



DETERMINACIÓN DE ALELOS HLA-DRB1 EN PACIENTES PANAMEÑOS CON ARTRITIS REUMATOIDEA SEVERA

Diana Mora¹; Orlando Montenegro² y Carlos Ramos³

¹Complejo Hospitalario Metropolitano, Dr. Arnulfo Arias Madrid.

²Schering-Plough Pharmaceuticals.

³Universidad de Panamá, Departamento de Genética y Biología Molecular.

Email: cramos@ancon.up.ac.pa

RESUMEN

Se determinó la presencia de alelos HLA-DRB1*0101 y HLA-DRB1*04 con epítotope reumatoideo en una muestra de la población panameña, formada por 50 individuos con diagnóstico positivo de artritis reumatoidea (AR) severa y 35 individuos no afectados utilizados como controles. La determinación de los alelos se efectuó mediante reacción en cadena de la polimerasa con cebadores de secuencia específica (PCR-SSP). La frecuencia de alelos con epítotope reumatoideo SE (+) en individuos con AR severa fue de 68 % y significativamente mayor ($p < 0.005$) que la observada en los individuos controles (34%). El riesgo relativo (R.R.) asociado a la presencia de estos alelos fue de 6.00. El alelo con SE (+) más frecuente en los individuos con AR severa fue HLA-DRB1*0101, con una frecuencia de 38% versus 17% en el grupo control. No se observó en pacientes panameños asociación de ninguno de los alelos HLA-DRB1*04 con la AR severa cuando se consideran de manera independiente. El único alelo que de manera independiente mostró asociación con la AR severa fue HLA-DRB1*0101, $p < 0.05$ con un R.R. de 2.96.

PALABRAS CLAVES

Artritis reumatoidea, alelos HLA-DRB1, PCR-SSP, pacientes panameños.

ABSTRACT

The presence of HLA-DRB1*0101 and HLA-DRB1*04 alleles were determined in a sample of fifty panamanian patients with severe arthritis reumatoidea and thirty five not affected individuals used as a controls. The HLA-typing was performed by

polymerase chain reaction specific sequence primer (PCR-SSP). The alleles with shared epitope SE (+) were significantly higher among patients with RA, 68 % ($p < 0.005$) than in control group (34%). The relative risk (R.R.) associated to these alleles were estimated to 6.00. The most frequently occurring SE (+) allele in RA patients was HLA-DRB1*0101 with a frequency of 38% compared to 17% of the control group. HLA-DRB1*04 alleles did not show any association with severe RA in panamanian patients. The only allele that show association with severe RA was HLA-DRB1*0101, $p < 0.05$ and R.R. =2.96.

KEYWORDS

Rheumatoid arthritis, HLA-DRB1 alleles, PCR-SSP, panamenian patients.

INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoidea (AR) es una enfermedad multifactorial compleja, en la que factores innatos de susceptibilidad desempeñan un papel crucial (Maini et al., 1995). La enfermedad afecta principalmente las articulaciones y los tejidos circundantes pero también puede afectar otros sistemas de órganos. Las articulaciones de las muñecas, los pies, y los dedos de las manos son generalmente las más afectadas. La deformación de las articulaciones como resultado de la destrucción progresiva del cartílago, erosiones óseas y la inflamación y ruptura de los tendones es característica. Esta enfermedad afecta alrededor del 3% de la población adulta con predominio en mujeres en una proporción de 3:1 y una incidencia máxima entre los 25-50 años (van Schaardenburg & Breedveld 1994).

A pesar que la causa de la AR se desconoce, se sugiere que la exposición a un agente ambiental, principalmente bacterias, puede contribuir al desarrollo de la enfermedad (Albani & Carson 1996; Krause et al., 1996). Existen además factores genéticos que contribuyen en 30-50% con el riesgo a desarrollar la enfermedad. Aproximadamente, un tercio de esos factores genéticos están en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y cuya localización es 6p21.3 (Kilding et al., 2004). Estudios previos demuestran asociación de los alelos HLA-DRB1 que codifican el “epítoto compartido” SE (+); ubicado en la posición 70-74 y cuya secuencia es (Q/R)(K/R)RRA y el riesgo a desarrollar AR (Ruíz-Morales et al., 2004; Bonggi et al., 2004; Gorman & Criswell 2002). Recientemente se ha sugerido que factores adicionales localizados hacia la porción telomérica del MHC

contribuyen también con el riesgo a desarrollar la enfermedad (Scholand et al., 2003; Zanelli et al., 2001).

La naturaleza multifactorial de la AR hace de ésta, una enfermedad compleja en la que intervienen factores genéticos y no genéticos. Por lo tanto es concebible que la interacción de otros genes, contribuyan también con el riesgo o la severidad de la AR. Se han realizado estudios que demuestran diferencias en asociación a la enfermedad en diferentes grupos étnicos (Gorman & Criswell 2002; Listing et al., 2000; Hajeer et al., 2000; Wakitani et al., 1997). En adición, las manifestaciones clínicas como también la frecuencia y el tipo de alelo asociado a AR varía de un grupo étnico a otro (Del Rincón et al., 2003; McDaniel et al., 1995). Estas diferencias justifican la necesidad de realizar estudios en diferentes poblaciones de manera que se pueda establecer una mejor relación entre la enfermedad y la heterogeneidad genética de cada población.

La población panameña es el resultado de una mezcla de diferentes grupos étnicos que han contribuido a la heterogeneidad genética actual característica de nuestra población, por lo que no es recomendable asumir que los alelos asociados a AR en otras poblaciones son los mismos en la población panameña. En nuestro país no se tiene información sobre la distribución de alelos HLA-DRB1 con SE (+) en pacientes con AR severa, lo cual implica que se desconoce que alelos están asociados a esta condición y las frecuencias en que se presentan. En este trabajo se determinó que alelos HLA-DRB1 están presentes en pacientes panameños con AR severa, y si existe asociación entre la condición y la presencia de SE (+) y los alelos que exhiben asociación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se analizaron 85 muestras; 50 de pacientes del Servicio de Reumatología del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Madrid con diagnóstico médico de artritis reumatoidea severa y 35 donantes sanos del Banco de sangre de la misma institución; utilizados como controles. Se colectaron 4.5 mL de sangre venosa de cada individuo y se transfirieron a tubos con EDTA.

EXTRACCION DE ADN

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos a 4 °C. El plasma resultante fue descartado y la capa rica en glóbulos blancos y plaquetas, transferida a un tubo y resuspendida en 4 mL de solución de lisis I (5 mM MgCl). La suspensión fue centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos a 4 °C y el sobrenadante resultante descartado. Las células fueron una vez más resuspendidas en 4 mL de la misma solución y centrifugadas bajo las condiciones antes descritas. El sobrenadante fue descartado y el botón celular resuspendido en 4 mL de solución de lisis II (5 mM MgCl, 0.1 % Nonidet NP-40) y centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue nuevamente descartado y el botón celular resuspendido en 200 µL de Tris-EDTA. Se añadieron 800 µL de proteinasa K (0.3 mg/mL) y se incubó a 56 °C por 2 horas. Luego se procedió a realizar una extracción con igual volumen de fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1). La suspensión fue centrifugada a 14,000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante transferido a un tubo Eppendorf y el ADN precipitado mediante la adición de 300 mM NaCl y dos volúmenes de etanol absoluto. El ADN precipitado fue recuperado mediante centrifugación a 14,000 rpm, lavado con etanol al 70% y resuspendido en TE 1X (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0).

PCR-SSP

La determinación de los alelos HLA-DRB1 presentes en cada individuo se realizó mediante el procedimiento descrito por Lee et al., 1996. El procedimiento utilizado permite la tipificación los alelos HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0402, HLA-DRB1*0404, HLA-DRB1*0406, HLA-DRB1*0407. El procedimiento no discrimina entre los alelos HLA-DRB1*0405 y 0409 (HLA-DRB1*0405/*0409); HLA-DRB1*0410 y *0411 (HLA-DRB1*0410/*0411); HLA-DRB1*0403 y *0406 (HLA-DRB1*0403/*0406) y HLA-DRB1*0401,*0408 y *0409 (HLA-DRB1*0401/*0408/*0409). Se prepararon tres mezclas de reacción diferentes (1, 2 y 3). Cada mezcla contenía 2 o más cebadores para la amplificación específica de diferentes alelos (Cuadro 1). Se realizaron tres reacciones de amplificación con cada muestra; cada una con una mezcla diferente de cebadores. Cada mezcla contenía 0.4 µM de cada cebador de secuencia específica, 0.08 µM de cada uno de los cebadores utilizados para la amplificación del control interno, 56 mM

KCl, 1.7 mM MgCl₂, 11 mM Tris-HCl, pH 8.3, 0.0011% gelatina, 250 µM de cada dNTPs. Se utilizaron en cada reacción 2 µg de ADN y 0.5 U de Amplitaq (Perkin-Elmer). El volumen final de la reacción fue de 50 µL. Las condiciones de amplificación fueron: 30 ciclos de 94 °C 20s, 59 °C 50s y 72 °C 20s. La tipificación de los alelos se realizó con base a el tamaño de los productos de amplificación observados con cada mezcla (Fig. 1).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se determinó la frecuencia de individuos con alelos HLA-DRB1 y se realizó la prueba de chi cuadrada para determinar la probable asociación utilizando una tabla de 2 x 2 (Steel & Torrie 1995) y la chi cuadrada corregida de Yates, 1934. Se determinó el riesgo relativo según Wolf (1955) para cada uno de los alelos con SE (+) de manera independiente y también combinada.

Cuadro 1. Alelos HLA-DRB1, productos esperados y cebadores en cada mezcla.

Alelos DRB1	(pb)	Cebador 5´	Cebador 3´
Mezcla N° 1 DRB1*0101	210	GCGGGTGCGGTTGCTGGAA	TGCACTGTGAAGCTCTCAC
Mezcla N° 2 DRB1*0406 DRB1*0405, 0409, 0410, 0411 DRB1*0403, 0406, 0407 DRB1*0401, 0405, 0407, 0408, 0409	111 171 222 261	GTTTCTTGGAGCAGGTAAACA GTTTCTTGGAGCAGGTAAACA GTTTCTTGGAGCAGGTAAACA GTTTCTTGGAGCAGGTAAACA	GCTGTGCGAAGCGCACGG TGTTCAGTACTCGGGCGCT TCTGCAGTAGGTGCCACCT CTGCACTGTGAAGCTCTCAC
Mezcla N° 3 DRB1*0402 DRB1*0402, 0403, 0404, 0406	214 261	GTTTCTTGGAGCAGGTAAACA GTTTCTTGGAGCAGGTAAAC	GTCAACCGCGCCCGCTC CTGCACTGTGAAGCTCTCCA
Control Interno (C5, C3)	796	TGCCAAGTGGAGCACCCAA	GCATCTTGCTCTGTGCAGA

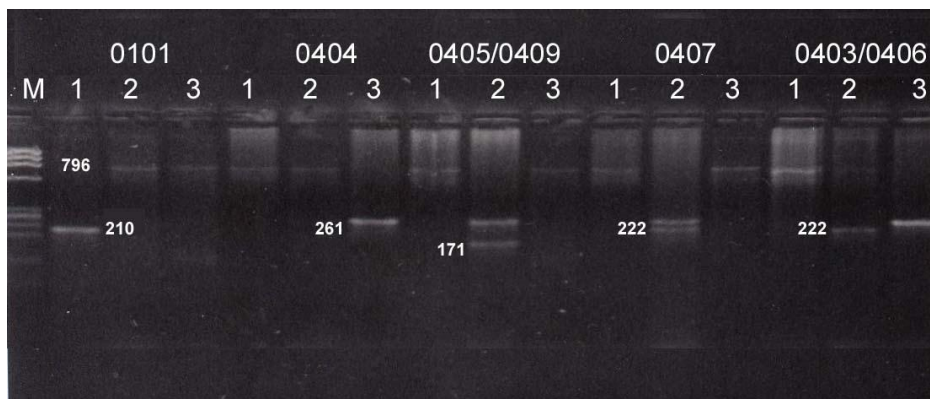


Fig. 1. Productos del PCR-SSP de algunos de los alelos HLA-DRB1 utilizados. M, marcador ϕ X174 Hae III. Se pueden apreciar los productos esperados de cada alelo con las diferentes mezcla de cebadores y una banda de 796 pb del control interno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La frecuencia de individuos con al menos un alelo HLA-DRB1 con SE (+) y el riesgo relativo para cada uno esos alelos con respecto al grupo control se muestra en el Cuadro 2. La frecuencia de individuos con alelos SE (+) (68% vs 34%, $P^{no\ corregida} < 0.005$) fue significativamente mayor en pacientes con AR que en el grupo control. Frecuencias similares para la presencia de alelos con SE (+) fueron reportadas en pacientes japoneses (Toda et al., 1994; Higami et al., 1997; Yukioka et al., 1998) y en pacientes españoles con AR (González-Escribano et al., 1999). Sin embargo, el alelo más fuertemente asociado a AR en japoneses, griegos, polinesios y españoles es HLA-DRB1*0405. Por otro lado, HLA-DRB1*0101 es el alelo que se asocia con AR en italianos, israelíes, indostanes, vascos y algunos españoles (Yelamos et al., 1993; De Juan et al., 1994). En nuestro estudio, el alelo mas frecuente en pacientes con AR severa fue HLA-DRB1*0101 y el único que de manera independiente se asocia con esta condición. La frecuencia de este alelo fue significativamente mayor (38% vs 17%, $P^{no\ corregida} < 0.05$) en pacientes con AR severa que la observada en el grupo control. Por otro lado, a pesar de que las frecuencias de los alelos HLA-DRB1*0405/*0409 (20% vs 8.5%), HLA-DRB1*0410/0411 (4% vs 2.85%), HLA-DRB1*0401/*0408 (8% vs 5.7%) y HLA-DRB1*0404 (8% vs 5.7%) fueron mayores en pacientes con AR

severa con respecto al grupo control, las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas. El riesgo relativo para la presencia de alelos HLA-DRB1* con SE (+) fue de 6.0 mientras que para la presencia de HLA-DRB1*0101 de 2.96. Este valor es considerablemente mayor que el reportado por Wakitani et al. (1997) de 1.8 pero muy similar (2.7) al reportado por Yukioka et al. (1998) en la población japonesa.

La no asociación observada entre AR y la presencia de subtipos HLA-DRB1*04 (HLA-DRB1*0404, HLA-DRB1*0405/*0409, HLA-DRB1*0410/*0411 y HLA-DRB1* 0401/*0408/*0409) contrasta con lo reportado en otros estudios en los cuales los alelos HLA-DRB1*04 son los más frecuentes en pacientes con AR severa (Gorman & Criswell 2002). Es posible que en nuestra población el alelo más común en pacientes con AR sea HLA-DRB1*0101 en lugar de los alelos HLA-DRB1*04. Los resultados de este estudio deben ser validados mediante un estudio con un número mayor de pacientes. Este trabajo representa el primero en el cual se proporciona información sobre la distribución y asociación de HLA-DRB1 y AR severa en pacientes panameños.

Cuadro 2. Frecuencia de individuos con alelos HLA-DRB1 que codifican el SE y riesgo relativo en pacientes panameños con AR severa.

HLA-DRB1* con SE(+)	Control (N=35)	Pacientes (N=50)
0101	17%	38% (2.96)*
0405/0409	8.5%	20% (2.34)
0410/0411	2.8%	4% (1.42)
0401/0408	5.7%	8% (3.21)
0404	5.7%	8% (3.31)
HLA-DRB1*SE(+)	34%	68% (6.00)**

Números en paréntesis corresponden al riesgo relativo

HLA-DRB1* SE (+) significa todos los alelos con SE (+)

* Valor de P no corregido es significativo comparado con el grupo control.

** Valor de P corregido es significativo comparado con el grupo control.

CONCLUSIÓN

La asociación entre AR y alelos HLA-DRB1* SE (+) ha sido previamente demostrada en la gran mayoría de las poblaciones estudiadas. En pacientes panameños con AR severa la frecuencia de alelos HLA-DRB1 con SE (+) es significativamente mayor que en los individuos que no padecen de la enfermedad demostrándose una vez más la asociación entre estos alelos y la AR severa. Con excepción de HLA-DRB1*0101 ninguno de los alelos HLA-DRB1* con SE (+) mostró por sí sólo asociación con la AR severa.

REFERENCIAS

Albani, S., & D. A. Carson. 1996. A multistep molecular mimicry hypothesis for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunol. Today* 17:466-470.

Bongi S. M., B. Porfirio, G. Rombola, E. Palasciano, E. Beneforti & G. Bianucci. 2004. Shared-epitope HLA-DRB1 alleles and sex ratio in Italian patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 71(1):24-8.

De Juan, M. D., I. Belmonte, J. Barado, J. Martínez-Lasso, M. Figueroa, A. Arauz-Villena & E. Cuadrado. 1994. Differential associations of HLA_DR antigens with rheumatoid arthritis (RA) in Basques: high frequency of DR1 and DR10 and lack of associations with HLA-DR4 of any of its subtypes. *Tissue Antigens* 43(5):320-3.

Del Rincón I, D. F. Battafarano, R. A. Arroyo, F. T. Murphy, M. Fischbach & A. Escalante. 2003. Ethnic variation in the clinical manifestation of rheumatoid arthritis: role of HLA-DRB1 alleles. *Arthritis Rheum*. 49(2):200-8.

González-Escribano, M. F., R. Rodríguez, A. Valenzuela, A. García & A. Núñez-Roldan. 1999. Complex association between HLA-DRB1 genes and female rheumatoid arthritis: results from a prospective study. *Hum Immunol* 60:1259-1265.

Gorman, J. D., & L.A. Criswell. 2002. The shared epitope and severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*. 28(1):265-274.

Hajeer, A. H., A. Dababneh, R. F. Makki, W. Thomson, K. Poulton M. A. Gonzalez-Gay, C. Garcia-Porrúa, D. L. Matthey & W. E. Ollier. 2000. Different gene loci within the HLA-DR and TNF regions are independently associated with susceptibility and severity in Spanish rheumatoid arthritis patients. *Tissue Antigens*. 55:319-325.

Higami, K., M. Acoda, Y. Matsuda, H. Ueda & S. Kashiwazaki. 1997. Lack of association of HLA-DRB1 genotype with radiologic progresión in Japanese patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 40(12):2241-7.

Kilding, R., M.M. Iles, J. M. Timms, J. Worthington & A. G. Wilson. 2004. Additional genetic susceptibility for rheumatoid arthritis telomeric of the DRB1 locus. *Arthritis Rheum*. 50(3):763-9.

Krause, A., T. Kamradt & G. Gurmester 1996. Potential infectious agents in the induction of arthritides. *Curr. Opin. Rheumatol*. 8:203-209.

Lee K, Park T., Park Y., Oh M., & Kim Y. 1996. DNA polymorphism analysis of the HLA-DRB1 gene using polymerase chain reaction sequence specific primers (PCR-SSP) among Korean subjects. *J Biochem Mol Biol*. 29(1):45-51.

Listing, J., R. Rau, B. Muller, R. Alten, E. Gromnica-Ihle, D. Hagemann, & A. Zink. 2000. HLA-DRB1 genes, rheumatoid factor and elevated C-reactive protein :independent risk factors of radiographic progression in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 27(9).2100-9.

Maini, R. N., C. Q. Chu & M. Feldmann. 1995. Aetiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *In* B. Henderson, J. C. W. Edwards, & E. R. Pettipher (eds.), *Mechanisms and models in rheumatoid arthritis*. pp. 25-46. Academic Press Ltd., London, England.

McDaniel, D. O., Alarcon, G. S., Pratt, P. W., Reveille, J. D. 1995. Most African-American patients with rheumatoid arthritis do not have rheumatoid antigenic determinant (epitope) *Ann Intern. Med*. 123 (3): 232-3.

Ruíz – Morales, J. A., G. Vargas - Alarcon, P. O. Flores - Villanueva, C. Villarreal-Garza, G. Hernández-Pacheco, J. K. Yamamoto-Furusho, J. M. Rodríguez-Pérez, N. Pérez-Hernández, M. Rull, M. H. Cardiel, & J. Granados. 2004. HLA-DRB1 alleles encoding the “shared epitope” are associated with susceptibility to developing rheumatoid arthritis whereas HLA-DRB1 alleles encoding an aspartic acid at position 70 of the beta-chain are protective in Mexican mestizos. *Hum Immunol.* 65(3):262-9.

Schonland, S. O., C. Lopez, T. Widmann, J. Zimmer, E. Bryl, J. J. Goronzy, C. M. Weyand. 2003. Premature telomeric loss in rheumatoid arthritis is genetically determined and involves both myeloid and lymphoid cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(23):13471-6.

Steel, R. G. & J. H. Torrie. 1995. *Bioestadística: Principios y Procedimientos.* Editorial McGraw-Hill, USA, 584 pp.

Toda, Y., Y. Minamikawa, S. Akagi, H. Sugano, Y. Mori, H. Nishimura, S. Arita, Y. Sugino, R. Ogawa. 1994. Rheumatoid-susceptible alleles of HLA-DRB1 are genetically recessive to non-susceptible alleles in the progression of the bone destruction in the wrist and fingers of patients with RA. *Ann Rheum Dis.* 53:587-92.

van Schaardenburg, D. & F.C. Breedveld. 1994. Elderly-onset rheumatoid arthritis. *Sem Arthritis Rheum* 23:367-78.

Wakitani, S., N. Murata, Y. Toda, R. Ogawa, T. Kaneshige, Y. Nishimura & T. Ochi. 1997. The relationship between HLA-DRB1 alleles and disease subsets of rheumatoid arthritis in Japanese. *British J of Rheumatol.* 36:630-6.

Wolf, B. 1955. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet.* 19:251-3.

Yates, P. 1934. Contingency tables involving small numbers and the X^2 test. *J Royal Stat Soc Suppl.* 1:217-235.

Yelamos, J., J. R. García-Lozano, I. Moreno, I. Aguilera, M. F. González, A. García & A. Nuñez-roldan, B. Sánchez. 1993.

association of HLA-DR4-Dw15 (DRB1*0405) and DR10 with rheumatoid arthritis in a Spanish population. *Arthritis Rheum* 36 (6):811-4.

Yukioka, M., S. Wakitani, N. Murata, Y. Toda, R. Ogawa, T. Kaneshige & T. Ochi. 1998. Elderly-onset rheumatoid arthritis and its association with HLA-DRB1 alleles in Japanese. *Br J Rheumatol* 37(1):98-101.

Zanelli E., G. Jones, M. Pascual, P. Eerligh, A.R. van der Slik, A.H., Zwinderman, W. Verduyn, G.M. Schreuder, E. Roovers, F.C. Breedveld, R.R. de Vries, J. Martin & M. J. Giphart. 2001. The telomeric part of the HLA region predisposes to rheumatoid arthritis independently of class II loci. *Hum Immunol.* 62(1):75-84.

Recibido mayo de 2004, aceptado agosto de 2004.