

Una aproximación al significado biológico del polimorfismo del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. El modelo de la asociación HLA y ARJ*

Gloria Garavito^{1,3,4}, Antonio Iglesias^{2,4}, Eduardo Egea^{1,4}, Dolores Jaraquemada^{3,4}, Paz Martínez^{3,4}, Eduardo Enrique Egea^{4,5}

Resumen

Objetivos. Llevar a cabo una actualización del estado del arte acerca del significado biológico del polimorfismo del sistema genético Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). Revisar la literatura relacionada con la asociación de los antígenos de histocompatibilidad en el humano (HLA) y la susceptibilidad o resistencia al desarrollo de la artritis reumatoidea juvenil (ARJ). Presentar un modelo hipotético para la comprensión de la susceptibilidad genética a desarrollar ARJ.

Fuente de datos. Las referencias bibliográficas que soportan este artículo se obtuvieron a través de búsquedas en las siguientes bases de datos: Pubmed, Ovid, Ebsco. Inicialmente se encontraron 139 artículos, de los cuales se seleccionaron 75. Se incluyó también información del desarrollo de un proyecto de investigación de nuestro grupo, «Polimorfismo molecular de los antígenos HLA en ARJ» (cod. Colciencias 1215-04-280-96).

Resultados. La artritis reumatoidea juvenil (ARJ) es la enfermedad más común en la práctica reumatológica pediátrica y la menos estudiada inmunogenéticamente. A diferencia de la artritis reumatoide (AR) del adulto, la ARJ tiene ciertas variantes clínicas, lo que la hace más interesante desde el punto de vista genético (fenotipos). En su etiopatogenia se han identificado varios factores que en su conjunto explicarían el inicio y la perpetuación de la respuesta inflamatoria que afecta las articulaciones y tejidos vecinos, y que de no ser controlados llegan a destruirlos, tal como sucede en otras enfermedades autoinmunes. La patogénesis de la enfermedad puede determinarse por alteraciones a nivel de complejo trimolecular, constituido por un antígeno putativo, el receptor de linfocitos T y el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH).

Nuestro grupo durante los últimos 4 años ha estado estudiando la asociación entre ARJ y el polimorfismo de los alelos HLA DRB1* y DQB1* en niños mestizos de nuestro país. Los resultados son congruentes con otros hallazgos descritos en la literatura por diferentes grupos de investigadores. En la serie de pacientes estudiados por nosotros se encontró que los alelos HLA DRB1* 1104, HLA*0701 y HLA*1602 están asociados a la susceptibilidad de desarrollar ARJ, además nuestros datos muestran que los alelos HLA DRB1* 1501 y HLA DQB1* 0602 están claramente asociados con protección.

Fecha de aceptación: Julio 2002

* Este trabajo fue financiado parcialmente con fondos del Instituto Colombiano de Ciencia y Tecnología, Colciencias. Ref.: 1215-04-280-96, y por fondos provenientes de la Universidad del Norte, Dirección de Investigaciones y Proyectos.

¹ Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular, Universidad del Norte, Barranquilla (Colombia).

² Departamento de Reumatología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (Colombia).

³ Instituto de Biología Fundamental, Universidad Autónoma de Barcelona (España). ggaravit@uninorte.edu.co

⁴ Estos autores contribuyeron de igual forma en el desarrollo de este trabajo.

⁵ Estudiante medicina, Universidad del Norte.

Es importante resaltar que todos los alelos asociados a susceptibilidad comparten el aminoácido Asp en la posición 70, y aquellos que se muestran como marcadores de protección contienen Val en la misma posición.

Conclusión. La información obtenida de la literatura y los hallazgos encontrados en nuestra serie de pacientes colombianos son relevantes e importantes, dado que desde el punto de vista molecular, a nivel de la presentación antigénica, el aminoácido en la posición 70 en el motivo 67 a la 73, a nivel de la molécula HLA podría activar células TH1 o TH2, las cuales estarían comprometidas en la inmunopatología de esta entidad. Otros factores genéticos y/o ambientales en asocio con estas características moleculares, expresadas a nivel de la molécula HLA, comprometida en la presentación antigénica, podrían interactuar y su resultado estaría influenciando el desarrollo y la expresión de la ARJ.

Palabras clave: Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), artritis reumatoide juvenil, HLA y ARJ.

Abstract

Objectives. To carry out an updating of the state of the art about the biological meaning of genetic system polymorphism Major Histocompatibility Complex (MHC). To review the literature related to the association of histocompatibility antigens in humans (HLA) and the susceptibility or resistance to the development of Juvenile Rheumatoid Arthritis (JRA). To present a hypothetical model to understand the genetic susceptibility to develop JRA.

Data source. The bibliographic references supporting this paper were obtained through searching in the following data base: Pubmed, Ovid, Ebsco. Initially, 139 articles were found, from which 75 were selected. Information about the development of a research of our group, «Molecular polymorphism of HLA and JRA antigens» was also included. (Colciencias code N° 1215-04-280-96).

Results. Juvenile rheumatoid Arthritis (JRA) is the most common disease in pediatric rheumatologic practice as well as the one with less immunogenetic studies. Contrary to the adult rheumatoid arthritis (RA), JRA has certain clinical variants which make it more interesting from the genetic point of view (phenotypes). In its pathogenesis several factors have been identified, which as a whole would explain the onset and the perpetuation of the inflammatory response affecting joints and nearby tissue as well as its imminent destruction given no control of it as is the case in other autoimmune diseases. The disease pathogenesis can be determined by alterations at the trimolecular level formed by a putative antigen: lymphocyte T receptor and the Major Histocompatibility Complex (MHC).

During the last four years our group has been studying the link between JRA and the HLA DRB1* and DQB1* alleles in mestizo children of our country. Results are congruent with the findings described in the literature by different investigation groups. In the series of patients studied, we have found that the alleles HLA DRB1* 1104, HLA*0701 and HLA*1602 are linked to the susceptibility of developing JRA. Our data also show that the alleles HLA DRB1* 1501 y HLA DQB1* 0602 are clearly linked to protection.

It is important to highlight that all the alleles linked to susceptibility share the Asp amino acid in position 70, and those shown as protection markers have Val in the same position.

Conclusion. The information obtained from the literature and the findings in our series of Colombian patients are relevant and important because from the molecular point of view, at an antigenic presentation level, the amino acid in position 70 in the motif 67 to 73, at HLA molecule level, could activate TH1 or TH2 cells, which would be compromised in the immunopathology of this entity. Other genetic or/and environmental factors linked to these molecular characteristics expressed at the level of the HLA molecule and compromised in the antigenic response could interact and its result would be influencing the development and the expression of JRA.

Key words: Major Histocompatibility Complex (MHC), juvenile rheumatoid arthritis (JRA).

INTRODUCCIÓN

La inmunogenética utiliza herramientas de la inmunología y de la biología molecular para definir los genes de la respuesta inmune y sus productos, los antígenos HLA. Los avances tecnológicos para la identificación del gran polimorfismo de los genes han permitido cada vez más asociar sistemas genéticos y sus productos a la susceptibilidad y/o resistencia a enfermedades. De hecho, hace más de 20 años se descubrió la asociación de los antígenos HLA con diferentes enfermedades. Hoy se han descubierto más de 60 entidades clínicas asociadas a HLA y en diferentes grupos étnicos (1).

La artritis reumatoidea juvenil (ARJ) es la enfermedad más común en la práctica reumatológica pediátrica y la menos estudiada inmunogenéticamente. A diferencia de la AR del adulto, la ARJ tiene ciertas variantes clínicas, lo que la hace más interesante desde el punto de vista genético (fenotipos) (2).

En Colombia (Suramérica) son escasos, sino ausentes, los trabajos realizados en el análisis de esta entidad. Sólo existen dos resúmenes: uno presentado en un Congreso de la Sociedad Colombiana de Reumatología (3) y el otro en 1999 en el Congreso de la American College of Rheumatology (4). La enfermedad de por sí es poco conocida en el país. De ella no se conoce su prevalencia ni su frecuencia, como tampoco su morbilidad. Actualmente no existe un registro médico nacional que articule y aúne los esfuerzos encaminados al mayor conocimiento del padecimiento.

En su etiopatogenia se han identificado varios factores que en su conjunto explicarían el inicio y la perpetuación de la respuesta inflamatoria que afecta las articulaciones y tejidos vecinos, y que de no ser controlados llegan a destruirlos. Este proceso inflamatorio puede originar trastornos del crecimiento. Igualmente, esta inflamación crónica determina grados variables de retardo ponderoestatural, retardo puberal, osteoporosis y anemia (5). Tal como sucede en otras enfermedades autoinmunes, la patogénesis de la enfermedad puede determinarse por alteraciones a nivel de complejo trimolecular, constituido por un antígeno putativo, el receptor de linfocitos T y el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) (5,6).

CLASIFICACIÓN CLÍNICA

La ARJ corresponde a un grupo heterogéneo de cuadros clínicos con manifestaciones crónicas que varían en morbilidad. Es una artropatía inflamatoria crónica que afecta diferentes articulaciones en número y lugar diferente. Puede producir manifestaciones extraarticulares, predominando éstas últimas en el cuadro clínico de ARJ sistémica. Esta última se caracteriza por fiebre prolongada, rash evanescente, serositis y visceromegalia. Es frecuente la afección del ojo. Este proceso inflamatorio intraocular es usualmente subclínico y puede determinar más secuelas que la misma artritis, tal y como sucede en la forma temprana de ARJ oligoarticular y en la forma monoarticular (2).

Por definición, el inicio de la enfermedad ocurre antes de los 16 años de edad y está clasificada en tres grupos clínicos: ARJ oligoarticular, ARJ poliarticular y ARJ sistémica

(7-10). El diagnóstico es básicamente clínico, no hay exámenes paraclínicos que permitan el diagnóstico definitivo de la misma. El Colegio Americano de Reumatología (10) estableció en 1977 los siguientes criterios diagnósticos:

- Artritis con una duración mayor de 6 semanas; derrame articular, signos indirectos de artritis tales como calor local, dolor a la palpación y movilización de la articulación, así como pérdida funcional de la misma.
- Según el modo de inicio, debe clasificarse en: oligoarticular (menos de 5 articulaciones), poliarticular (más de 5 articulaciones) y sistémica (en la que predominan las manifestaciones extraarticulares).
- Instalación del cuadro clínico antes de los 16 años.

A continuación y de manera sucinta se describen los subgrupos clínicos:

- *ARJ oligoarticular*: Se define como ARJ oligoarticular al cuadro clínico de inicio temprano (antes de los 6 años). Usualmente se presenta en pacientes del sexo femenino con compromiso ocular (iridociclitis). La forma benigna es más frecuente que todos los otros subgrupos de artritis reumatoidea juvenil. La de inicio tardío puede presentar evidencia de compromiso axial, y por esta razón algunos autores consideran que corresponden más bien a la forma juvenil de espondiloartropatía.
- *ARJ poliarticular*: Este subgrupo clínico se clasifica en seropositivo o seronegativo, dependiendo de la presencia o ausencia de factores reumatoideos. Las seropositivas tienden a desarrollar formas más persistentes de artritis, a ser erosivas y presentan nódulos reumatoideos. En este subgrupo también se presentan otras complicaciones observadas en la artritis reumatoidea del adulto.
- *ARJ sistémica*: Las manifestaciones extraarticulares predominan en este cuadro clínico, no siempre se presenta compromiso inflamatorio articular al inicio de la enfermedad. El diagnóstico diferencial puede ser muy difícil y debe ser excluido en todo caso del síndrome febril prolongado. El compromiso articular puede ser muy variable, sin embargo las formas persistentes de artritis tienden a ser muy destructivas y de tipo poliarticular.

El compromiso ocular puede presentarse en las tres formas de ARJ, pero es más frecuente en el subgrupo oligoarticular, al punto que debe ser investigado rutinariamente en todos los pacientes mediante un examen oftalmológico periódico. Característicamente es un cuadro subclínico y la severidad de las secuelas está asociada a la cronicidad del proceso inflamatorio intraocular no controlado. Cataratas, pérdida visual, glaucoma, son los signos más frecuentes. Adicionalmente, puede haber dicotomía entre la severidad de la artritis y la uveítis. La frecuencia de esta complicación está entre el 20 y 70% (8).

EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (CMH)

El CMH se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6. Ocupa un segmento de aproximadamente 3.500 kb (3.500.000 bases) de ADN. Dentro de este complejo se ubican un conjunto de genes que codifican y controlan la síntesis de glicoproteínas de la membrana celular, las cuales se expresan en las diferentes poblaciones de células inmuno competentes. Este sistema proteico se denomina sistema HLA (Sistema de Antígenos de Leucocitos Humanos), tiene una característica de suma importancia: la presencia de un desequilibrio de enlace entre alelos de un *loci*, lo cual se manifiesta en el hecho de que dichos alelos se hereden juntos en forma preferencial (11). El desequilibrio de enlace génico puede ser consecuencia de la selección natural entre una combinación génica específica. También puede ser debido al hecho de que la población está en un estado de transición y no ha alcanzado aún el equilibrio (12).

Estos genes codifican para la expresión de los Antígenos HLA clase I y HLA clase II denominados HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-D, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ. Igualmente se encuentran los genes HLA clase III, que gobiernan la síntesis de los factores del Complemento, como son C2, C4A y C4b de la vía clásica y el factor Bf de la vía alterna (13).

Genes HLA clase I - Estructura y función

Estos genes codifican para la expresión de una serie de moléculas presentes en la superficie de las células nucleadas. Estas moléculas son glicoproteína de membrana (cadena pesada de peso molecular de 44Kd) que se asocian a un segundo polipéptido denominado beta 2-microglobulina (de peso molecular 12 Kd, la cual es codificada por otro cromosoma). Cada cadena pesada puede ser dividida en regiones: tres dominios extracelulares (cada uno de aproximadamente 100 aminoácidos de largo), una región de transmembrana y una cola citoplasmática. Cada cadena pesada es inicialmente sintetizada con un péptido endógeno en su amino terminal. Este péptido es removido del polipéptido durante el transporte a la superficie celular y no se le encuentra en la proteína madura (11,14).

Los *loci* de clase I son muy similares entre sí. Las secuencias que identifican un alelo del *locus* A de un alelo del *locus* B o C están localizados en el primer exón, o en los exones localizados en el 3' del gen (que codifican las regiones de transmembrana y citoplasmática) o en los intrones que separan a los exones. Cada exón dentro de un gen codifica una región específica de la cadena pesada clase I. En los alelos de clase I, los exones segundo y tercero, que codifican el primer y segundo dominio de las cadenas pesadas, contienen la mayoría de las diferencias alélicas. Existen tres moléculas de clase I, denominadas HLA-A, HLA-B y HLA-C, las cuales presentan los péptidos a los linfocitos T CD8. Una característica fundamental de las moléculas de clase I es su enorme polimorfismo poblacional. Se cree que existen más de 30 alelos distintos para la molécula HLA-A, más de 60 para la HLA-B y más de 15 para HLA-C. La expresión de estas moléculas es codominante, por lo que la mayoría de los individuos son heterocigotos. Cada célula de un individuo expresa por lo menos tres diferentes moléculas de clase I: HLA-A, HLA-B y HLA-C. Estas moléculas son muy similares entre sí. Hay aproximadamente entre 0.5 y 1 millón de moléculas de clase I en la superficie de

una célula. Es un *loci* altamente polimórfico. La designación es dada por números, por ejemplo, A*0202 y A*0301 son alelos del *locus* HLA-A; β *2701 es un alelo del *locus* HLA-B. Existen alelos nulos o no expresados, los cuales se identifican con la letra «N» en el nombre del alelo, por ejemplo, A*2411N (18).

Genes HLA clase II - Estructura y función

Los genes que codifican las cadenas alfa y beta de las proteínas de clase II están localizados uno cerca del otro, se ubican cerca al centrómero en la siguiente secuencia: DP, DQ y DR. Otros genes también ubicados en la misma región no presentan productos génicos, como los SX, DZ, DO, DX y DV (16).

La información de un gen en particular no se localiza en una sola porción de pares de bases sino que se encuentra en múltiples segmentos de ADN de doble banda llamados exones. Estos segmentos, a su vez, son separados por segmentos de ADN interpuestos llamados intrones. El conjunto entero de exones que contiene la información codificante para una cadena polipeptídica completa constituye un gen.

La estructura dominante de las proteínas de clase II es un reflejo del arreglo exón/intrón de los genes a nivel del DNA. Los genes de la cadena α contienen 5 exones: el primero codifica la señal de secuencia, el segundo el dominio extracelular α 1, el tercero el dominio extracelular α 2, el cuarto, la porción transmembrana y la cola citoplasmática, y el quinto, la región 3'UT. Los genes de la cadena β tienen un arreglo idéntico, excepto para la cola citoplasmática, la cual es codificada por el exón 5 separada de la región 3'UT por 24 pb, cerca del exón 6. Los genes α y β de los diferentes subgrupos difieren significativamente en la longitud de sus intrones. La subregión DR es única entre los antígenos HLA clase II, la organización de los genes de la cadena β no es la misma para todos los haplotipos. El gen de la cadena α es virtualmente invariable (19).

El polimorfismo de los antígenos de HLA clase II tiene un significado fundamental en la función de las moléculas de HLA clase II con relación a la restricción inmune de las interacciones celulares. Los residuos polimórficos de los antígenos de clase II están principalmente localizados en el dominio externo NH₂-terminal de la cadena β , codificada por el segundo exón (20). Las expresiones alélicas de los antígenos HLA-DR y DQ representan numerosas especificidades y están determinadas primariamente por las variaciones alélicas en el segundo exón de los genes DR β 1 y DQ β 1, respectivamente (21). Más aun, los epítopes celulares definidos que contienen las especificidades HLA DW están en la mayoría de los casos correlacionados con las variaciones alélicas en el mismo exón del gen DR β 1 (22). El polimorfismo localizado en el exón 2 de los cuatro genes DR β expresados, está restringido a tres regiones hipervariables en las posiciones de los aminoácidos, 9-13, 26-33 y 67-74. Entre los genes de HLA clase II estas variaciones estructurales son la clave de las diferencias funcionales en el reconocimiento inmune del fenómeno de presentación antigénica, lo que conlleva a la inmunomodulación de la respuesta inmune, al procesamiento y presentación de epítopes inmunogénicos y la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad (16).

Las moléculas HLA clase II se encuentran en la superficie de las células del sistema inmune como linfocitos B y macrófagos (células presentadoras de antígenos que juegan un papel fundamental en el reconocimiento de antígenos foráneos). Cada célula del sistema inmune de un individuo expresa tres diferentes tipos de moléculas de clase II; HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Estas moléculas son muy similares entre sí, y se estima que hay entre 0.5 y 1 millón de moléculas de clase II en la superficie celular.

La función de los antígenos HLA

La expresión de las moléculas de clase I y clase II en la superficie de la célula es un proceso complejo que contempla la síntesis, procesamiento, transporte y secreción de las moléculas; ruta de biosíntesis que presenta una regulación ontogénica precisa, a la vez que está sometida a la modulación por interferón y por la disponibilidad y procesamiento del propio antígeno que ha de ser presentado. En el contexto de esta regulación tiene particular interés la modulación de la expresión de los antígenos del CMH por virus y oncogenes. Por su parte, las moléculas de clase I presentan antígenos endógenos procesados, bien como señales de identidad que en situaciones patológicas se comportan como extraños, dando lugar a las enfermedades autoinmunes, o bien como antígenos que se expresan como resultado de un proceso patogénico (infección viral o transformación maligna) (23).

Las moléculas de clase II presentan, en cambio, antígenos exógenos procesados y capturados previamente, bien de manera inespecífica por los macrófagos o de manera específica mediante las inmunoglobulinas de la superficie de las células B. Por otro lado, esta molécula estabiliza el heterodímero durante el procesamiento de ambas estructuras en el sistema de Golgi durante su recorrido hacia la superficie (24); acontecimiento que es igualmente válido para los HLA clase I.

Las moléculas del CMH de clase I se presentan como marcadores universales sometidos a la vigilancia de los linfocitos T CD8. Por su parte, las moléculas HLA clase II se expresan exclusivamente en células relacionadas con el sistema inmunológico, cuya vigilancia corresponde a los linfocitos T CD4.

La susceptibilidad a una gama de enfermedades está asociada a los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad y a sus productos fenotípicos (antígenos HLA). La asociación entre la expresión de un antígeno particular HLA y una enfermedad no es muy clara para todas ellas. No todos los individuos con una enfermedad dada tienen el antígeno HLA asociado, y la mayoría de la población que presenta el antígeno en cuestión no tiene asociada la enfermedad. Una explicación de lo anterior es que hay una penetrancia incompleta del rasgo controlado genéticamente (25,17).

Otras explicaciones posibles son:

- La asociación observada es debida a un gen estrechamente ligado en un desequilibrio de enlace con el gen del antígeno HLA identificado.
- Existe una heterogenicidad adicional de los antígenos HLA que no se ha detectado y sólo ciertas variantes llevan el riesgo de enfermar.

- Epítopes relevantes son compartidos entre alelos diferentes del mismo *loci* o de *locis* diferentes.
- La asociación de la enfermedad con diferentes antígenos puede caracterizar diferentes subclases del estado de la enfermedad.

El proceso de la enfermedad puede ser debido a la interacción de otros productos génicos codificados en o fuera del complejo HLA. La diversidad del sistema HLA representa ventajas diferenciales asociadas con numerosos alelos en diferentes nichos ecológicos, y presenta una ventaja selectiva que se incrementa con el estado heterocigoto (25).

Las asociaciones del sistema HLA se demuestran mediante el incremento o la disminución de las frecuencias de un alelo HLA en la enfermedad objeto de estudio, comparándose con la frecuencia del mismo marcador en individuos sanos pertenecientes al mismo grupo étnico (26).

Asociación HLA y enfermedad

Al buscar el verdadero papel biológico del MCH se iniciaron las investigaciones de genes de susceptibilidad HLA en enfermedades de etiología oscura y en cáncer. El hallazgo de la asociación intensa entre el B27 y la espondilitis anquilosante en los años setenta desencadenó el estudio del papel del CMH en la expresión de la enfermedad. Actualmente hay más de 70 entidades clínicas en las que está confirmado el fondo genético HLA, y lo publicado hasta 1985 en las diferentes poblaciones ha sido ampliamente revisado por Tiwari y Terasaki (5). El progreso es espectacular y los mecanismos moleculares se empiezan a aclarar. Dichas enfermedades se pueden clasificar en:

- Padecimientos con alteraciones inmunológicas de cualquier naturaleza (inmunodeficiencias, autoinmunes, alérgicas, etc.) relacionadas con genes DR, DQ o DP, a excepción de las primeras, que lo están con los genes de clase I.
- Enfermedades metabólicas y deficiencias de complemento (hemocromatosis, hiperplasia suprarrenal, deficiencias de C2, C4), que se deben a la alteración o delección de un solo gen.
- Tumores malignos sólidos o hematológicos que dependen del *locus* A y/o de la clase II.
- Enfermedades infecciones y parasitarias que pueden tener participación de clase I o de clase II.

Dentro de estas categorías caen los padecimientos hemato-oncológicos, inmunodeficiencias, reumatológicos, nefrológicos, oftalmológicos, autoinmunes, endocrinológicos y sistémicos, digestivos, neurológicos, dermatológicos. Valga señalar que en muchas de las enfermedades con etiología infecciosa evidente también se ha confirmado el papel del complejo HLA tanto en la protección como en la susceptibilidad; estos aspectos se abordarán a continuación (27).

En 1973 se publicaron dos trabajos claves en los que se informó una asociación de la espondilitis anquilosante (EA) con el HLA-B27 (28,29). Desde entonces ha sido evidente la asociación del B-27 con las siguientes enfermedades: EA, Síndrome de Reiter, uveítis anterior aguda, artritis reactiva, artropatía psoriática, sacroileítis, y en general cualquier procedimiento que esté involucrando las grandes articulaciones (29); la asociación ocurre en todos los grupos étnicos y la más intensa es con la EA. Es importante mencionar que la distribución geográfica de la EA corre paralela con la distribución del B-27. La prevalencia es alta en caucásicos, intermedia en grupos del Medio Oriente, baja en orientales, y ni la EA ni el B-27 existen en aborígenes australianos o en negros africanos.

Un gran número de enfermedades autoinmunes ha sido asociado con los alelos HLA-DR. Sin embargo, debido al fuerte desequilibrio de enlace entre los exones DRβ1* y DQβ1*, no se puede excluir la asociación de la enfermedad con los alelos HLA-DQ. Con el advenimiento de las sondas de DNA y el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como el análisis de los Polimorfismos en Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) para amplificar secuencias específicas de DNA, se han podido clonar y secuenciar muchos de los alelos involucrados en una enfermedad, como es el caso de alelos DQα y β para pacientes con diabetes tipo I (30).

De otra parte, los genes del sistema HLA tienen un papel preponderante a nivel de las interacciones fisiológicas del sistema inmune. Se ha establecido que muchos antígenos foráneos son reconocidos por el sistema inmune cuando se asocian con los productos del CMH. Sin embargo, el genotipo del CMH de la célula blanco puede limitar este reconocimiento, fenómeno conocido como restricción del CMH (29,31).

La fuerza de una asociación se expresa en términos de Riesgo Relativo (RR), que indica cuántas veces la enfermedad se expresa en un individuo con un determinado marcador HLA en relación con un individuo en quien no exprese dicho marcador. Un riesgo relativo mayor de 1 indica una relación positiva con dicho marcador.

La mayoría de las patologías se asocian con antígenos HLA clase I o HLA clase II. Ellas pueden mostrar relación con autoanticuerpos y células inflamatorias, como es el caso de la *Myastenia Gravis*, artritis reumatoidea y diabetes juvenil (tabla 1) (29). En las enfermedades asociadas a la clase I se presenta una respuesta de linfocitos T citotóxicos, mientras que en las enfermedades asociadas a la clase II se involucran linfocitos T ayudadores (32).

Probable papel del polimorfismo de los alelos HLA clase II en artritis reumatoide juvenil

En las enfermedades autoinmunes del humano se ha podido documentar una asociación entre el polimorfismo de los alelos HLA clase I y clase II con susceptibilidad a desarrollar dichas enfermedades. De hecho se ha postulado que en las enfermedades hereditarias complejas y poligénicas, la respuesta inmune dirigida contra antígenos propios es crucial en la etiopatogenia de la enfermedad, y que esta respuesta estaría condicionada por una particular expresión o rearreglo de los genes en un individuo. De esta forma, un alelo HLA específico podría favorecer la presentación antigénica de un péptido artritogénico a un repertorio de TcR predeterminado genéticamente (33).

Tabla 1
Antígenos de leucocitos humanos (HLA) ligados a enfermedades (61)

ENFERMEDAD	ALELO
Artritis reumatoidea	DR4
Espondilitis anquilosante	B27
Psoriasis vulgar	B13, B17, B37,Cw6
Dermatítis herpetiforme	Dw3, Drw3
Enfermedad celíaca	Dw4
Hepatitis autoinmune crónica	B8,DRw3
Miastenia <i>Gravis</i>	B12
Diabetes juvenil insulino dependiente	Dw2, Dw3, Dw4, DR3/DQw8
<i>Pemphigus Vulgaris</i>	DR4
Hiperplasia adrenal congénita	B5
Tuberculosis	B8, B15, B5, DR5, A2, B18, B35, B27,
Fiebre de Ambrosía	B7

A diferencia de la artritis reumatoide del adulto, la artritis reumatoide juvenil es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista clínico, con un curso variable, en la que se definen subgrupos clínicos claramente diferentes (34). El componente genético en la patogénesis de la artritis reumatoide del adulto ha sido bastante investigado, a diferencia de la artritis reumatoide juvenil, respecto a la cual los estudios no son concluyentes; sin embargo, es claro que los genes y los mecanismos que condicionan la predisposición y/o protección en ARJ son diferentes (35).

La ARJ es una enfermedad compleja, poligénica, en la cual se han podido documentar asociaciones no sólo con los genes asociados al CMH sino también con muchos otros marcadores, tales como: Los genes promotores de IL-1, IL-6 e IL-10, TNF alfa/beta y el polimorfismo de la región variable 6.1 de TcR, entre otros (36). Aunque las asociaciones más consistentes y reproducibles han sido las descritas con el polimorfismo de los genes CMH, los otros marcadores genéticos complican el análisis de las bases genéticas de esta enfermedad. Además es evidente que no existen razones para suponer que la ARJ sea diferente de las otras enfermedades autoinmunes en las cuales se ha podido documentar varios sistemas genéticos esparcidos por diferentes cromosomas asociados a la susceptibilidad y expresión de la enfermedad (37).

A pesar de muchos estudios encaminados a asociar antígenos de leucocitos humanos y artritis reumatoide juvenil (38), no está claro aún cuáles de los genes del CMH están directamente involucrados en la patogénesis de esta enfermedad. Ella, por ser una enfermedad heterogénea, hace más compleja su asociación con los alelos HLA. Todos los estudios publicados han sido desarrollados en pacientes caucásicos y anglosajones mas no en grupos étnicos mestizos.

La ARJ es una enfermedad autoinmune, caracterizada por inflamación crónica de la membrana sinovial, la cual produce una destrucción de la articulación. En ella la

respuesta inmunitaria parece estar determinada en parte por el polimorfismo de las moléculas clase II del CMH, por el Reconocimiento y la interacción entre péptidos artritogénicos con las moléculas de HLA clase II y el Receptor de Células T CD4+ (TcR). El proceso biológico iniciaría una cascada de eventos que resultan en una respuesta inflamatoria, en una alteración de la inmunorregulación y, en su defecto, en una respuesta autoinmune (3,4).

Mucho se ha investigado e informado respecto a la asociación entre antígenos HLA y las diferentes formas de la enfermedad. También se han documentado asociación entre determinadas complicaciones de la enfermedad y la presencia o ausencia (factor de riesgo o factor protector) de ciertos antígenos HLA. Sin embargo, existen significativas variaciones entre este tipo de asociación en los diferentes grupos étnicos o incluso dentro de la misma población caucásica. El informe de varios familiares con artritis reumatoide juvenil y de artritis reumatoide juvenil de gemelos idénticos apoya también la existencia de predisposición genética como un factor importante en la patogenicidad de la enfermedad (39).

Las más fuertes asociaciones entre antígenos HLA y subgrupos de ARJ se han encontrado en el subgrupo de ARJ oligoarticular. En la forma oligoarticular también se han descrito asociaciones que permiten identificar inclusive subgrupos que tienden a desarrollar formas severas de enfermedad. En la ARJ sistémica se han encontrado menos asociaciones y son también más débiles (40,15).

Parece ser que los genes HLA clase II del CMH portan la predisposición primaria que afecta la artritis reumatoide juvenil pauciarticular con Cuadros Clínicos de Instalación Temprana (EOPA-JRA). Haas JP y colaboradores (41) encontraron una diferencia entre los datos de frecuencia y distribución del subtipo DRβ*11 en pacientes con y sin enfermedad ocular al compararlos con los publicados por Melin-Aldana y colaboradores (42) y las encontradas por ellos, en la que no se detectó una asociación significativa de DRβ1*1101, *1102 y *1103 en ambos grupos. Sólo se observó una tendencia no muy significativa del DRβ1*1104 en pacientes sin enfermedad ocular (33%) Vs pacientes con enfermedad ocular (22%). La frecuencia del DRβ1*0801 no fue significativa (41).

En adultos con artritis reumatoide y factor reumatoide negativo (FR-) se observa una menor frecuencia de expresión del antígeno HLA-DR4. Sin embargo, en niños que sufren de ARJ y presentan un FR negativo, la frecuencia del antígeno HL-DR4 expresa una marcada disminución. Por otro lado, los niños con ARJ y FR positivo tienen una frecuencia incrementada del HLA-DR4, en forma similar a la de los adultos con AR y FR(+). Estos conceptos permiten inferir que el alelo HLA-DR4 es un factor de riesgo para la producción de FR en ARJ y que estos alelos asociados a los *locis* HLA-DQ o HLA-DP pueden ser responsables de inhibir la producción de anticuerpos anti-IgG de naturaleza factor reumatoide. De particular interés es el hallazgo descrito entre la asociación del alelo HLA-DPβ1*0301 y la asociación de FR positivo en niños con AR (36).

Ciertas combinaciones de los alelos DRβ1 y DPβ1 son características de sujetos con ARJ pauciarticular y factor reumatoide negativo. En pacientes sin anticuerpos antinucleares e iridociclitis crónica se observó una disminución de DRβ1*0101/02 y

DQ α 1*0101 (43). En un análisis de los alelos DP β 1 se mostró una disminución del alelo DP β 1*0201 en pacientes con ARJ pauciarticular conforme a otros reportes mencionados (44-47) y una disminución del DP β 1*0301 en aquellos con FR negativo y enfermedad poliarticular (48). En pacientes con enfermedad severa y FR positivo se encontró el DR β 1*0401 elevado en conjunto con una elevación del DR β 1*04 en homocigotos (49). También encontraron que en niños con ARJ poliarticular y FR negativo estaban presentes simultáneamente los alelos DP β 1*0301 y DR β 1*0801/03, confirmando una particular relación con la enfermedad. Con la población noruega no se pudo explicar este hallazgo como una expresión de un desequilibrio de enlace (50).

El haplotipo HLA-DR5 y DR8 en heterocigotos dobles pueden representar una forma de herencia pseudorecesiva de ARJ oligoarticular, especialmente cuando se detecta en hermanos de los pacientes (48). Este epítope compartido podría tener un papel importante en la patogenia de la enfermedad.

El subgrupo ARJ poliarticular RF+ clínicamente recuerda el cuadro clínico de AR en el adulto. Este está asociado con alelos HLA-DR4. Un análisis de secuenciación de estos alelos ha revelado un incremento en las frecuencias de DR β 1*0401 y *0404 en población caucasoide y del alelo DR β 1*0405 en pacientes japoneses (51-53). Todo lo anterior refuerza el concepto de que ARJ poliarticular RF+ está estrechamente asociado desde el punto de vista fisiopatológico y genético en el adulto. De hecho, hoy está plenamente demostrado que la predisposición genética de la AR está asociada a los genes CMH clase II de algunos *loci* HLA DR β 1. Lo anterior ha dado origen a la teoría del «Epítote Compartido». En resumen, un grupo de aminoácidos en la posición del motivo (67 - 74) ubicado en la región alfa hélice del sitio unión con el péptido artritogénico, define un grupo de alelos HLA DR β 1*04 estrechamente asociado con susceptibilidad al desarrollo al AR del adulto (54,55,56) .

Un modelo molecular para el entendimiento de la susceptibilidad genética al desarrollo de ARJ

El análisis a nivel molecular de la asociación de alelos del CMH en determinadas enfermedades con etiología autoinmune, parece apoyar la hipótesis de que segmentos polimórficos de varios productos alélicos, actuando en conjunto, son responsables de la susceptibilidad o de la resistencia a desarrollarla (57).

Los mecanismos de asociación entre AR y HLA-DR4 son un ejemplo. Se empezaron a identificar primero por Cultivo de Mezcla de Linfocitos (58), posteriormente por medio de técnicas moleculares se confirmó que existen 12 variantes alélicas (59). Estos alelos difieren entre sí por uno o cinco *a.a.* localizados entre los residuos 67 a 74 del dominio externo β 1 de la cadena DR β (60,61) .

Ahora es evidente que ciertos subtipos de algunos alelos a nivel de los exones HLA DR β 1 condicionan la susceptibilidad a AR en caucásicos. Ellos son: DR β 1*0401, *0404, *0405, 0408. Los alelos DR β 1*0402, DR β 1*0403 y DR β 1*0407 parecen conferir resistencia al padecimiento. Estos datos indican que la variación estructural en ciertos sitios de la cadena DR β 1 y sus efectos en el reconocimiento de los linfocitos T están muy relacionados con la inmunopatogenia de AR. No está claro aún si la asociación

primaria de ARJ es con los alelos HLA- DR β 1 o DQ α 1 o con la formación de heterodímeros responsables de los haplotipos DR β 1/DQ α 1. Cuando estos últimos se asocian con la expresión de HLA-DR5 y HLA-DRw8 en estos pacientes. Se teoriza diciendo que probablemente el polimorfismo de los alelos DQ β 1 es menos importante que la combinación de los haplotipos DR β -DQ α , dado que los genes DR β 1 definen el subtipo DR5 y Drw8 y los genes DQ α se encuentran en desequilibrio de enlace con los genes DR β (61). Posiblemente la secuencia de las bases nucleotídicas de los genes DR β establecen la secuencia aminoacídica requerida para la susceptibilidad a la enfermedad, de forma semejante como ocurre en el modelo de la diabetes mellitus insulino dependiente, en el cual el cambio de un solo *a.a.* da una información importante, la cual contribuye significativamente en la susceptibilidad a la enfermedad. Todd y col. en 1987 notaron que la susceptibilidad a la diabetes tipo I estaba directamente relacionada con la ausencia en doble expresión o en forma «homocigota» del ácido aspártico en la posición 57 de la cadena β del DQ (Asp-57) (62).

En los haplotipos diabetogénicos, el *a.a.* en la posición 57 de sus alelos DQ β 1 puede ser Alanina, Valina o Serina. A pesar de que varios estudios en caucásicos confirmaron esta observación (63,64,28), han aparecido importantes excepciones, como la presencia de Asp-57 en haplotipos DRw9, DR4 y DQw9 en japoneses con diabetes tipo I (29,65) y aun en caucásicos heterocigotos DR4/DR1 y DR4/DRw8 (66).

Los resultados obtenidos en grupos étnicos no caucásicos han revelado que aunque la posición 57 de DQ β tiene gran importancia, es necesario considerar igualmente la contribución de la cadena DQ α (67-69). Se ha sugerido que la presencia de Arginina en la posición 52 de la cadena DQ α (Arg-52) confiere susceptibilidad a la diabetes tipo I (69) y está relacionada a la expresión de un heterodímero en la superficie de la célula compuesto de una cadena DQ α con Arg-52 y una cadena DQ β que no lleva el Asp-57. Los mismos autores proponen que la combinación DQ α 1*0102/DQ β 1*0602 da protección dominante (70,28).

Todo lo expuesto ha justificado el uso de la oligotipificación del DNA genómico amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y la interpretación de resultados obtenidos con el uso de tablas que listan la presencia de Arg-52 y Asp-57 en los diferentes alelos DQ α y DQ β para expresarlos en forma de «genotipos» DQ α /DQ β que serían SS/SS cuando se trata de haplotipos homocigotos Arg-52+/Asp57; o PP/PP o cualquiera de otras combinaciones posibles SP/PS, SS/PP, PS/PP, etc. (69). Como los haplotipos HLA-DR3 y DR5 generalmente se asocian al mismo alelo DQ α 1*0501, es indudable que los heterocigotos DR5/DR7 presentan en *trans* cadena α del DR5 y cadena β del DR7, el mismo heterodímero DQ α 1/DQ β 1 que el haplotipo DR3 presenta en *cis*, se ha informado en posición *trans* que el 90% de los pacientes con enfermedad celíaca presenta DQ (71). A diferencia de las enfermedades mencionadas hasta ahora, en la esclerosis múltiple el antígeno HLA que confiere susceptibilidad en caucasoides es predominante el DR2 (72); aunque también existe asociación con DR4 y DRw6 (5), aun en caucasoides, una tercera parte de los pacientes son DR2 negativo, y en otros grupos étnicos no existe la asociación con este antígeno. Por esta razón se piensa que existen dos enfermedades inmunogénicamente diferentes: una esclerosis esencialmente crónica progresiva y otra con procesos de remisión y recaída (5).

El 96% de los pacientes y el 60% de los controles presentan uno de dichos alelos DQ α 1 y DQ β 1 mencionados arriba, lo que da un riesgo relativo de 13 (73). Se sugiere que la esclerosis múltiple pudiera estar asociada a determinados alelos DQ α 1 y DQ β 1 con residuos polimórficos comunes, los cuales codificarían heterodímeros DQ alfa-beta tanto en *cis* como en *trans*, con capacidad similar para unirse a péptidos encefalotogénicos y presentarlos a clonos específicos de células T (74).

Nuestro grupo durante los últimos 4 años ha estado estudiando la asociación entre ARJ y el polimorfismo de los alelos HLA DR β 1 y DQ β 1 en niños mestizos de nuestro país.

Los resultados encontrados hasta el momento son congruentes con otros hallazgos descritos en la literatura por diferentes grupos de investigadores. En la serie de pacientes estudiados por nosotros se encontró que el alelo HLA DR β 1* 1104 estuvo asociado a la susceptibilidad de desarrollar ARJ, además nuestros resultados muestran que los alelos HLA DR β 1* 1501 y HLA DQ β 1* 0602 están claramente asociados con protección (tabla 2) (75).

De particular interés resulta el hallazgo de que todos los alelos HLA DR β 1* comprometidos en la susceptibilidad en nuestro grupo de pacientes mostraron un aminoácido común en la posición 70 del motivo AA(68) VEDRRA(73) (ácido aspártico) (tabla 3). Este aminoácido no está presente en esta específica posición en los alelos HLA DR β 1* que se muestran como marcadores de protección. El motivo presente en estos últimos alelos muestra en vez de aspártico, valina en la misma posición.

Se resalta que este motivo no está presente en los alelos DQ β 1* asociados ya sea con protección o susceptibilidad. (Datos no publicados; comunicación personal G. Garavito y colaboradores).

Estos hallazgos encontrados en nuestra serie de pacientes colombianos son relevantes e importantes dado que desde el punto de vista molecular, a nivel de la presentación antigénica, el aminoácido en la posición 70 en el motivo arriba descrito, a nivel de la molécula HLA podría cautivar células TH1 o TH2, las cuales estarían comprometidas en el inmunopatología de esta entidad. Otros factores genéticos y/o ambientales en asocio con estas características moleculares expresadas a nivel de la molécula HLA comprometida en la presentación antigénica podrían interactuar y su resultado estaría influenciando el desarrollo y la expresión de la ARJ.

Tabla 2
Alelos HLA-DRβ1 en mestizos colombianos con ARJ

ALELOS DR	CASOS CON ARJ		CONTROLES		ANÁLISIS ESTADÍSTICO				
	N= 65	FA	N=65	FA	OR	X ²	p	FE	FP
DR1	17	13.0%	17	13.0%	1.0	0.0	0.58	NS	NS
DR15	3	2.3%	13	10.0%	0.194	5.77	0.0078	NS	0.26
DRβ1*1501	2	1.5%	12	9.2%	0.14	7.94	0.0048	NS	0.466
DRβ1*1502	0	0%	1	0.8%	0	PEF	1.0	NS	NS
DRβ1*1503	1	0.8%	0	0%	2.02	PEF	1.0	NS	NS
DRβ1*1602	8	6.1%	1	0.8%	8.98	PEF	0.016	0.88	NS
DRβ1*0301	9	6.9%	7	5.3%	1.32	0.071	0.4	NS	NS
DRβ1*04	28	21.5%	25	19.2%	1.21	0.28	0.59	NS	NS
DRβ1*0405	8	6.1%	5	3.8%	1.68	0.76	0.38	NS	NS
DRβ1*0407	10	7.6%	6	4.6%	1.79	1.13	0.28	NS	NS
DRβ1*0404	7	5.3%	2	1.5%	3.80	2.96	0.085	NS	NS
DR11	13	10.0%	9	6.9%	1.56	0.87	0.35	NS	NS
DRβ1*1101	3	2.3%	4	3.1%	0.74	PEF	0.5	NS	NS
DRβ1*1102	2	1.5%	4	3.1%	0.48	PEF	0.68	NS	NS
DRβ1*1104	7	5.3%	0	0%	16.79	PEF	0.013	0.93	NS
DRβ1*1107	1	0.8%	0	0%	3.02	PEF	1.0	NS	NS
DR12	2	1.5%	3	2.3%	0.66	PEF	0.5	NS	NS
DRβ1*06	3	2.3%	0	0%	7.3	PEF	0.12	NS	NS
DR13	16	12.3%	13	10.0%	1.31	0.40	0.52	NS	NS
DRβ1*1301	9	6.9%	5	3.8%	1.93	1.27	0.26	NS	NS
DRβ1*1302	3	2.3%	5	3.8%	0.581	PEF			
DRβ1*1303	3	2.3%	3	2.3%	1.0	PEF	0.72	NS	NS
DRβ1*1305	1	0.8%	0	0%	3.02	PEF	1.0	NS	NS
DR14	5	3.8%	15	11.5%	0.28	5.86	0.015	NS	0.51
DRβ1*1401	4	3.1%	6	4.6%	0.645	0.43	0.51	NS	NS
DRβ1*1402	1	0.8%	9	6.9%	0.1	6.88	0.0087	NS	0.49
DRβ1*0701	18	13.8%	14	10.8%	1.4	0.66	0.41	NS	NS
DRβ1*0802	8	6.1%	9	6.9%	0.87	0.07	0.79	NS	NS
DRβ1*1001	0	0%	1	0.8%	0	PEF	1.00	NS	NS

N = Número de sujetos estudiados
 FA = Frecuencia alélica
 OR = Razón de disparidad
 PEF = Se aplica prueba exacta de Fisher
 p = Probabilidad
 FE = Fracción etiológica
 FP = Fracción Preventiva
 NS = no-significancia

Tabla 3

Aminoácidos de la tercera región hipervariable del EXON DRβ1 asociados con protección o susceptibilidad, en una muestra de pacientes mestizos colombianos con ARJ

ALELO DRβ1*	SECUENCIA AA	Posición del aminoácido							ARJ	ARJ
		67	68	69	70	71	72	73	Susceptibilidad	Protección*
1501	IVEQARA	Ile	Val	Glu (-)	Gln (N)	Ala	Arg	Ala		XXXX
1402	LVEQRRRA	Leu	Val	Glu (-)	Gln (N)	Arg	Arg	Ala		XXXX
1104	LVEDRRA	Leu	Val	Glu (-)	Asp (-)	Arg	Arg	Ala	XXX	
O701 (*)	IVEDRRE	Ile	Val	Glu (-)	Asp (-)	Arg	Arg	Gly	XXXX	
1602 (**)	LVEDRRA	Leu	Val	Glu (-)	Asp (-)	Arg	Arg	Ala	XXXX	

(N) = Sin carga eléctrica

(-) = Carga negativa

(*) = ARJ sistémica

(**) = ARJ poliarticular

Referencias

1. Grom, AA, Giannini, EH and Glass, DN. Juvenile Rheumatoid Arthritis and Trimolecular complex, HLA T cell receptor and from Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 1994; 37(5):601-607.
2. Vehe, RK, Begovich, AB and Nepom, BS. HLA susceptibility genes in Rheumatoid factor positive juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl.* 1990; 26:11-5.
3. Sakkas, LI and Platsoucas, CD. Immunopathogenesis of juvenile rheumatoid arthritis: role of T cells and CMH. *Immunol Res* 1995;14(3): 218-36.
4. Nepom, BS, Nepom, GT, Mickelson, E, Schaller, JG, Antonelli, P and Hansen, JA. Specific HLA-DR4-associated histocompatibility molecules characterize patients with seropositive juvenile rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1984; 74(1):287-91.
5. Tiwari, JL. and Terasaki, PI. In Springer-Verlag (editor). *HLA and disease associations.* New York, Springer-Verlag; 1985: 472.
6. Garavito, G, Egea, E, Malagón, C, De la Cruz, O, Uribe, O, Ramírez, LA, Navarro, E, Angel, L, Iglesias, A. Patrones genéticos el MCH : alelos del HLA DRβ1 y HLA DQβ1* en niños mestizos colombianos con Artritis Reumatoidea Juvenil. *Revista Colombiana de Reumatología* 1999; 6(2): 219.
7. Garavito, G, Egea, E, Malagón, C, De la Cruz, O, Uribe, Oscar, Ramírez, LA, Navarro, E and Iglesias, A. Genetics patterns of CMH: HLA-DRβ1- and HLA-DQβ1* alleles in colombian mestizo children with Juvenile Rheumatoid Arthritis (JRA). In ACR 63RD Annual Scientific Meeting, 1999, Memorias en la revista *Arthritis and Rheumatism.* Atlanta,