

Caracterización inmunogenética de pacientes con espondilitis anquilosante en Argentina

Gustavo Citera¹, Emilce E. Schneeberger¹, José A. Maldonado Cocco¹, Juan-Manuel Anaya²

¹Instituto de Rehabilitación Psicofísica, Buenos Aires, Argentina, ²Centro de Estudio de Enfermedades Autoinmunes (CREA) Universidad de Rosario, Corporación para Investigaciones Biológicas, Bogotá, Colombia.

Resumen

Objetivo: Evaluar la influencia del polimorfismo genético del *HLA clase I y II*, *TNF α* e *IL1 β* en pacientes argentinos con espondilitis anquilosante (EA).

Material y métodos: Este fue un estudio de asociación en el que se incluyeron pacientes con EA clasificados de acuerdo a los criterios de New York modificados. Se registraron datos demográficos y clínicos de la enfermedad. Un grupo no relacionado, pero pareado, de 154 personas fue utilizado como grupo control. La genotipificación fue realizada utilizando técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa. Se evaluaron alelos *HLA clase I (A y B)* y *II (DR)*, polimorfismos de nucleótido simples del *TNF (-238 y 308)* y del gen *IL1 β (-511 y +3954)*.

Resultados: Se incluyeron 52 pacientes con EA, de los cuales 90,4% fueron varones, con una edad mediana de 44 años rango intercuartilo (RIQ) 34-53. Confirmamos la asociación del *HLA-B27* con la enfermedad (90,4% vs. 5,2%, con OR: 171,5, $p = 1 \times 10^{-30}$). El subtipo más frecuente tanto en pacientes como en controles fue el *B27*05* (85%). La comparación de alelos de clase A y B no B27 entre controles y pacientes no mostró diferencias significativas. La comparación entre los alelos clase II evidenció una mayor frecuencia del *HLA-DR1* (59,6% vs. 20%, OR: 6,1, $p = 1 \times 10^{-5}$). El genotipo *TNF -308 GA* fue un factor de riesgo (94% vs. 81%, OR: 3,96, $p = 0,02$),

Summary

Objective: To determine the influence of the genetic polymorphism of *HLA class I and II*, *TNF α* and *IL1 β* in Argentinean patients with ankylosing spondylitis.

Material and Methods: This was an association study where AS patients according to modified New York criteria were included. We recorded demographic and clinical data of the disease. A non related but age and sex matched group of 154 people was used as controls. Genotyping was performed using polymerase chain reaction (PCR) techniques. We evaluated *HLA class I (A and B)* and *class II (DR)*, single nucleotide polymorphism of the *TNF α (-238 and 308)* and *IL1 β (-511 and +3954)*.

Results: We included 52 patients with AS of whom 90.4% were male with a median age of 44 years (IQR 34-53). We confirm the association of *HLA-B27* with disease (90.4% vs 5.2%. OR 171.5, $p = 1 \times 10^{-30}$). The most common subtype in both patients and controls was *B27*05* (85%). Comparison between class A and B alleles non B27 between controls and patients did not show significant differences. Comparison between class II alleles showed a statistically significant higher frequency of *HLA-DR1* in AS patients (59.6% vs. 20% OR 6.1, $p = 1 \times 10^{-5}$). *TNF -308 GA* genotype was a risk factor for AS (94% vs. 81% OR 3.96 $p = 0.02$), while the -238 GA genotype had a protective effect and was more frequently observed in

Correspondencia

Gustavo Citera. IREP, Echeverría 955, Capital Federal.
gustavocitera@gmail.com

mientras que el genotipo -238 GA fue protector (53% vs. 76%, OR: 0,19, $p > 0,0001$). El alelo *IL1β*-511C se asoció con la EA (66% vs. 53%, OR: 1,74, $p = 0,03$).

Conclusión: En el presente estudio, hemos replicado por primera vez en la población argentina la influencia del *HLA*, *TNF* e *IL1β* en la EA. Estos hallazgos permiten una comprensión homogénea de la fisiopatogenia de la enfermedad.

Palabras clave: HLA-B27, genética, espondilitis anquilosante.

Introducción

Las espondiloartropatías seronegativas (EASN) incluyen un grupo de enfermedades de etiología aún desconocida, que comparten ciertas características clínicas, serológicas y genéticas¹. La espondilitis anquilosante (EA) es el prototipo de estas enfermedades y es bien conocida la importante carga genética involucrada en el desarrollo de la misma, siendo los genes del sistema de histocompatibilidad (HLA) los más comúnmente asociados^{2,3}. En el año 1972, Brewerton y col. descubrieron la asociación entre el *HLA-B27* y la espondilitis anquilosante, observando este alelo en el 96% de los pacientes con EA versus 7% de la población general⁴. Si bien el *HLA-B27* es el principal alelo asociado con la EA en más del 95% de los caucásicos, solamente del 1 al 5% de los sujetos *B27* positivos desarrollan la enfermedad⁵⁻⁷.

Existe evidencia en diferentes grupos étnicos, que otros alelos del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y II pueden influir sobre la susceptibilidad a la enfermedad y sus manifestaciones clínicas. Así, entre los antígenos clase I, es clásica la asociación con el complejo CREG (*B7*, *B22*, *B40* y *B42*) descrito por Khan en 1983³. También se han publicado asociaciones con otros alelos como *B60*, *B40* y *B15*, *DR1*, *DR8*, así como con polimorfismos en diferentes genes de citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (*TNF*) e interleuquina 1β (*IL1β*)⁸⁻¹⁶. En la actualidad, el amplio estudio del genoma humano en pacientes con EA permitió detectar posibles áreas sugestivas o significativamente ligadas, ubicadas en sitios diferentes al complejo mayor de histocompatibilidad¹⁷. Los estudios de posibles genes candidatos en EA son escasos, pero en 2 cohortes caucásicas se observó asociación con el locus *CYP2D6* ubicado en el cromosoma 2¹⁸. Adicionalmente, en algunos estudios de casos y controles en población

caucásica de Canadá y china de Taiwan, se demostraron asociaciones con genes del grupo de la *IL1β*^{19,20}.

Conclusion: In the present study, we have replicated for the first time in the Argentinean population, the influence of *HLA*, *TNFα*, and *IL1β* in patients with AS. These findings allow a uniform understanding of the physiopathology of the disease.

Key words: HLA-B27, genetics, ankylosing spondylitis.

caucásica de Canadá y china de Taiwan, se demostraron asociaciones con genes del grupo de la *IL1β*^{19,20}.

Dado que la influencia que puede tener el polimorfismo genético sobre una enfermedad varía de acuerdo a la etnicidad y geografía, los estudios de replicación son importantes para la comprensión de la fisiopatología de enfermedades complejas como la EA. Por tal motivo, el presente trabajo examinó la influencia del polimorfismo de genes HLA clase I y II, *TNF* e *IL1β* en la presentación y curso de la EA en pacientes argentinos.

Pacientes y métodos

Estudiamos pacientes consecutivos con EA, según criterios de New York modificados²¹.

Todos los pacientes dieron su consentimiento para la participación en el estudio y el mismo fue aprobado por el comité de docencia del Instituto de Rehabilitación Psicosfísica (IREP). Consignamos datos demográficos (edad, sexo) y clínicos de la enfermedad como edad de comienzo, duración de la enfermedad, tipo de EASN, compromiso articular periférico y/o de caderas, compromiso ocular, presencia y grado de sacroileítis.

Un grupo no relacionado de 154 personas pareadas por edad, sexo, geografía y etnicidad fue utilizado como control en la comparación de los datos genéticos.

En todos los individuos se extrajeron muestras de sangre venosa periférica, la cual fue conservada con EDTA a -20°C hasta su análisis. Para la tipificación genética, se extrajo ADN de células mononucleares desde sangre total, luego del fraccionamiento con Ficoll Ipaque, los alelos clase I (A y B) y II (DR) fueron analizados por PCR y oligotipificación como fue descrito en extenso previamente²². La tipificación de polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) del *TNF* en las posiciones -238

y -308 se realizó también por PCR, tal como fue señalado previamente²³. Se utilizó un aparato iCycler de BioRad. La PCR fue seguida de una digestión con enzimas de restricción. El polimorfismo del TNF -308 se analizó utilizando el método de polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP)... Brevemente: Un fragmento de 107 bp se amplificó con un primer pionero 5'AAGGCAATAGGTTTGTGAGGGCCAT 3' y revertidamente con un primer 5'TCCTCCCTGCTCCGATTC 3' (Invitrogen Life Technologies, Frederick MD). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 5 minutos a 94°C seguido de 3 a 5 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C y 1 minuto a 72°C. Se realizó una extensión final a 72°C por 10 minutos y los productos fueron digeridos enzimáticamente por incubación con la enzima NcoI (Promega, Bogotá Colombia) a 37°C por 12 horas. El polimorfismo en la posición -238 del *TNF* fue definido usando PCR-RFLP según lo desarrollado por Gallager y col²⁴. Los primeros fueron desarrollados para amplificar un producto de 192 bp de la siguiente manera: primer de inicio 5'TTCCTGCATCCTGTCTGTCTGGAAGT AAGAA 3' y el primer reverso 5'AGCATACCCCTCA CACTCCCATCCTCCCCGCATC 3' (Invitrogen Life Technologies, Frederick MD); con condiciones de PCR similares a las utilizadas para el SNP -308. Los productos obtenidos en este caso fueron sometidos a digestión enzimática con la enzima Bam HI (Promega, Bogotá Colombia), a 37°C por 2 horas. Los fragmentos de restricción 87 bp, y 20 bp para -308 G y 107 bp para -308A^a; 164 bp y 28 bp para -238G y 192 bp para -238A^a fueron analizados en gel de agarosa con tinte de bromuro de etidinio al 3% (Seakem LE Agarose Bio Whittaker, Rockland ME). Se incluyeron controles positivos y negativos en cada análisis de muestras.

La genotipificación de los SNPs de *IL1β* -511 y +3954. La tipificación de T-511 C SNP se realizó por PCR-RFLP, utilizando sebaadores específicos y condiciones de PCR previamente establecidas y descriptas en detalle anteriormente²⁵.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS versión 10.0 (SPSS, Chicago Illinois).

La frecuencia de alelos y haplotipos fue calculada por conteo directo. Las diferencias entre frecuencias de los diferentes alelos entre pacientes y controles se realizaron por test de Chi cuadrado, excepto cuando el número de

alguno de los alelos en la tabla de 2x2 fue menor a 5, en cuyo caso se utilizó test exacto de Fisher. Se calcularon las razones de disparidad [odds ratio (OR)] y los intervalos de confianza (IC) del 95%. El valor de significancia p fue corregido por el número de alelos examinados para los de clase I y II. El equilibrio de Hardy Weinberg y el desequilibrio de ligamiento fueron evaluados utilizando el software Arlequin. Un valor de p menor a 0,05 fue considerado significativo.

Resultados

Incluimos 52 pacientes con EA, 47 eran varones (90,4%), con una edad mediana de 44 años rango intercuartilo (RIQ: 34-53). La edad mediana de inicio de la enfermedad fue de 22 años (RIQ: 18-21) y el tiempo mediano de evolución de la enfermedad de 17 años (RIQ: 10-28).

Veinte (38,5%) pacientes habían tenido compromiso periférico, 15 (29%) compromiso de caderas y 15 uveítis. El 77% de nuestros pacientes presentaban sacroileítis grado IV. Cuatro de los pacientes tenían antecedentes de psoriasis cutánea y 1 de enfermedad inflamatoria intestinal (Tabla 1). Tal como lo esperado, el *HLA-B27* se asoció con la EA (Figura 1). El subtipo más frecuente tanto en pacientes como en controles fue el B27*05 (85%).

Sexo:	Masculino	47 (90,4%)
	Femenino	5 (9,6%)
Edad actual mediana (RIQ)		44 años (34-53)
Edad inicio EA mediana (RIQ)		22 años (18-31)
Tpo evolución mediana (RIQ)		17 años (10-28)
Compromiso periférico		20 (38,5%)
Compromiso de caderas		15 (29%)
Uveítis		15 (29%)
Sacroileítis Grado 4		40 (77%)
Tipo de EA:	Pura	43 (82,7%)
	APs	4 (7,7%)
	EAJ	4 (7,7%)
	EII	1 (1,9%)

Tabla 1. Características demográficas y clínicas en 52 pacientes con espondilitis anquilosante.

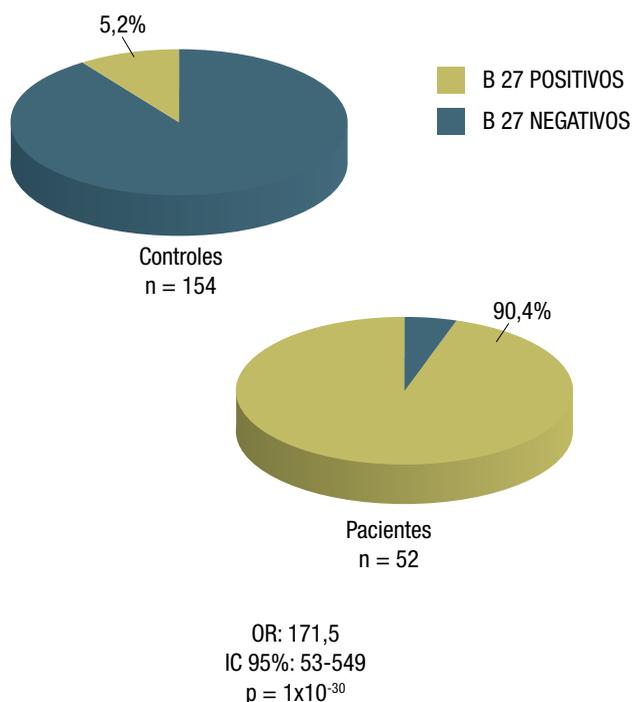


Figura 1. Frecuencia de HLA-B27 en pacientes con espondilitis anquilosante y controles.

La comparación de alelos HLA de clase A no mostró diferencias significativas, pero el *A11* y el *A32* mostraron una mayor frecuencia en pacientes y el *A23* fue más frecuente en controles (Tabla 2).

En la comparación de otros alelos de clase B no *B-27*, de la misma manera que en la comparación anterior, hubo una tendencia a mayor frecuencia del *B40* en pacientes y del *B44* en controles, pero sin alcanzar significancia estadística (Tabla 3).

Por último, la comparación entre los alelos clase II, evidenció una mayor frecuencia estadísticamente significativa del *HLA-DR1* en pacientes (59,6%) con respecto a controles (19,5%) (Tabla 4).

También se observó que el *DR15* fue más frecuente en controles que en pacientes con una *p* corregida de 0,02 y un OR de 0,08 (IC 95% 0,01-0,6), comportándose como un alelo protector. Dada la alta frecuencia de *DR1* en nuestra población, probamos el rol protector del *DR15*, excluyendo a los pacientes *DR1* positivos; pero en estas circunstancias el *DR15* no mantuvo su efecto protector.

Luego realizamos un análisis con la finalidad de detectar asociaciones entre los alelos más frecuentes en nuestra población de espondilíticos, es decir el *A11*, *B27*, *B40* y

HLA-A	CONTROLES n = 154 n (%)	PACIENTES n = 52 n (%)	Pc	OR (IC 95%)
A1	32 (20,8)	6 (11,5)	NS	
A2	70 (45,5)	26 (50)	NS	
A3	28 (18,2)	10 (19,2)	NS	
A11	24 (15,6)	12 (23,1)	NS	1,61 (0,7-3,5)
A23	13 (8,4)	0	NS	0,73 (0,7-0,8)
A24	36 (23,4)	12 (23,1)	NS	
A25	5 (3,2)	1 (1,9)	NS	
A26	15 (9,7)	7 (13,5)	NS	
A29	17 (11)	2 (3,8)	NS	
A30	13 (8,4)	1 (1,9)	NS	
A31	6 (3,9)	4 (7,7)	NS	
A32	10 (6,5)	8 (15,4)	NS	2,6 (0,9-7,0)
A33	2 (1,3)	1 (1,9)	NS	
A68	14 (9,1)	6 (11,5)	NS	
A74	1 (0,6)	0	NS	
HOMOCIGOTAS	22 (14,3)	8 (15,4)	NS	

Tabla 2. Comparación de alelos de clase A entre controles y pacientes con EA.

HLA-B	CONTROLES n = 154 n (%)	PACIENTES n = 52 n (%)	Pc	OR (IC 95%)
B7	17 (11)	2 (3,8)	NS	
B8	18 (11,7)	2 (3,8)	NS	
B13	8 (5,2)	2 (3,8)	NS	
B14	14 (9,1)	4 (7,7)	NS	
B15	2 (1,3)	1 (1,9)	NS	
B18	19 (12,3)	2 (3,8)	NS	
B27	8 (5,2)	47 (90,4)	1x10⁻³⁰	171,5 (53-549)
B35	39 (25,3)	7 (13,5)	NS	
B37	4 (2,6)	1 (1,9)	NS	
B38	23 (14,9)	3 (5,8)	NS	
B39	13 (8,4)	3 (5,8)	NS	
B40	5 (3,2)	5 (9,6)	NS	3,1 (0,8-11)
B41	8 (5,2)	0	NS	
B42	1 (0,6)	0	NS	
B44	33 (21,4)	2 (3,8)	0,06	0,4 (0,03-0,6)
B45	4 (2,6)	0	NS	
B46	0	1 (1,9)	NS	

Tabla 3. Comparación de alelos de clase B entre controles y pacientes con EA.

HLA-DR	CONTROLES n = 154 n (%)	PACIENTES n = 52 n (%)	Pc	OR (IC 95%)
DR1	30 (19,5)	31 (59,6)	1x10⁻⁵	6,1 (3-12)
DR3	19 (12,3)	5 (5,6)	NS	
DR4	39 (25,3)	10 (19,2)	NS	
DR7	35 (22,7)	11 (21,2)	NS	
DR8	10 (6,5)	8 (15,4)	NS	
DR9	9 (5,8)	2 (3,8)	NS	
DR10	7 (4,5)	1 (1,9)	NS	
DR11	50 (32,5)	12 (23,1)	NS	
DR12	3 (1,9)	3 (5,8)	NS	
DR13	25 (16,2)	7 (13,5)	NS	
DR14	20 (13)	2 (3,8)	NS	
DR15	28 (18,2)	1 (1,9)	0,02	0,08 (0,01-0,6)
DR16	12 (7,8)	4 (7,7)	NS	
DR17	3 (1,9)	0	NS	
HOMOCIGOTAS	18 (11,6)	7 (13,5)	NS	

Tabla 4. Comparación de alelos de clase DR entre controles y pacientes con EA.

DR1 y ciertas características clínicas de la enfermedad como edad de inicio, sexo, compromiso periférico, de caderas y uveítis. Encontramos que en los pacientes *B40* positivos, la edad de inicio es significativamente mayor en comparación a los *B40* negativos ($p = 0,03$). En cuanto a los pacientes *B27* positivos, al igual a lo referido en la literatura, la edad de inicio es significativamente menor ($p = 0,01$). Para el resto de las características estudiadas, no se encontraron asociaciones significativas con los alelos analizados (Tablas 5 y 6).

En los pacientes y controles testeados para polimorfismo del *TNF*, se observó un claro desbalance en relación a la susceptibilidad para la enfermedad. El genotipo GA del *SNP -308* fue significativamente más frecuente en pacientes (94%) que en controles (81%) [OR: 3,96 (IC 95% 1,14-13,70), $p = 0,02$], mientras que el genotipo GA del *SNP -238* fue protector observándose con mayor frecuencia en controles (76%) que en pacientes (53%) [OR: 0,19 (IC 95% 0,1-0,37), $p > 0,0001$].

Con respecto al polimorfismo del gen *IL1 β* , el alelo

-511C se asoció con la EA, observándose con una frecuencia del 66% en pacientes vs. 53% en controles [OR: 1,74 (IC 95% 1,1-2,82), $p = 0,03$], el genotipo CC mostró una tendencia a mayor susceptibilidad pero sin alcanzar significancia estadística. El genotipo *IL1 β +3954* no mostró influencia significativa.

Discusión

Tanto la prevalencia del *HLA-B27* como la frecuencia de los distintos subtipos del mismo son comparables a los de otras poblaciones caucásicas. El *HLA-B27* es el factor genético que contribuye con más fuerza para el desarrollo de EA; sin embargo, otros estudios soportan el rol de genes adicionales^{3,9,15,17,19}. Nuestros resultados sustentan que otros genes además del *HLA-B27*, se relacionan con la susceptibilidad a EA en la población argentina. Hemos observado que el *HLA-DR1* confiere mayor susceptibilidad a la enfermedad (OR: 6,1) y el hecho de encontrar este alelo tanto en individuos *B27* positivos como en negativos, per-

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	A 11		B 40	
	POSITIVO n = 12	NEGATIVO n = 40	POSITIVO n = 5	NEGATIVO n = 47
Edad de inicio <i>mediana</i>	20,5 a	23 a	30 a	21 a*
Sexo masculino	11 (92%)	36 (90%)	4 (80%)	43 (91%)
Compromiso periférico	3 (25%)	11 (27%)	2 (40%)	18 (38%)
Compromiso de caderas	6 (50%)	9 (23%)	1 (20%)	14 (30%)
Uveítis	6 (50%)	9 (23%)	2 (40%)	13 (28%)

* $p = 0,03$

Tabla 5. Asociación entre alelos y características clínicas de la enfermedad.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	B 27		DR 1	
	POSITIVO n = 47	NEGATIVO n = 5	POSITIVO n = 31	NEGATIVO n = 21
Edad de inicio <i>mediana</i>	21 a	30 a*	23 a	19 a
Sexo masculino	43 (91%)	4 (80%)	28 (90%)	19 (90%)
Compromiso periférico	18 (38%)	2 (40%)	10 (32%)	10 (48%)
Compromiso de caderas	14 (30%)	1 (20%)	9 (30%)	6 (29%)
Uveítis	15 (32%)	0	11 (35%)	4 (19%)

* $p = 0,01$

Tabla 6. Asociación entre alelos y características clínicas de la enfermedad.

mite sugerir que este gen se hereda en forma independiente al *B27*, como ya fue descrito por otros autores^{26,27}.

El *HLA-DR1* ha sido reportado previamente en pacientes con EA. Los gemelos dicigóticos llevando *B27* y *DR1* son más concordantes para esta enfermedad que los gemelos *B27* positivos *DR1* negativos ($p = 0,039$)¹². En un estudio francés de familias con EA, se encontró que el haplotipo *HLA-DRB1*Q101/ DQB*Q501* era transmitido preferencialmente dentro de familias a chicos con EA, independientemente del *HLA-B27*²⁶. Armstrong y col., en un estudio de pacientes británicos, encontraron que 48,5% de los pacientes con EA eran *HLA-DR1* positivos vs. 14,9% de controles sin la enfermedad²⁷. Brown y col. encontraron que el *HLA-DR1* puede tener un efecto débil sobre la susceptibilidad a EA, independientemente del *HLA-B27*¹⁷. Por último, un estudio reciente en México detectó una asociación significativa del *HLA-DR1* y *HLA-B15* con EASN, la cual también fue independiente del *HLA-B27*; además, la presencia del *HLA-DR1* se relacionó con un comienzo más tardío de la enfermedad¹¹. Varios estudios previos demostraron la asociación de EA con polimorfismo de los genes *TNF* e *IL1 β* ²⁷⁻³¹, lo cual también ha sido confirmado en pacientes argentinos.

En nuestra población, el *HLA-DR15* se comportó como un alelo protector, al igual que el genotipo GA del *TNF-238*.

Con respecto a las características clínicas de la enfermedad, se ha observado que ciertos genes determinan su severidad y patrón de expresión fenotípica. Es así como varios estudios han relacionado la presencia de *HLA-B27* con mayor frecuencia de artritis periférica, entesitis, uveítis, enfermedad más severa, progresión más rápida de la sacroileítis y edad de inicio de la enfermedad más temprano^{3,11,14}. También, como referimos anteriormente, ha sido documentada la asociación del *HLA-DR8* a la presencia de uveítis en pacientes con EA¹⁵.

En conclusión, en nuestra población de la ciudad de Buenos Aires, la prevalencia *HLA-B27* en pacientes con EA es alta (90,4%). Además, el *HLA-DR1* confiere en forma independiente seis veces más probabilidad de padecer la enfermedad, mientras que el *HLA-DR15* podría comportarse como un alelo protector. La edad de inicio de la enfermedad es menor en los individuos *HLA-B27* positivos y mayor en los *HLA-B40* positivos. Hemos replicado también la influencia del *TNF* e *IL1 β* sobre la enfermedad.

Los hallazgos de este estudio inmunogenético en una población representativa de pacientes argentinos con EA,

ofrecen una visión homogénea de la inmunogenética de la enfermedad con respecto a otras poblaciones y contribuyen en un mejor entendimiento de la patogenia de esta enfermedad.

Bibliografía

1. Citera G: Espondiloartropatías seronegativas. Conceptos generales. En Reumatología 2000, JA Maldonado Cocco: Editor. 1era edición:331-335. Americana de Publicaciones, Buenos Aires, Argentina.
2. Calin A, Elswood J, Riggs S, Skevington S: Ankylosing Spondylitis. An analysis review of 1500 patients. The changing pattern of disease. J. Rheumatol 1988;15:1234-1238.
3. Khan MA: Update on Spondyloarthropathies. Ann Intern Med. 2002;136:896-907.
4. Brewerton DA: Discovery: HLA and disease. Curr Opin Rheumatol 2003;15:369-373.
5. López de Castro, et al: The pathogenic role of HLA-B27 in chronic arthritis. Curr Opin Immunol 1998;10:59-66.
6. González S, et al: Immunogenetics, HLA-B27 and spondyloarthropathies. Curr Opin Rheumatol 1999;11:257-264.
7. Alvarez I, et al: HLA-B27 and Immunogenetics of spondyloarthropathies. Curr Opin Rheumatol 2000;12:248-253.
8. Laurence, et al: Investigating the genetic basis for ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum 1994;37:1212-1220.
9. López-Larrea C, Sujurachato K, Mehra NK, et al: HLA B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis: evidence for a new association. Tissue Antigens 1995;45:169-76.
10. Brown MA, et al: Ankylosing spondylitis in West Africans-evidence for a non-HLA-B27 protective effect. Ann Rheum Dis 1997;56:68-70.
11. Vargas Alarcón G, et al: Effect of HLA-B and HLA-DR genes on susceptibility to and severity of spondyloarthropathies in Mexican patients. Ann Rheum Dis 2002; 61:714-717.
12. Brown MA: Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins. Arthritis Rheum 1997;40:1823-1828.
13. Skomsoll JF: HLA-B27 negative spondylitis in a father and a son. Scand J Rheumatol 1995;24: 321-322.
14. Brown MA: The effect of HLA-DR genes on susceptibility to and severity of ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum 1998;41:460-465.
15. Monoware Islam SM: HLA-DR8 and acute anterior uveitis in ankylosing spondylitis. Arthritis Rheum 1995;38:547-550.
16. Said-Nahal R: The role of HLA genes in familial spondyloarthropathy a comprehensive study of 70 multiplex families. Ann Rheum Dis 2002;61:201-206.
17. Brown MA, Pile KD, Gibson K, et al. A genome wide screen for susceptibility loci in ankylosing Spondylitis. Arthritis Rheum 1998;41:588-595.
18. Beyeler C, Armstrong M, Bind HA, et al: Relationship between genotype for the cytochrome P450 CY92D6 and susceptibility to ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1996;55:66-68.
19. Macksymowych WP, Rohman P, Reeve JP, Gladman DD,

- Peddle L, Inman R: Association of the IL 1 gene cluster with susceptibility ankylosing spondylitis. An analysis of three Canadian populations. *Arthritis Rheum* 2005;54:974-985.
20. Jin L, Zhang G, Akey JM, et al: Lack of linkage of IL 1 RN genotypes with ankylosing spondylitis susceptibility. *Arthritis Rheum* 2004;50:3047-48.
 21. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A: Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis: a proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum* 1984;27:361-368.
 22. Olerup O, Zetterquist H: HLA DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;39:225-235. Laivoranta JI, et al: HLA frequencies in HLA-B27 negative patients with reactive arthritis. *Clin Expl Rheumatol* 1995;13:637-640.
 23. Correa PA, Gómez LM, Cadena J, Anaya J: Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism. *J Rheumatol* 2005;32:219-24.
 24. Gallagher G, Eskade J, Oh HH, et al: Distribution of polymorphic elements within the tumor necrosis factor locus in a Canadian population. *Inmunogenetics* 1997;45:188-194.
 25. Camargo JF, Correa PA, Castiblanco J, Anaya JM: Interleukin-1beta polymorphisms in Colombian patients with autoimmune rheumatic diseases. *Genes Immun* 2004;5:609-14.
 26. Nahal R: Genetic Investigation in familial spondyloarthropathy (Spa) with focus on HLA region using transmission disequilibrium test. *Arthritis Rheum* 1996;13:S573 (Abst).
 27. Armstrong RD: Histocompatibility antigens in psoriasis, psoriatic arthropathy and ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1983;442:142-146.
 28. Verjons G, Messer G, Weiss EH, et al: Polymorphism of the tumor necrosis factor region in relation to disease. An overview. *Rheum Dis Clin North Am* 1992;18:177-185.
 29. Höhler T, Schoper T, Schneider PM, et al: Association of different TNF α promoter alleles frequencies with ankylosing spondylitis in HLA B27 individuals. *Arthritis Rheum* 1998;41:1489-92.
 30. Mc Gary F, Neilly J, Anderson N, Surrock R, Field M: A polymorphism within the interleukin 1 receptor antagonist (ILRA) gene is associated with ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:1359-64.
 31. Vender Faard T, Crusius JB, García González, et al: Interleukin 1 β and interleukin 1-receptor antagonist gene polymorphism in the susceptibility to ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:1419-23.