnedo, Krause P, Browning MJ, Mornis PJ, Welsh K. Phototyping: Comprehensive DNA typing for HLA A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 and DQB1 by PCR with 144 primers mixes utilising sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1995; 46(51): 355-67.
- Wodrow J, Nichol F, Zaphirouopoulos G. Antigens and rheumatoid arthritis populations. *Br Med J* 1981; 238: 1287-88.
- Domínguez C, Lorenzo N, Barbera A, Hernández V, Torres N, Nazabal M, Camacho M, et al. Caracterización de moléculas HLA II evaluación de citocinas en pacientes cubanos con AR. *Rev Cub Reumatología* 2006; VIII: 9-10.
- Sette A, Sidney J. Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism. *Immunogenetics* 1999; 50: 201.
- Feldmann M. Patogenesis of arthritis. *Recent Research Progress. Nature Immunology* 2001; 2(9): 771-73.
- Rodríguez C, Granados J, Vargas G, Cardie M. Asociación diferencial de los alelos HLA DRB1*0404 y TNF-308*2 en AR grave. *Rev Mex Reumat* 2004; 19: 11.

Solicitud de sobretiros:

Q.F.B. Elizabeth López Morales
 Av. Instituto Politécnico Nacional Núm. 5160.
 Col. Magdalena de las Salinas
 C. P. 07760, México D. F. Tel.: 5747-7684
 Correo electrónico: elyete@hotmail.com