PROYECTO: BASES GENÉTICAS DE LA ENFERMEDAD DE BEHÇET

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Francisca González Escribano. Hospital Virgen del Rocío. Sevilla.

INVESTIGADOR HOSPITAL SAN CECILIO: Norberto Ortego Centeno. Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas.

ÁMBITO DEL ESTUDIO: Estudio multicéntrico, promovido por la Asociación Andaluza de Enfermedades Autoinmunes (AADEA) y con participación de varios hospitales de Andalucía y del resto de España.

ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

La Enfermedad de Behçet (EB) es una enfermedad multisistémica de curso crónico y recidivante, caracterizada por la presencia de aftas orales y otras manifestaciones que incluyen: aftas genitales, inflamación ocular, lesiones cutáneas, afectación neurológica, vascular o articular, entre otras[1]; todas ellas, a excepción de la afectación ocular, autolimitadas[2]. Habitualmente se desarrolla en la tercera o cuarta década de la vida, siendo infrecuente por encima de los 50 años y en la infancia[3]

La distribución de la EB en la población presenta una gran variación según la geografía y el grupo étnico considerado. Es especialmente frecuente, aunque con distinta prevalencia, en los países que se sitúan en la denominada Ruta de la Seda y poco frecuente en los países occidentales. Así, en Turquía la prevalencia es de 80-420/10^5 habitantes, en Japón de 70-85/10^5, mientras que en los países occidentales oscila entre el 0,12 y el 0,64/10^5 [4]. En España los datos son escasos, pero se calcula que puede situarse en torno al 0,6-0,7%[5, 6].

La EB es algo más frecuente en mujeres respecto a varones en Japón y Corea, pero es más frecuente en varones en los países del Oeste Medio[2]. En España[7], como en otros países occidentales[8], parece predominar en mujeres.

Las manifestaciones clínicas, aunque universales, varían en gravedad y frecuencia según la población afectada, siendo en general el pronóstico peor en los varones y en aquellos con un inicio más temprano de la enfermedad[1]. Incluso en una misma población parece que, con el paso del tiempo, la enfermedad ha ido modificando sus características. Así por ejemplo, en Japón, uno de los países en los que la enfermedad tiene mayor prevalencia, la EB ha pasado de ser la causa del 23,2% de las uveítis en 1981-83, a serlo de tan solo el 5,8% en 1999-2001[9]; además, la gravedad de los ataques también parece haberse atemperado, siendo cada vez menos frecuente la pérdida de visión como consecuencia de la enfermedad[10]. Algo parecido se ha observado en Turquía, donde las probabilidades de perder visión como consecuencia de los ataques de uveítis disminuyeron notablemente en los 90 respecto a los 80[11]. Aunque estos cambios pueden deberse en buena parte al mejor conocimiento de la enfermedad y, por tanto, a un mejor tratamiento de la misma, parece indudable que también se debe a la modificación de los factores ambientales que, actuando al unísono con los factores genéticos, son fundamentales en el desarrollo de la enfermedad como lo pone de manifiesto el hecho de que los sujetos que emigran de zonas de alta prevalencia a otras

de baja prevalencia, como es el caso de los turcos que emigran a Alemania o los japoneses que lo hacen a Hawai o California, y también sus descendientes, tienen un riesgo intermedio de desarrollar la enfermedad[2].

Aunque habitualmente la EB se incluye entre las vasculitis con capacidad de afectar a arterias y venas, lo cierto es que la histología difiere de la encontrada en las clásicas vasculitis necrotizantes[1].

La patogenia es desconocida. A lo largo del tiempo se han implicado diferentes agentes infecciosos en la etiología de la EB, entre ellos el herpes virus tipo 1 o el *Streptococcus sanguis*, pero, hasta la fecha no hay evidencias sólidas que lo sustenten[3]

Diferentes estudios han encontrado niveles altos de diversas citoquinas proinflamatorias, como IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, pero, en general, sin un patrón patognomónico[12]. En general la EB tiende a relacionarse con una respuesta dominante Th-1[13], correlacionándose la intensidad de esta respuesta con la actividad clínica[14]. No obstante, no se ha podido demostrar la participación relevante de linfocitos T o B en el desarrollo de la enfermedad, aunque algunos autores han encontrado algún papel de los anticuerpos anti células endoteliales, contra la proteína transportadora de selenio o el antígeno S de la retina[1]. Por otra parte, los intentos para encontrar un defecto congénito o adquirido en el sistema de la coagulación, sugerido por el hecho de que hasta un tercio de los pacientes desarrolla tromboflebitis, superficial o profunda, han sido baldíos, postulándose un posible defecto de la fibrinólisis como responsable de este aspecto de la EB[1].

Aunque clásicamente se ha querido clasificar como una enfermedad autoinmune, en los últimos años se ha pensado que posiblemente podría encuadrarse mejor junto a los síndromes autoinflamatorios[15], un grupo de enfermedades hereditarias caracterizadas por la aparición de episodios inflamatorios en diferentes localizaciones sin desencadenante aparente y de forma recidivante. Aunque, en general, se trata de enfermedades en las que la fiebre de curso en brotes no suele faltar y que responden a una herencia monogenica[16], cada vez son más las enfermedades que se piensa pueden incluirse en este grupo de patologías, como es el caso del síndrome de Schnitzler, la artritis idiopática juvenil de curso sistémico, la enfermedad de Still del adulto o la enfermedad de Crohn[16].

En cuanto al componente genético, la relación de la EB con HLA-B51 es conocida desde hace tiempo[17], sin embargo, esta asociación no es absoluta. Así, en nuestra población, el 37% de los pacientes con EB son HLA-B51, mientras que, la

frecuencia de esta especificidad HLA en nuestra población general es de alrededor del 15%[18]. Por tanto, un elevado porcentaje de pacientes con EB no poseen este factor genético de riesgo y por otro lado, un gran porcentaje de individuos con este factor nunca desarrollarán la enfermedad. El HLA-B51 explica alrededor de un 20% de la heredabilidad de la enfermedad. En este sentido, los resultados de un trabajo de escaneo del genoma realizado en familias multicaso, de origen turco, con marcadores microsatélites sugieren que hay más de 16 locus asociados con la EB fuera de la región HLA[19]. Factores medio-ambientales tales como agentes infecciosos podrían actuar como disparadores de la enfermedad en individuos genéticamente susceptibles. En este sentido, los genes relacionados con la inmunidad innata son buenos candidatos a condicionar la susceptibilidad a la EB. Se conocen 3 grandes familias de moléculas sensoras de la inmunidad innata que, en conjunto, se denominan receptores de reconocimiento de patrones (pattern recognition receptors, PRRs). La primera de estas familias de PRRs es la denominada *Toll-like receptors* (TLRs), la segunda es la familia de receptores *retinoid acid-inducible gene I like receptors* (RLRs) y por último, la conocida como familia de receptores *nucleotide-binding and ologomerization domain-like receptors* (NLRs). La función de estos receptores es reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) aunque también detectan patrones moleculares asociados al daño (damage-associated molecular patterns, DAMPs), el reconocimiento coordinado de ambos tipos de patrones es esencial para que se produzca una respuesta inmune normal, sin embargo, un funcionamiento anómalo de este sistema puede conducir a desencadenar efectos adversos. La familia de receptores que mejor se conoce en la actualidad es la de los TLRs, se han descrito 13 miembros en mamíferos de los cuales 10 son funcionales en humanos (TLR1-10)[20] .En humanos, los TLRs 1,2, 4, 5 y 6 se encuentran en la membrana plasmática donde reconocen diversos PAMPs que se encuentran en la superficie de bacterias, mientras que los TLRs 3, 7, 8 y 9 se encuentran asociados a la membrana de los endosomas y reconocen PAMPs presentes en ácidos nucleicos de bacterias y virus[21]. Centrándonos en estos últimos, TLR3 reconoce RNA de cadena doble (dsRNA), TLR7 y 8 reconocen RNA de cadena simple (ssRNA) y TLR 9 reconoce DNA con motivos CpG hipometilados[22]. La unión de los TLRs a sus ligandos provoca una serie de cambios conformacionales que culminan con la activación del sistema de defensa, ya que la señalización conduce a la activación de los factores de transcripción NFκB y AP-1 y producción de TNFα y otras IL proinflamatorias como

IL-6 y 12 a través del reclutamiento de dos kinasas asociadas al IL1R (*IL-1R associated kinases*, IRAKs). En cuanto a la familia de los RLR, se trata de sensores citoplásmicos de RNA o DNA. Entre los sensores de RNA encontramos dos helicasas, RIG-1 y MDA5, la primera reconoce dsRNA generados por polimerasas virales y otros RNAs de pequeño tamaño, mientras que la segunda reconoce dsRNA largos[23]. La unión de estas helicasas a su ligando conduce a la producción de IFN antivirales[23,24]. En cuanto a los sensores citoplásmicos de DNA encontramos DAI (DNA-*dependent activator of IFN regulatory factors*) que reconoce dsDNA de gran tamaño, la unión de estos sensores a su ligando conduce a la activación de factores de transcripción y producción de TNF y de IFN antivirales[25]. Por último, los NLRs constituyen una familia diversa que en humanos consta de 23 miembros conocidos de sensores citosólicos que se han dividido en 5 subfamilias de las que las mas relevantes en el proceso inflamatorio son las llamadas NLRCs y las denomindas NLRPs. Entre los mejor conocidos de los NLRCs se encuentran NLRC1 (también llamado NOD1 o CARD4) y NLRC2 (NOD2 o CARD15), en estos casos, la unión del ligando provoca una cascada de señales semejante a la descrita para los TLRs que conduce a la activación de NFκB y producción de TNF. En cuanto a los NLRPs esta extensa familia comprende al menos 14 miembros en humanos. Los más relevantes inmunológicamente son NLRP1 y NLRP3 (también conocido como criopirina). NRLP3 es el mejor conocido y une gran cantidad de ligandos tanto exógenos como del hospedador[26]. La unión de los algunos NLRs, entre los que se encuentran los NRLPs, a su ligando no activa NFκB pero provoca el ensamblaje de gran cantidad de proteínas multiméricas en complejos denominados inflamasoma[27]. Otra familia de moléculas sensoras que forman parte de los inflamosomas es la familia de proteínas que contiene dominio pirina y HIN, PYHIN, entre las que se encuentra AIM2 que reconoce dsDNA[28]. Tanto los NLRs como los PYHIN activan la caspasa 1. El inflamasoma contiene proteínas sensoras, adaptadoras y efectoras y su función final es la activación de las caspasas que a su vez determina la conversión de la pro-IL1β y la pro-IL18 en sus formas maduras. La producción de pro-IL1β depende de la activación de NFκB vía TLRs[29].

Todos estos receptores han evolucionado para detectar señales de daño producido por los agentes infecciosos o los tejidos dañados con una gran sensibilidad. Incluso una pequeña cantidad de moléculas provoca la entrada en alerta del sistema que determina que se dispare la cascada de señales que conduce a la eliminación del agente infeccioso, sin embargo, el sistema presenta algunas desventajas. En primer lugar, esta

dirigido a la eliminación de infecciones focales que son más probables que las sistémicas, raras y difíciles de controlar, por ello, cuando una infección no se puede controlar en fase local, la activación generalizada del sistema inmune puede conducir a la muerte del hospedador por shock séptico. En segundo lugar, incluso perturbaciones menores del sistema pueden conducir al desarrollo de enfermedades autoinflamatorias o autoinmunes. Los estudios de asociación con enfermedades utilizando diferentes abordajes han permitido detectar múltiples loci de susceptibilidad a enfermedades autoinmunes y autoinflamatorias y entre ellos se encuentran genes que codifican PPRs. Así, se sabe que determinados NLRs son los responsables de enfermedades autoinflamatorias monogénicas como la fiebre mediterránea familiar y otras fiebres recurrentes[30]. Además, la asociación entre la enfermedad de Crohn (CD), una enfermedad autoinflamatoria poligénica y polimorfismos en el gen NOD2 está bien documentada[31]. Por tanto, variantes genéticas en componentes de las diversas familias de PPRs y de las diferentes moléculas de las rutas de señalización pueden estar asociadas al desarrollo de diversas enfermedades autoinflamatorias y autoinmunes. La asociación de algunos de los genes relacionados con la inmunidad innata y la susceptibilidad a padecer EB ha sido investigada por algunos grupos utilizando como abordaje el estudio casos-controles con un número limitado de polimorfismos simples de cambios de base (single nucleotide polymorphisms, SNPs) en cohortes relativamente pequeñas. De hecho, se ha descrito que mutaciones en los genes que determinan la fiebre mediterránea familiar pueden estar relacionadas con la susceptibilidad a padecer EB[32]. Por otro lado, el abordaje de casos-controles con inclusión de múltiples variantes genéticas para escaneo sistemático del genoma (GWAs) ha permitido confirmar asociaciones previamente descritas y describir gran cantidad de asociaciones nuevas en numerosas patologías. Sin embargo, hasta el momento, en EB sólo se han publicado los resultados de un GWAs en el se describen 10 *loci* asociados a la enfermedad, los resultados de este GWAs están limitados por su bajo poder estadístico, ya que el grupo de pacientes incluidos es relativamente pequeño para este tipo de estudios[33].

BIBLIOGRÁFIA

1. Yazici H YS, Hamuryudam V. Behçet's Syndrome. In: Klippel JH DP, ed. Rheumatology. London: Mosby; 1998:7:26.1-6.

2. Sakane T, Takeno M, Suzuki N, Inaba G. Behcet's disease. N Engl J Med 1999;341(17):1284-91.

3. Mendes D, Correia M, Barbedo M, et al. Behcet's disease--a contemporary review. J Autoimmun 2009;32(3-4):178-88.

4. Direskeneli H. Autoimmunity vs autoinflammation in Behcet's disease: do we oversimplify a complex disorder? Rheumatology (Oxford) 2006;45(12):1461-5.

5. Ricart JM, Todoli J, Vilata JJ, et al. [Behcet disease: study of 74 patients]. Med Clin (Barc) 2006;127(13):496-9.

6. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrua C, Branas F, Lopez-Lazaro L, Olivieri I. Epidemiologic and clinical aspects of Behcet's disease in a defined area of Northwestern Spain, 1988-1997. J Rheumatol 2000;27(3):703-7.

7. Peñafiel Burkhardt Rafael CRJ-L, Jimenez Alonso Juán, Ortego Centeno Norberto. Enfermedad de Behçet en España. Med Clin (Barc) 2007;128(18):715-8.

8. de Souza-Ramalho P, D'Almeida MF, Freitas JP, Pinto J. Behcet's disease in Portugal. Acta Med Port 1991;4(2):79-82.

9. Yoshida A, Kawashima H, Motoyama Y, et al. Comparison of patients with Behcet's disease in the 1980s and 1990s. Ophthalmology 2004;111(4):810-5.

10. Wakabayashi T, Morimura Y, Miyamoto Y, Okada AA. Changing patterns of intraocular inflammatory disease in Japan. Ocul Immunol Inflamm 2003;11(4):277-86.

11. Tugal-Tutkun I, Onal S, Altan-Yaycioglu R, Huseyin Altunbas H, Urgancioglu M. Uveitis in Behcet disease: an analysis of 880 patients. Am J Ophthalmol 2004;138(3):373-80.

12. Dalghous AM, Freysdottir J, Fortune F. Expression of cytokines, chemokines, and chemokine receptors in oral ulcers of patients with Behcet's disease (BD) and recurrent aphthous stomatitis is Th1-associated, although Th2-association is also observed in patients with BD. Scand J Rheumatol 2006;35(6):472-5.

13. Krause I, Weinberger A. Behcet's disease. Curr Opin Rheumatol 2008;20(1):82-7.

14. Pay S, Simsek I, Erdem H, Dinc A. Immunopathogenesis of Behcet's disease with special emphasize on the possible role of antigen presenting cells. Rheumatol Int 2007;27(5):417-24.

15. Gul A. Behcet's disease as an autoinflammatory disorder. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 2005;4(1):81-3.

16. Ryan JG, Goldbach-Mansky R. The spectrum of autoinflammatory diseases: recent bench to bedside observations. Curr Opin Rheumatol 2008;20(1):66-75.

17. Ohno S, Ohguchi M, Hirose S, Matsuda H, Wakisaka A, Aizawa M. Close association of HLA-Bw51 with Behcet's disease. Arch Ophthalmol 1982;100(9):1455-8.

18. González-Escribano MF, Rodríguez MR, Walter K, Sanchez-Roman J, García-Lozano JR, Núñez-Roldán A. Association of HLA-B51 subtypes and Behçet's disease in Spain. Tissue Antigens. 1998 52(1):78-80.

19. Karasneh J, Gul A, Ollier WE, Silman AJ, Jane Worthington J. Whole-Genome Screening for Susceptibility Genes in Multicase Families With Behçet's Disease Arthritis Rheum. 2005. 52(6):1836-42

20. Baccala R, Gonzalez-Quintial R, Lawson BR, et al. Sensors of the innate immune system: their mode of action. Nat Rev Rheumatol. 2009. 5:448-56.
21 Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. Nat Rev Immunol. 2009. 9:535-42
22. O'Neill LA. Primer: Toll-like receptor signaling pathways--what do rheumatologists need to know? Nat Clin Pract Rheumatol. 2008. 4:319-27.
23. Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition. Curr Opin Immunol. 2008. 20:17-22
24. Moore CB, Ting JP. Regulation of mitochondrial antiviral signaling pathways. Immunity. 2008. 28:735-9.
25. Kaiser WJ, Upton JW, Mocarski ES. Receptor-interacting protein homotypic interaction motif-dependent control of NF-kappa B activation via the DNA-dependent activator of IFN regulatory factors. J Immunol. 2008. 181:6427-34.
26. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, et al. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. J Histochem Cytochem. 2007. 55:443-52.
27. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. Nat Immunol. 2009. 10:241-7.
28. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. Nature. 2009. 458:514-8.
29. Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. Annu Rev Immunol. 2009. 27:229-65.
30 Hoffman HM, Simon A. Recurrent febrile syndromes: what a rheumatologist needs to know. Nat Rev Rheumatol. 2009. 5:249-56.
31. Sands BE. Inflammatory bowel disease: past, present, and future. J Gastroenterol. 2007. 42:16-25. Epub 2007 Feb 16.
32. Mendes D, Correia M, Barbedo M, Vaio T, Mota M, Gonçalves O, Valente J. Behçet's disease--a contemporary review. J Autoimmun. 2009; 32(3-4):178-88.
33. Fei Y, Webb R, Cobb BL, Direskeneli H, Saruhan-Direskeneli G , Sawalha AH. Identification of novel genetic susceptibility loci for Behçet's disease using a genome-wide association study. Arthritis Res Ther. 2009;11(3):R66
.

HIPÓTESIS

Variaciones en genes que codifican moléculas relacionadas con la inmunidad innata pueden contribuir a la susceptibilidad a patologías autoinmunes y autoinflamatorias y en concreto a la enfermedad de Behçet. Por tanto, el estudio de polimorfismos en estos genes puede ser de utilidad tanto para la detección de individuos de riesgo, como para profundizar en el conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad y optimizar el uso de los diversos agentes terapéuticos disponibles.

OBJETIVO PRINCPAL

Determinar la influencia de genes que codifican sensores de ácidos nucleicos y proteínas involucradas las rutas de señalización de estos genes en el desarrollo de enfermedad de Behçet.

OBJETIVO SECUNDARIOS

Analizar las posibles relaciones de los polimorfismos analizados con las manifestaciones clínicas más frecuentes de la enfermedad.

SUJETOS DE ESTUDIO

Se recopilaran muestras biológicas (sangre y/o saliva) de un grupo de pacientes que cumplan los criterios de clasificación del grupo Internacional para EB (Anexo 1). Se han comprometido a participar grupos de Andalucia (Hospital Torrecárdenas de Almería, Hospital Clínico de Granada, Hospital Carlos Haya de Málaga, Hospital Virgen de la Victoria de Málaga, Hospital osta del Sol de Marbella y Hospital Virgen del Rocío de Sevilla), de Galicia (Hospital Xeral Calde, Lugo), Cataluña (Clínico de Barcelona y Valle Hebrón) y Santander (Marqués de Valdecillas). Calculamos, en función de los pacientes que cada centro tiene registrados que pueden reunirse unos 400 pacientes.

Las características demográficas (edad al diagnóstico, sexo y procedencia) y las manifestaciones clínicas de la enfermedad se registrarán en bases de datos con un formato estándar (Anexo 2).

Muestras biológicas (sangre y DNA) de un grupo de 1000 controles sanos que proceden de nuestra área geográfica. Estas muestras están disponibles en los laboratorios del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla y en el Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra" de Granada y han sido utilizadas en parte en trabajos previos.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Reunir criterios de Enfermedad de Behçet segura, según los criterios del Grupo Internacional para el estudio de la Enfermedad de Behçet
- Sí el médico responsable considera que el paciente padece una EB, al menos tendrá que reunir criterios de enfermedad probable: criterio mayor, más un criterio menor y otras manifestaciones clínicas propias de EB, que no puedan atribuirse a otra enfermedad.
- Aceptar participar en el estudio y firmar el consentimiento informado

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Reusar participar en el estudio

DISEÑO, VARIABLES Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Las variables clínicas a analizar incluirán:

- Fecha de inclusión
- Edad diagnóstico
- Edad entrada
- Sexo
- Etnia
- Nacionalidad (origen)
- Behçet seguro
- Behçet probable
- Patergia
- Aftas orales
- Aftas geniales
- Flebitis superficial
- Eritema nudoso
- Pápulas/seudofoliculitis
- Afectación vascular
- Afectación digestiva
- Artritis
- Afectación SNC meníngea
- Afectación SNC parenqimatosa
- Afectación SNC trombosis
- Afectación SNP
- Uveítis anterior unilateral
- Uveítis posterior unilateral
- Panuveítis unilateral
- Uveítis anterior bilateral (al tiempo ambos ojos)
- Uveítis posterior bilateral
- Panuveítis bilateral
- Otras

Se estudiaran los siguientes genes:

- Sensores de ácidos nucleicos: receptores de ssRNA (TLR7 y TLR8), receptores de dsRNA (TLR3, RIG-1 y MDA-5) y receptores de dsDNA (TLR9 DAI y AIM2).
- Genes que codifican proteínas de la ruta de señalización: adaptadores de TLRs (MyD88 y TRIF), quinasas involucradas en diferentes rutas (IRAK1, IRAK4,

TRAF3, TRAF6, TBK1, IKKα, IKKβ, IKKγ, JNK, p38) , factores de activación de la transcripción (las 2 subunidades de NF-κB, IRF3, IRF7, AP-1) y caspasa 1.

Mediante el uso de la base de datos de HapMap (http://www.hapmap.org) se seleccionaran grupos de SNPs marcadores (Tag) en los bloques de ligamiento de los genes antes mencionados. El genotipado se realizará mediante la tecnología MALDI-TOF utilizando el sistema MassARRAY® de Sequenom. Brevemente, se amplificarán los fragmentos de DNA que contienen los SNPs de interés mediante una PCR multiplex. La reacción de discriminación alélica se realizará mediante el sistema iPLEX Gold en el que se diseña un primer que hibrida al lado del sitio polimórfico y extiende una base en función del polimorfismo. El uso de primers de extensión con distintas longitudes permite identificar los picos de los productos de diferentes SNP en una sola reacción. La eficacia del diseño aumenta debido al uso de una única mezcla de terminación. Esta modificación permite genotipar hasta 36 SNPs por ensayo, con una media de 24 SNPs. Las reacciones tienen lugar en placas de 384 pocillos y los productos de dichas reacciones son transferidos de forma automatizada mediante un robot a la superficie de un chip que será leído en el MassARRAY donde se pueden procesar hasta 10 chips simultáneamente (equivalente a unos 90.000 SNP de media). Para estudiar gran número de SNPs, esta tecnología reduce el precio por reacción con respecto a las sondas fluorescentes (Taqman).

Utilizaremos el programa informático Haploview para establecer los bloques haplotípicos mas frecuentes en nuestra población La comparación de frecuencias entre el grupo de pacientes y el grupo control se realizará mediante Chi 2 a partir de tablas de contingencia utilizando la opción StaCal de Epi Info 2002 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA). El Odd ratio (OR) y el intervalo de confianza del 95% (95% CI) se calcularán utilizando el mismo software. Se considerarán como estadísticamente significativos los valores de $p<0.05$. Además, dentro del grupo de pacientes se considerará los siguientes subgrupos: HLA-B51+/-, diagnostico definitivo o probable, según los criterios del GIEEB presencia o ausencia de afectación del uveítis, afectación del SNC o afectación del tubo digestivo.