

**Universitatea Babeș-Bolyai Cluj-Napoca  
Universitatea de Medicină și Farmacie 'Carol Davila' București**

# **STUDII DE GENETICĂ MOLECULARĂ ÎN SPONDILARTRITE SERONEGATIVE**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducători științifici:  
Prof. Univ. Dr. Nicolae Coman  
Prof. Univ. Dr. Constantin Bâră**

**Doctorand:  
Olivia Mihaela Popa**

**Cluj-Napoca  
2011**

**Babeş-Bolyai University Cluj-Napoca  
University of Medicine and Pharmacy 'Carol Davila' Bucharest**

**MOLECULAR GENETIC STUDIES IN  
SERONEGATIVE SPONDYLOARTHRITIDES**

**PHD THESIS ABSTRACT**

**Scientific advisors:**

**Professor Nicolae Coman, PhD**

**Professor Constantin Bâră, PhD**

**PhD Student:**

**Olivia Mihaela Popa**

**Cluj-Napoca  
2011**

## CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

|  |    |
|--|----|
| PARTEA 1. ASPECTE TEORETICE.....   | 4  |
| 1. Introducere.....  | 5  |
| 2. Spondilartrite-aspecte generale.....  | 11 |
| 3. Spondilita anchilozantă.....  | 16 |
| 4. Artrita psoriatică.....   | 27 |
| 5. Artrita reactivă.....   | 33 |
| 6. Spondilartrita nediferențiată.....  | 37 |
| <br>   |    |
| PARTEA A 2-A. CONTRIBUȚII PERSONALE.....   | 40 |
| 7. Obiectivele tezei.....  | 41 |
| 8. Înființarea bazei de date pentru spondilartrite și a colecției ADN.....                     | 43 |
| Baza de date pentru spondilartrite.....  | 43 |
| Colecția ADN.....  | 44 |
| 9. Studiul HLA-B27 la pacienții cu spondilartrite din România.....                             | 50 |
| Introducere.....   | 50 |
| Materiale și metode.....   | 51 |
| Rezultate și discuții.....   | 53 |
| 10. Studiul locusului HLA-C la pacienții cu artrită psoriatică din România.....                | 60 |
| Introducere.....   | 60 |
| Materiale și metode.....   | 61 |
| Subiecții de studiu.....   | 61 |
| Extracția ADN.....   | 61 |
| Genotiparea HLA-C.....   | 62 |
| Analiza statistică.....  | 62 |
| Rezultate și discuții.....   | 64 |
| 11. Investigarea polimorfismelor TNF- $\alpha$ la pacienții cu spondilartrite din România..... | 68 |
| Introducere.....   | 68 |
| Materiale și metode.....   | 70 |
| Subiecții de studiu.....   | 70 |
| Extracția ADN.....   | 70 |
| Genotiparea polimorfismelor SNP prin tehnica Real-Time PCR.....                                | 70 |
| Genotiparea polimorfismelor promotorului genei TNF- $\alpha$ .....                             | 73 |
| Genotiparea polimorfismelor de tip SNP ale genei TNF-alpha prin PCR-RFLP.....                  | 74 |
| Analiza statistică.....  | 77 |
| Rezultate și discuții.....   | 78 |
| Polimorfismele TNF- $\alpha$ la pacienții cu spondilită anchilozantă din România.....          | 79 |
| Polimorfismele TNF- $\alpha$ la pacienții cu artrită psoriatică din România.....               | 81 |
| Polimorfismele TNF- $\alpha$ la pacienții cu spondilartrită nediferențiată din România.....    | 85 |
| Polimorfismele TNF- $\alpha$ la pacienții cu artrită reactivă din România.....                 | 87 |
| 12. Investigarea polimorfismelor genei HSP-70 la pacienții cu spondilartrite din România.....  | 89 |
| Introducere.....   | 89 |
| Materiale și metode.....   | 90 |
| Extracția ADN.....   | 90 |
| Analiza statistică.....  | 92 |

|  |     |
|--|-----|
| Rezultate și discuții.....   | 93  |
| Polimorfismele HSP-70 la pacienții cu spondilită anchilozantă din România.....   | 93  |
| Polimorfismele HSP-70 la pacienții cu artrită psoriatică din România.....  | 95  |
| Polimorfismele HSP-70 la pacienții cu spondilartrită nediferențiată din România.....                                       | 96  |
| 13. Studiul asocierii haplotipurilor TNF- $\alpha$ -HSP70 cu spondilartrite în România.....                                | 99  |
| Introducere.....   | 99  |
| Materiale și metode.....   | 100 |
| Subiecții de studiu.....   | 100 |
| Analiza statistică.....  | 100 |
| Rezultate și discuții.....   | 101 |
| 14. Polimorfismul E-selectin A561C la pacienții cu spondilită anchilozantă din România.....                                | 105 |
| Introducere.....   | 105 |
| Materiale și metode.....   | 106 |
| Subiecții de studiu.....   | 106 |
| Genotiparea polimorfismului E-Selectin S128R.....  | 106 |
| Analiza statistică.....  | 107 |
| Rezultate și discuții.....   | 107 |
| 15. Concluzii.....   | 109 |
| Spondilita anchilozantă.....   | 109 |
| Artrita psoriatică.....  | 110 |
| Artrita reactivă.....  | 112 |
| Spondilartrita nediferențiată.....   | 112 |
| Abreviatieri.....  | 113 |
| Referințe bibliografice .....  | 115 |
| Mulțumiri.....   | 129 |
| Lista tabelor și figurilor .....   | 130 |
| Lista publicațiilor personale.....   | 133 |
| ANEXA I PUBLICAȚII PERSONALE.....  | A1  |
| An introduction to the genetic basis of ankylosing spondylitis.....  | A2  |
| Lack of association of HSP70 genes polymorphisms with susceptibility to undifferentiated spondyloarthritis in Romania..... | A3  |
| Distribution of HLA-B27 in Romanian spondyloarthritis patients.....  | A4  |
| Introduction to SNP genotyping by Real-Time PCR.....   | A8  |
| Genetica in artrita psoriazica.....  | A16 |
| Factorul de necroza tumorală in artrita psoriazica. Patologie, asociere genetica si tratament biologic.....                | A17 |
| HLA-C locus and genetic susceptibility to psoriatic arthritis in Romanian Population.....                                  | A23 |

## Cuvinte cheie

Spondiloartrită, spondilită anchilozantă, artrită psoriazică, HLA-B27, TNF-alpha, asociere genetică, haplotip

# PARTEA 1. ASPECTE TEORETICE

## 1. Introducere

Grupul bolilor reumatice include maladii cu patologie diversă, deși majoritatea au în comun o componentă ereditară cu o bază genetică complexă. Au fost întreprinse eforturi intense pentru a înțelege contribuția factorilor genetici la expresia bolilor reumatice atât în ceea ce privește procesul patologic de bază, cât și caracteristicile clinice.

## 2. Spondiloartrite – aspecte generale

Spondiloartritele (SpA) sunt un grup de boli reumatice caracterizate prin câteva caracteristici comune care includ: inflamația scheletului axial, mai precis articulațiile coloanei vertebrale și sacroiliace și artrita periferică a articulațiilor mari ale membrelor inferioare.

Bolile incluse în acest grup sunt: spondilita anchilozantă (SA), artrita psoriazică (AP), artrita asociată cu boala inflamatorie intestinală, artrita reactivă (ARe), spondiloartrita juvenilă și spondiloartrita nediferențiată (SN) (Khan 2002).

## 3. Spondilita anchilozantă

**Spondilita anchilozantă** (SA) este prototipul spondiloartritelor. Factorii genetici sunt determinanții primari nu numai ai riscului de a dezvolta această boală, dar și ai gravității simptomelor (Madsen și colab. 2010).

Boala este puternic asociată cu gena HLA-B27, 60-95% din pacienți fiind B27-pozitivi; cu toate acestea, doar 1-5% din indivizii B27-pozitivi din populația generală dezvoltă SA. Studiile întreprinse sugerează implicarea altor gene în procesul patologic (Brown 2009).

**Factorul de necroză tumorală-alfa (TNF-a)** joacă un rol cheie ca și citochină proinflamatorie în spondilita anchilozantă. Tratamentele biologice anti-TNF-a îmbunătățesc în mod substanțial simptomele pacienților cu SA (Braun și colab. 2008, Davis și colab. 2005). Polimorfismele promotorului genei TNF-alfa au fost raportate a fi asociate cu susceptibilitatea față de SA, dar rezultatele acestor studii nu au fost confirmate în alte populații.

Mai multe studii de asociere la nivelul întregului genom la pacienții cu spondilită au confirmat asocierea puternică cu regiunea complexului major de histocompatibilitate (MHC) de pe cromozomul uman 6p (pe care sunt localizate genele TNF-alfa și HLA-B) și au identificat și alte asocieri genetice cu regiuni de pe alți cromozomi, de exemplu cromozomii 1 și 5, (Maksymowych și colab. 2009).

#### **4. Artrita psoriazică**

**Artrita psoriazică** (AP) este o boală sistemică reumatică caracterizată prin inflamații ale pielii (psoriazis) și articulare (artrită).

Polimorfisme ale genelor localizate la nivelul complexului major de histocompatibilitate (cromozomul 6p21.3) s-au dovedit a fi asociate cu artrita psoriazică.

#### **5. Artrita reactivă**

**Artrita reactivă** (ARe) este definită ca o oligoartrită inflamatorie asimetrică sau monoartrită declanșată de o infecție, cel mai adesea intestinală sau a tractului urogenital, cu diverse bacterii Gram-negative (Vahamiko și colab. 2005).

Diferite studii au sugerat că artrita reactivă apare la indivizii predispuși genetic, dar această condiție este mai puțin frecventă și a fost mai puțin investigată din punct de vedere al asocierilor genetice.

## 6. Spondiloartrita nediferențiată

Termenul de **spondiloartrită nediferențiată** (SN) se referă la pacienții cu caracteristici clinice și radiologice sugestive pentru spondiloartritele seronegative (SpA), dar care nu îndeplinesc criteriile de diagnostic sau de clasificare pentru nici una dintre bolile din acest grup (Zeidler și colab 1992).

Deși **spondiloartrita nediferențiată** este una dintre cele mai frecvente forme de spondiloartrite, există puține date în ceea ce privește markerii genetici asociați cu susceptibilitatea la această boală. Ca și în cazul tuturor spondiloartritelor seronegative, există o incidență mare a HLA-B27 la pacienții cu SN.

## PARTEA 2. CONTRIBUȚII PERSONALE

### 7. Obiective

**Obiectivele acestei lucrări au fost studiile de genetica moleculară la nivelul unor loci genici de pe cromozomii umani 1 și 6 în raport cu bolile din grupul spondiloartritelor seronegative: spondilita anchilozantă, artrita psoriazică, artrita reactivă și spondiloartrita nediferențiată.**

**Datele disponibile în prezent arată că acest grup de boli reumatice nu a fost studiat din punct de vedere genetic în populația din România.**

**Au fost investigate din punct de vedere al asocierii cu susceptibilitatea la boală și cu manifestările clinice: markerul HLA-B27, locusul HLA-C, unele polimorfisme mononucleotidice ale genelor TNF-alpha, HSP70 (proteine de șoc termic 70) și E-selectina.**

## 8. Realizarea bazei de date și a colecției de ADN genomic

### Realizarea bazei de date

Numărul total de subiecți incluși în studiu a fost de 551, dintre care 340 de pacienți cu spondiloartrite seronegative și 211 subiecți sănătoși (grupul control C1).

Probele de sânge total periferic au fost prelevate de la pacienți spondiloartritici consecutivi care s-au adresat Diviziei de Reumatologie, Spitalul Județean Galați, Spitalul "Sf. Maria" și Spitalul "IC Cantacuzino", București, România în perioada 2006-2010.

Subiecții martor au fost obținuți prin colaborare cu Institutul Național de Hematologie Transfuzională "Prof. Dr. CT Nicolau", București, România.

**Tablelul 1. Caracteristicile demografice și clinice ale pacienților cu spondiloartrite.**

|  |                   |
|--|-------------------|
| <b>Spondilită anchilozantă</b>                 | <b>n=158</b>      |
| Vârsta medie/limite de vârstă (ani)            | 40.2 (18-74)      |
| Femei/bărbați                                  | 33/125 (1:4)      |
| Afectare axială                                | 64%               |
| Afectare mixtă (simptome axiale și periferice) | 36%               |
| <b>Artrită psoriazică</b>                      | <b>n=81</b>       |
| Vârsta medie/limite de vârstă (ani)            | 51.5 (24-86)      |
| Femei/bărbați                                  | 38/43 (1:1)       |
| Oligoartrită                                   | 18 subiecți (22%) |
| Poliartrită                                    | 37 subiecți (46%) |
| Afectare axială (spondilită)                   | 26 subiecți (32%) |
| Arthritis onset age (ani)                      | 45,7              |
| Psoriazis onset age (ani)                      | 39,7              |
| Factor reumatoid                               | 0%                |
| <b>Artrită reactivă</b>                        | <b>n=22</b>       |
| Vârsta medie/limite de vârstă (ani)            | 29 (18-44)        |
| Femei/bărbați                                  | 12/10 (~1:1)      |
| Enteric infections                             | 70%               |
| Other  | 30%               |
| <b>Spondiloartrită nediferențiată</b>          | <b>n=79</b>       |
| Vârsta medie/limite de vârstă (ani)            | 37.5 (16-59)      |
| Femei/bărbați                                  | 49/30 (3:2)       |
| Factor reumatoid                               | 0%                |



## **Realizarea colecției de ADN genomic**

### **Extractia ADN**

Extracția ADN genomic total a fost efectuată din 200-400μl sânge cu kituri comerciale (mi-Blood Genomic DNA Isolation Kit - Metabion, Germania și QIAamp DNA Blood Mini Kit Qiagen, Germania), în conformitate cu protocolul producătorului.

### **Măsurarea concentrației și a purității ADN-ului**

Concentrațiile de ADN și puritatea au fost măsurate pe un spectrofotometru NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, SUA). Pentru probele de ADN incluse în acest studiu concentrațiile au variat între 20ng/μl și 921ng/μl.

Probele ADN obținute în acest studiu au avut o puritate ridicată și au fost genotipate cu succes nu numai prin tehnici PCR obișnuite, dar și prin PCR-SSP (PCR cu primeri specifici de secvență), care necesită un material genetic de înaltă calitate.

## **9. Studiul markerului HLA-B27 la pacienți români cu spondiloartrite**

### **Materiale și metode**

**Genotiparea HLA-B27.** Din grupul total cu spondiloartrite, 310 pacienți (158 SA, 60 AP, 22 Are și 70 SN) și grupul de control C1 (n = 211) au fost genotipați pentru HLA-B \* 27 alela prin reacția de polimerizare în lanț cu primeri specifici de secvență ( PCR-SSP) folosind kitul HLA-B27-SSP low resolution kit (Olerup, Sweden).

**Analiza statistică.** Pentru acest studiu, datele au fost analizate cu ajutorul pachetului de software OpenEpi Collection of Epidemiologic Calculators Version 2.3.. Limitele de încredere de 95% (CL) pentru proporția HLA-B27 în populațiile analizate au fost estimate folosind testul Mid-P exact. Semnificația asociației a fost

determinată folosind testul Mid-P exact. Puterea statistică (alfa = 0,05, two tailed) a fost calculată pe baza aproximației normale. Comparația între populații a fost efectuată cu testul t two-tailed.

## Rezultate și discuții

Din grupul de spondiloartrite, 161 din 310 pacienți s-au fost dovedit a fi B27- pozitivi (51,9%). Cea mai mare frecvență a HLA-B27 (72,1%) a fost observată la pacienți cu spondilită anchilozantă, în timp ce în grupul cu spondiloartrită nediferențiată, HLA-B27 a fost prezent în 37,1% din cazuri. Artrita psoriazică și pacienții cu artrită reactivă a avut cele mai mici frecvențe ale markerului investigat, 25% și, respectiv, 27,2%. Printre grupul de artrita psoriazica, 26 de pacienți care prezintă modelul axial de artrită (spondilită) au fost investigate și 8 dintre ele au fost pozitive B27 (30,7%). În grupul de control markerul HLA-B27 a fost detectat în 22 din 211 persoane (10,4%).

Analiza statistică a confirmat asocierea pozitivă a HLA-B27 cu susceptibilitatea la fiecare dintre grupurile de bolnavi investigate și cu SpA ca un întreg (Tabelul 2). Studiul are o putere statistică variind de la 78,7% pentru AP la 100% pentru SA și SpA ca grup, și o putere mai mică statistică pentru boala ARE (60,3%).

**Tabelul 2. Asocierea dintre HLA-B27 și susceptibilitatea la spondiloartrite în România. Original, publicat în Int J Immunogenet 2010.**

| Boala  | HLA-B27 pozitiv %<br>(95% CL) | Valoarea p,<br>testul Mid-P exact | OR    | CI          |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------|-------------|
| Spondiloartrite<br>(n=310)                   | 51.9 (46.4-57.5)              | <0.0000001                        | 9.24  | 5.7 - 15.5  |
| <b>Spondilită anchilozantă</b><br>(n=158)    | 72.1 (64.8-78.7)              | <0.0000001                        | 22.00 | 12.7 - 39.3 |
| <b>Artrită psoriazică</b> (n=60)             | 25 (15.3-37.1)                | <0.01                             | 2.85  | 1.3 - 5.9   |
| <b>Artrită reactivă</b> (n=22)               | 27.2 (11.9-48.3)              | 0.02                              | 3.20  | 1.1 - 8.9   |
| <b>Spondiloartrită nediferențiată</b> (n=70) | 37.1 (26.5-48.9)              | <0.00001                          | 5.04  | 2.6 - 9.8   |
| Martori (n=211)                              | 10.4 (6.8-15.1)               |                                   |       |             |

OR, odds ratio; CI, confidence interval pentru OR

Am comparat frecvența markerului HLA-B27 în probele populației românești cu frecvența aceluiași marker în mai multe populații europene. În populația generală, frecvența HLA-B27 în România a fost semnificativ mai mare decât cea raportată pentru Italia (5%,  $p = 0,03$ ) (Ferri și colab 1982), dar nu diferită de frecvențele raportate de țările din zona geografică înconjurătoare - Grecia (6%) (Alamanos și colab 2004.), Bulgaria (10,8%) (Minev și colab. 1979), Serbia (12,3%) (Jajić 1979), Ungaria (12,8%) (Gömör și colab. 1977) și, de asemenea, din Spania (9,3%) (Fernandez-Sueiro și colab 2004.), Marea Britanie (9,5%) (Brown și colab 1996.), Norvegia (15,9%) (Gran și colab. 1984) și Finlanda (10,4%) (Jaakkola și colab 2006).

În grupul cu SA, frecvența HLA-B27 în eșantionul românesc a fost semnificativ mai mică decât cea raportată pentru diferite țări europene (Tabelul 3), în care acest marker are o frecvență mare în rândul pacienților cu spondilită anchilozantă. În contrast, frecvența HLA-B27 în România nu a fost semnificativ diferită de cea constatată în mai multe regiuni din bazinul mediteranean: Italia (68-76%) (Ferri și colab 1982; Paladini și colab 2005), Grecia (80,5%) (Alamanos și colab 2004), Turcia (70%) (Gunal și colab. 2008), Tunisia (62%) (Kchir și colab. 2010).

**Tabelul 3. Comparație între distribuția HLA-B27 la pacienți SA din Romania față de alte țări Europene. Original, publicat în Int J Immunogenet 2010.**

| Țara            | HLA-B27 pozitiv (%) | Valoarea p | Referință                                       |
|-----------------|---------------------|------------|---|
| Romania         | 72.1                |            |   |
| Bulgaria        | 88                  | $p=0.0005$ | Minev și colab., 1979                           |
| Ungaria         | 92.7                | $p=0.0001$ | Gomor și colab., 1977                           |
| Spania          | 84.14               | $p=0.0018$ | Collantes și colab., 2007                       |
| Spania-Galiția  | 94.3                | $p<0.0001$ | Fernández-Sueiro și colab., 2004                |
| Germania        | 82.2                | $p=0.029$  | Rudwaleit și colab., 2009                       |
| Norvegia (nord) | 93                  | $p<0.0001$ | Bakland și colab., 2005                         |
| Marea Britanie  | 90.2-94             | $p<0.0002$ | Brown și colab., 1996, Freeston și colab., 2007 |
| Finlanda        | 93                  | $p<0.0001$ | Jaakkola și colab., 2006                        |

## 10. Studiul locusului HLA-C la pacienți cu artrită psoriazică din România

### Materiale și metode

**Genotiparea HLA-C.** Toți pacienții cu artrită psoriazică ( $n = 81$ ) au fost genotipați pentru locusul HLA-C prin metoda PCR-SSP folosind kitul HLA-C-SSP cu rezoluție joasă (Olerup, Suedia). Toate testele au fost efectuate în cadrul Laboratorului de Imunogenomică și Imunoproteomică, Departamentul de Imunologie, Universitatea Palacky, Olomouc, Republica Cehă. Datele pentru 124 subiecți sănătoși (grupul control C2) au fost obținute de la Institutul Național de Hematologie Transfuzională "Prof. dr. CT Nicolau" București, România și au fost folosite pentru analiza statistică.

**Analiza statistică.** Pachetul de programe OpenEpi Collection of Epidemiologic Calculators Version 2.3 a fost utilizat pentru analiza locusului HLA-C la pacienții cu artrită psoriazică. Semnificația asocierii ( $p < 0.05$ ) a fost determinată cu ajutorul testului Mid-P exact (Martin și Austin 1991). Corecția Bonferroni a fost folosită pentru a controla pentru comparații multiple utilizând un factor de 13 (numărul de grupuri alelice HLA-C găsite în populație).

### Rezultate și discuții

Purtătorii a cel puțin unei alele HLA-C\*06 au fost mai frecvenți printre pacienți (22/81, 27,1%) decât în grupul martor (18/124, 14,5%,  $p=0,014$ , OR 2.1, 95% CI 1.08 -4.46). Această asocieră nu a fost menținută atunci când a fost aplicată corecția Bonferroni. Frecvențele altor grupuri alelice HLA-C nu au fost diferite semnificativ între pacienți și populația control.

În analiza ulterioară a caracteristicilor clinice ale AP, pacienții cu vârsta de debut a psoriazisului mai mică de 40 de ani - psoriazis tip I ( $n = 33$ ) au arătat o

frecvență crescută a HLA-C\*06 comparativ cu lotul martor (39,3% versus 14,5%,  $p = 0,001$ , sau 3,7, 95% CI 1.58-9). Această asociere rămâne semnificativă după corecția Bonferroni ( $p_{corr} = 0,013$ ). Vârsta medie de debut al psoriazisului a fost semnificativ mai mică la pacienții C\*06-pozitivi, comparativ cu cei C\*06-negativi (33.2/41.9 ani,  $p=0,04$ ). Nu s-au observat diferențe semnificative referitor la frecvența alelelor HLA-C la pacienții cu vârsta de debut a psoriazisului după 40 de ani sau în legătură cu vârsta de debut a artritei.

**Tabelul 4. Distribuția grupurilor alelice HLA-C la pacienții români cu AP și subiecți martor. Original.**

| HLA-C       | AP<br>(n=81)              | Spondilită<br>(n=26)      | Poliartrită<br>(n=37)     | Ps tip I<br>(n=33) | Martori<br>(n=124) |
|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|
| <b>C*06</b> | <b>27.1%</b> <sup>1</sup> | <b>38.4%</b> <sup>2</sup> | 21.6%                     | 39.3% <sup>4</sup> | <b>14.5%</b>       |
| <b>C*07</b> | 35.8%                     | 38.4%                     | <b>24.3%</b> <sup>3</sup> | 44%                | <b>46%</b>         |

(1)  **$p=0.014$** ,  $p_{corr}=ns$ , OR 2.1, 95%CI 1.08-4.46;

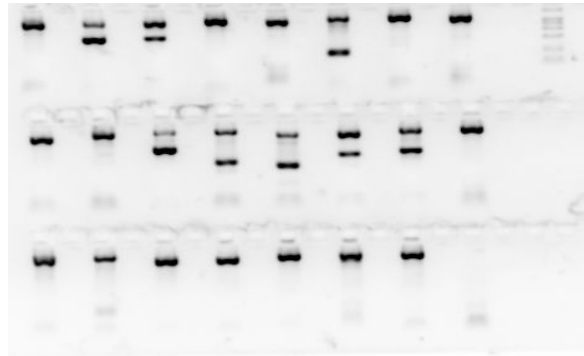
(2)  **$p=0.004$** ,  $p_{corr}=ns$ , OR 3.6, 95%CI 1.3-9.3;

(3)  **$p=0.009$** ,  $p_{corr}=ns$ , OR 0.3 95%CI 0.1-0.8.

**(4)  $p=0.001$ ,  $p_{corr}=0.013$ , OR 3.7, 95% CI 1.58-9**

$p_{corr}$  corectat prin metoda Bonferroni

Analiza asocierii locusului HLA-C cu tipul de artrită a arătat că HLA-C\*06 a fost mai frecvent în rândul pacienților cu afectare axială (spondilita) ( $p = 0,004$ , sau 3,6, 95% CI 1.3-9.3). Prin contrast, am observat o frecvență mai mică (efectul protector) a grupului alelic HLA-C\*07 la pacienții cu poliartrita (24,3% AP față de 46% martori,  $p = 0,009$ , OR 0.3, 95% CI 0.1-0.8). Aceste asociații nu au rămas semnificative după aplicarea corecției.



### HLA-C\*02, HLA-C\*12

**Figura 1.** Genotiparea locusului HLA-C cu kitul HLA-C-SSP low resolution kit (Olerup, Sweden) pentru un pacient cu artrită psoriazică. Original.

Descoperirile recente sugerează că HLA-C\*06 influențează vârsta de debut a bolii (AP cu psoriazis tip I) și nu influențează susceptibilitatea față de boala in sine (Ho și colab 2008.). Studiul nostru a confirmat asocierea HLA-C\*06 cu artrita psoriazică cu psoriazis tip I la pacienții români și, de asemenea, faptul că pacienții HLA-C\*06-pozitivi au un debut mai timpuriu al psoriazisului.

## 11. Studiul polimorfismelor genei factorului de necroză tumorală alpha la pacienții cu spondiloartrite din România

### Materiale și metode

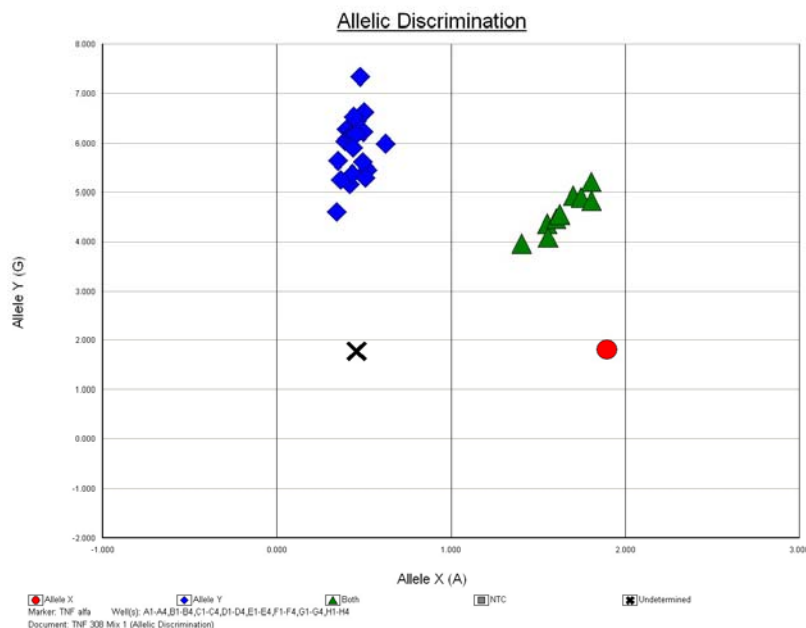
**Subiecți.** Au fost incluși în acest studiu 324 subiecți cu spondiloartrite, dintre care: spondiliteă anchilozantă (n=143), artrită psoriazică (n=80), artrită reactivă (n=22) și spondiloartrită nediferențiată (n=79). 147 de subiecți din grupul control C1 au fost genotipați ca populația martor.

**Genotiparea polimorfismelor mononucleotidice ale genei TNF-alfa prin metoda Real-Time PCR.** Metoda Real-Time PCR a fost folosită în acest studiu pentru a genotipa trei polimorfisme mononucleotidice (SNPs) ale genei TNF-a pe un aparat 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, SUA): -238G/A (rs 361525), -308G/A (rs 1800629) și -857C/T (rs 1799724). S-a folosit metoda de discriminare

alelică TaqMan. Pentru polimorfismele -238 și -308 au fost folosite controale pozitive obținute de la alte laboratoare.

**Genotiparea SNPs genei TNF-alfa prin metoda PCR-RFLP.** Pentru polimorfismul TNF-alfa -857C/T, un număr de 70 de probe, selectate aleatoriu, au fost testate printr-o a doua metodă, semi-nested PCR-RFLP (polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție), așa cum este descrisă de către Zhu și colab., 2007 și au fost obținute rezultate concordante în fiecare caz. Această a doua metodă de genotipare a fost necesară din cauza lipsei controalelor pozitive pentru acest polimorfism.

**Analiza statistică.** Testul Chi-pătrat a fost utilizat în scopul de a verifica relația de echilibru Hardy-Weinberg (HWE) pentru fiecare polimorfism studiat, pentru pacienți și de control. Testele de asociere pentru fiecare polimorfism și estimărilor frecvenței haplotipurilor au fost efectuate cu pachetul de software PLINK v 1.07. Valorile  $p \leq 0,05$  au fost considerate semnificative statistic.



**Figura 2.** Genotiparea polimorfismului -308G/A al genei TNF- $\alpha$  prin metoda Real-Time PCR TaqMan allelic discrimination assay. Albastru – homozigot GG, verde – heterozigot GA, roșu – homozigot AA, negru – control negativ. Original.

## Rezultate și discuții

Nu au existat abateri de la echilibru Hardy-Weinberg pentru lotul martor și pentru cele patru grupe de pacienți, deși nu a fost observat genotipul homozigot pentru alela minoră 238 \*A.

**Datele cu privire la frecvența SNPs investigate în populația generală au fost introduse într-o bază de date internațională - [www.allelefreqencies.net](http://www.allelefreqencies.net) - și reprezintă primul set de date referitoare la frecvența unor polimorfisme TNF- $\alpha$  pentru România.**



**Figura 3.** RFLP cu enzima de restricție *HpaI* pentru polimorfismul -857C/T al genei TNF- $\alpha$  la pacienți SA. 1, 6, 8, 9 homozigot TT; 3, 5 heterozigot CT; 2, 4, 7, 11, 12, 13, 14, 15 homozigot CC. Original.

### Polimorfismele TNF- $\alpha$ la pacienții români cu spondilită anchilozantă

Pacienții SA au prezentat o frecvență scăzută a alelei A la poziția -308 (8%) în comparație cu martorii (14%), sugerând că această alelă ar putea fi un factor de protecție pentru susceptibilitatea la boală. În plus, genotipurile -308GA/AA au fost mai puțin frecvente la pacienți (15,8%) decât în lotul control (24,6%,  $p = 0.049$ ).

Frecvențele celorlalte două polimorfisme investigate nu au fost semnificativ diferite între pacienți și martori, sugerând o posibilă lipsă de asociere cu susceptibilitatea la spondilita anchilozantă.



A fost realizată o analiză a pacienților SA cu un grad ridicat de severitate al bolii față de pacienții cu forme ușoare. O asociere semnificativă a fost observată față de polimorfismul -308G/A SNP. Alela 308\*A nu a fost regăsită în grupul cu simptome severe (0% față de 9,3%,  $p=0,02$ ). Această alelă ar putea fi un factor de protecție nu numai pentru susceptibilitatea la boală, dar, de asemenea, pentru severitatea ei.

Studiul pacienților HLA-B27 pozitivi comparativ cu lotul martor a arătat că frecvența alelei 308\*A a fost semnificativ mai mică la pacienți (7% vs 14%,  $p = 0,02$ ). Această alela ar putea avea un efect protector în acest subgrup.

Frecvența alelei -857\*T a fost mai mare la pacienți decât la martori, dar această diferență nu a fost semnificativă statistic (24% vs 19%,  $p = 0,2$ ). Distribuția polimorfismului -238G/A nu a fost diferită la pacienții HLA-B27 pozitivi comparativ cu lotul martor.

Analiza haplotipurilor estimate a fost efectuată pentru SNPs -238, -308 și -857 în întregul grup de spondilită anchilozantă și în subgrupul HLA-B27 pozitiv. Rezultatele cele mai notabile au fost reprezentate de frecvențele haplotipurilor 857C/308A/238G la pacienții cu SA /martori (8% vs 14%,  $p = 0,04$ ) și 857C/308A/238G la pacienții SA B27 + /martori (7% vs 14%,  $p=0,03$ ). Aceste rezultate arată că acest haplotip este asociat cu spondilită anchilozantă în eșantionul analizat din populația românească.

### **Polimorfismele TNF- $\alpha$ la pacienții români cu artrită psoriazică**

Alela 857\*T a fost mai răspândită în cadrul grupului de artrită psoriazică comparativ cu grupul control ( $p=0,01$ , OR 1.77, 95% CI 1.12-2.78). Procentul de subiecți purtători ai genotipurilor homo-sau heterozigot T a fost semnificativ mai mare la pacienții AP decât la martori (48,8 față de 33%,  $p=0,01$ , OR 1.91, 95% CI 1.05 - 3.49), folosind testul Fisher exact.

Frecvențele polimorfismelor -238G/A și -308G/A nu au fost diferite semnificativ între pacienți și martori.

Dintre pacienții cu artrită psoriazică, 22 de subiecți au avut artrită periferică, cu mai puțin de 5 articulații afectate (oligoartrită), 34 de persoane au avut mai mult de 5 articulații afectate (poliartrită) și 24 de indivizi au prezentat artrită cu afectare axială (spondilită). Analiza subgrupurilor de pacienți AP a arătat o distribuție similară a polimorfismelor investigate la pacienții cu oligoartrită și poliartrită. În contrast, frecvența polimorfismului -857C/T diferă între subiecții AP cu spondilită și martori, alela 857\*T mai frecventă la pacienți față de grupul control (33,3% vs 19%  $p=0,03$ , OR 2.13, CI 95% 1.09 - 4.15).

Aceste rezultate arată că alela 857\*T a genei TNF- $\alpha$  poate reprezenta un factor de risc pentru artrita psoriazică și pentru modelul axial al acestei în populația analizată.

Frecvența haplotipurilor 857T/308G/238G și 857C/308G/238G tinde să crească la pacienții AP față de martorii sănătoși ( $p=0,009$  și respectiv 0,04). Aceste două haplotipuri arată o asociere cu boala, un efect marginal pentru haplotipul 857C/308G/238G ( $p=0,04$ ) și o asociere puternică pentru haplotipul 857T/308G/238G ( $p=0,009$ ).

Pentru grupul de pacienți cu spondiloartrită nediferențiată, nu a fost găsită nici o asociere cu cele trei polimorfisme TNF- $\alpha$  investigate. Nu a fost observată o diferență semnificativă a frecvenței haplotipurilor TNF- $\alpha$  la pacienții cu SN în comparație cu subiecții martori.

În grupul de artrita reactivă, au fost studiate doar două polimorfisme TNF- $\alpha$ , -308G/A și -238G/A. Alela 238\*A nu a fost găsită la pacienți. Distribuția acestor polimorfisme nu a fost semnificativ diferită între pacienți și grupul control. Aceste rezultate trebuie să fie interpretate cu prudență, din cauza dimensiunii reduse a grupului de pacienți.

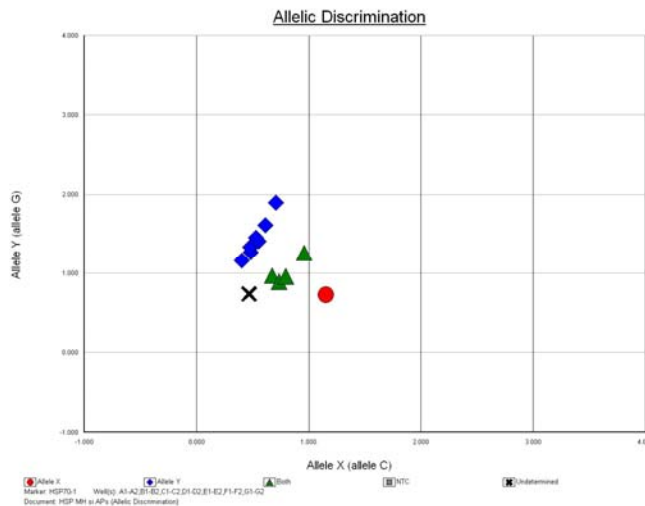
## 12. Studiul polimorfismelor genelor HSP70 la pacienții cu spondiloartrite din România

### Materiale și metode

**Subiecți.** Pacienți cu spondilita anchilozantă (n = 111), artrită psoriazică (n = 73) și spondiloartrită nediferențiată (n = 79) și 101 subiecți sănătoși (din grupul de control C1) au fost genotipați pentru două polimorfisme ale genelor proteinelor de șoc termic HSP70.

**Genotiparea polimorfismelor mononucleotidice ale genelor HSP70-1 și 2.** Analiza polimorfismului 190 G/C al genei HSP70-1 (rs1043618) a fost efectuată prin metoda Real-Time PCR.

Polimorfismul 1267 A/G (rs1061581) al genei HSP70-2 a fost genotipat prin metoda PCR-RFLP cu enzima de restricție *PstI* așa cum este descrisă de Vargas-Alarcon și colab, 2002.



**Figura 4.** Genotiparea polimorfismului +190C/G al genei HSP70-1 prin metoda Real-Time PCR TaqMan allelic discrimination assay. Albastru – ho mzigot GG, verde – heterozigot GC, roșu – homozigot CC, negru – control negativ. Original.

**Analiza statistică.** Testul Chi-pătrat a fost utilizat în scopul de a verifica relația de echilibru Hardy-Weinberg (HWE) pentru fiecare polimorfism studiat, pentru pacienți și de control. Testele de asociere pentru fiecare polimorfism au fost efectuate cu pachetul de software PLINK v 1.07. Valorile  $p \leq 0,05$  au fost considerate semnificative statistic.

## **Rezultate și discuții**

Toate grupurile au fost în echilibru Hardy-Weinberg pentru cele două polimorfisme, cu excepția grupului SA pentru 1267 SNP, care a prezentat o abatere mică ( $p = 0,034$ ).

### **Polimorfismele genelor HSP70 la pacienții români cu spondilită anchilozantă**

Frecvențele genotipurilor și alelelor nu diferă semnificativ între cazuri și controale pentru polimorfismele investigate.

În grupul de pacienți HLA-B27 pozitivi frecvența alelei minore 190\*C a fost de 30,2% comparativ cu 32,4% la martori ( $p=0,78$ , OR 0,89). Frecvența alelei 1267\*G a fost, de asemenea, foarte similar cu grupul de control (31,2% vs 37,5%,  $p = 0,45$ , OR 0,75).

Rezultatele arată că aceste polimorfisme nu sunt asociate cu susceptibilitatea la SA în populația analizată.

### **Polimorfismele genelor HSP70 la pacienții români cu artrită psoriazică**

Pentru grupul de artrită psoriazică frecvențele alelice și ale genotipurilor au fost similare cu ale grupului martor, în consecință aceste SNPs nu reprezintă factori de risc pentru această maladie.

Studiul genelor proteinelor de șoc termic nu a fost realizat până în prezent pe nici o altă populație față de artrită psoriazică. Datele noastre nu sugerează o posibilă implicare a acestor molecule în procesul patogenic al bolii, dar dat fiind

că AP este o boală foarte heterogenă, o investigație pe diferite subgrupuri cu un număr mare de pacienți și cu mai mult de două polimorfisme HSP ar putea aduce informații noi și interesante.

#### Polimorfismele genelor HSP70 la pacienții români cu spondiloartrită nediferențiată

Frecvențele alelice și ale genotipurilor nu diferă semnificativ între pacienții SN și martori pentru oricare dintre polimorfismele investigate. Rezultatele arată că aceste polimorfisme nu sunt asociate cu susceptibilitatea la SN în populația analizată.

### **13. Studiul haplotipurilor TNF- $\alpha$ -HSP70 la pacienții cu spondiloartrite din România**

#### **Introducere**

Acesta este primul studiu al haplotipurilor extinse ale genelor factorului de necroză tumorală alfa și proteinelor de șoc termic 70 la pacienții români cu spondiloartrite. Nu există date în literatură privind un astfel de studiu la pacienți SpA în alte populații de pe glob.

Genele TNF-alfa și HSP70-1 și 2 sunt localizate în aceeași regiune genomică, brațul scurt al cromozomului 6, în clasa III a complexului major de histocompatibilitate. Regiunea cromozomală din jurul genei TNF-alpha abundă în gene cu rol imunologic. În scopul identificării factorilor genetici implicați în patologia acestor maladii, este utilă analiza variațiilor genetice din regiune și construcția haplotipurilor extinse.

#### **Materiale și metode**

**Subiecți.** Au fost analizate genotipurile individuale pentru cinci SNPs pentru pacienții cu spondilită anchilozantă și artrită psoriazică și pentru lotul martor. Polimorfismele studiate au fost: -238G/A, -308G/A și -857C/T din gena TNF- $\alpha$ , 190C/G din gena HSP70-1 și 1267A/G din gena HSP70-2. Metodele de genotipare

pentru fiecare polimorfism, precum și frecvența genotipurilor au fost descrise anterior (secțiunea 11 și 12).

**Analiza statistică.** A fost efectuată o analiză a haplotipurilor combinate TNF-alfa-HSP70 pentru spondilita anchilozantă și artrita psoriazică, comparativ cu martorii sănătoși cu pachetul de programe PLINK v 1.07.

Cu ajutorul unor metode statistice adecvate a fost studiat nivelul de dezechilibru de linkage (LD) pentru fiecare pereche de polimorfisme pentru a evalua posibilitatea de reconstrucție a haplotipurilor între SNPs investigate.

## **Rezultate și discuții**

Polimorfismul 190 G/C al genei HSP70-1 a fost exclus din analiză, deoarece a prezentat un dezechilibru de linkage puternic cu polimorfismul 1267 al genei HSP70-2 ( $r^2 = 0.79$  pentru SA).

O asociere puternică ( $p=0,02$ ) a fost observată pentru haplotipul 857T/308G/238G/1267A care a fost prezent cu o frecvență ridicată atât la pacienții SA cât și la martori (22% și respectiv 14%). O asociere slabă a fost obținută pentru haplotipul 857C/308A/238G/1267G ( $p=0,04$ ), dar acest haplotip are o frecvență foarte scăzută în populația analizată (sub 5% la pacienți), astfel încât asocierea nu este semnificativă.

În cazul pacienților SA HLA-B27 pozitivi, haplotipul 857T/308G/238G/1267A a fost, de asemenea, mai frecvent la pacienți decât la martori (22% versus 14%), dar asocierea a fost mai slabă ( $p=0,03$ ). Aceste date susțin ipoteza că acest haplotip conține un factor de susceptibilitate pentru spondilita anchilozantă independent de markerul HLA-B27.

Pentru grupul de artrită psoriazică, niciunul dintre cele 7 haplotipuri nu a fost asociat cu boala. Ca și pentru pacienții SA, polimorfismul 190 G/C al genei HSP70-1 a fost exclus din analiză din cauza dezechilibrului de linkage cu polimorfismul 1267 al genei HSP70-2 ( $r^2 = 0,73$  pentru AP). O asociere pozitivă marginală a fost observată pentru haplotipul 857T/308G/238G/1267A (19% la pacienți față de 12% la martori,  $p = 0,05$ ).

## 14. Polimorfismul A561C al genei E-selectinei la pacienții români cu spondilită anchilozantă

### Introducere

Gena pentru molecula de adeziune E-selectina este situat pe cromozomul 1q23-25. Cele mai bine caracterizat polimorfism al moleculei E-selectinei este A561C, care codifică pentru Ser128Arg (S128R).

### Materiale și metode

**Analiza genotipică a polimorfismului A561C.** Un grup de 97 pacienți cu spondilită anchilozantă și 117 subiecți sănătoși (din grupul control C1) au fost genotipați pentru polimorfismul A561C al genei E-selectina prin tehnica PCR-RFLP.

**Analiza statistică.** Frecvențele alelelor și genotipurilor au fost comparate între pacienți și martori. Analiza Chi-pătrat a fost utilizată în scopul de a verifica echilibru Hardy-Weinberg pentru ambele grupuri de subiecți.

### Rezultate și discuții

Frecvența genotipului AA a fost mai mare la martori (72,7%) comparativ cu grupul de pacienți (69,1%). Cu toate acestea, nu a existat nici o diferență semnificativă statistic între cele două grupuri ( $p > 0,05$ ).

Aceste rezultate arată că polimorfismul genei E-selectina A561C nu este un factor de risc față de spondilita anchilozantă în populația românească.

Această genă rămâne un candidat interesant și atractiv pentru studii la pacienții cu spondiloartrite. Un studiu pilot privind pacienții cu artrită psoriazică tratați cu medicamente anti-TNF a arătat că a existat o scădere semnificativă a nivelului E-selectinei în leziunile cutanate ale pacienților care au răspuns pozitiv la tratament (Cordiali-Fei și colab. 2006).

## 15. Concluzii

### Spondilita anchilozantă

1. A fost confirmată și pentru pacienții români asocierea genetică pozitivă a markerului HLA-B27 cu susceptibilitatea față de spondilita anchilozantă (SA) și față de SpA în ansamblu. În grupul SA, frecvența HLA-B27 în eșantionul nostru românesc a fost semnificativ mai mică decât cea raportată din diferite țări europene (Bulgaria, Spania, Finlanda, Germania, Marea Britanie, Norvegia), în care acest marker are o frecvență mare în rândul pacienți cu spondilită anchilozantă. În contrast, frecvența HLA-B27 în România nu a fost semnificativ diferită de frecvențele raportate pentru diferite regiuni din bazinul mediteranean: Italia, Grecia, Turcia, Tunisia.

2. Rezultatele obținute sugerează un efect slab protector al alelei TNF- $\alpha$  308\*A pentru această afecțiune. Celelalte două polimorfisme investigate de genei TNF- $\alpha$  au avut o distribuție similară la pacienți și martori.

Alela 308\*A lipsește în grupul de pacienți cu spondilită anchilozantă cu simptome severe. Această alelă ar putea fi un factor de protecție nu numai pentru susceptibilitatea la boală, dar, de asemenea, pentru severitatea ei. TNF- $\alpha$  pare a fi un factor modulator pentru spondilita anchilozantă și nu unul cauzal în populația analizată.

Analiza haplotipurilor arată că frecvența haplotipului TNF- $\alpha$  857C/308A/238G la pacienții cu SA și SA B27+ a fost semnificativ mai mică decât la martori. Aceste rezultate arată că acest haplotip este asociat cu spondilita anchilozantă în populația noastră.

3. Cele două polimorfisme ale gene lor HSP70-1 și HSP70-2 nu au fost în mod individual asociate cu susceptibilitatea față de spondilita anchilozantă.

4. O asociere puternică a fost observată între spondilita anchilozantă și haplotipul TNF- $\alpha$ -HSP70 extins 857T/308G/238G/1267A care a fost prezent cu o frecvență ridicată atât la pacienți și la martori (22% și respectiv 14%). O asociere slabă a fost obținută pentru 857C/308A/238G/1267G, dar acest haplotip are o frecvență



foarte scăzută în populația analizată (sub 5% la pacienți), astfel încât asocierea nu este semnificativă.

La pacienții SA HLA-B27 pozitivi, haplotipul 857T/308G/238G/1267A a fost, de asemenea, mai frecvent decât la lotul martor, dar asocierea a fost mai slabă. Aceste date susțin ipoteza că acest haplotip conține un factor de susceptibilitate pentru spondilita anchilozantă independent de markerul HLA-B27.

5. Polimorfismul A561C al genei E-selectinei nu este un factor de susceptibilitate pentru a spondilita anchilozantă în populația analizată. În ciuda acestui fapt această genă rămâne un candidat interesant și atractiv pentru studii la pacienții cu spondiloartrite.

### **Artrita psoriazică**

1. În grupul studiat, o asociere pozitivă a fost găsită între HLA-B27 și susceptibilitatea față de artrita psoriazică (AP). La pacienții români cu AP, HLA-B27 este asociat cu afectarea axială, similar cu datele raportate pentru populația spaniolă.

Frecvența markerului HLA-B27 în eșantionul investigat a fost semnificativ mai mare decât cea raportată pentru Italia continentală și Serbia, dar similară comparativ cu frecvențele raportate pentru Marea Britanie și Spania. Pentru Italia, există două alte studii în care frecvențele HLA-B27 nu sunt statistic diferite față de studiul nostru.

2. Asocieri genetice pozitive au fost găsite între HLA-C\*06 și susceptibilitatea la AP, între HLA-C\*06 și modelul axial de artrită și între HLA-C\*07 și poliartrita, dar aceste asocieri nu au rămas semnificative după corecția pentru testare multiplă.

Acest studiu a confirmat asocierea HLA-C\*06 cu psoriazis tip I (debutul psoriazisului înainte de 40 de ani) la pacienții cu artrită psoriazică și, de asemenea, faptul că pacienții HLA-C\*06-pozitivi au un debut mai timpuriu al psoriazisului.

3. Polimorfismul -857C/T nal genei TNF-alfa a fost asociat cu susceptibilitatea la artrită psoriazică similar cu datele raportate pentru populațiile germană și

canadiană și de asemenea cu afectarea axială a bolii. Celelalte două polimorfisme TNF- $\alpha$  investigate (-238 și -308) nu au fost în mod individual asociate cu această condiție.

Aceste rezultate arată că alela 857\*T poate reprezenta un factor de risc pentru artrita psoriazică și pentru modelul axial al acestei maladii în populația analizată. Haplotipurile 857T/308G/238G și 857C/308G/238G arată o asociere cu boala, un efect marginal pentru haplotipul 857C/308G/238G și o asociere puternică pentru haplotipul 857T/308G/238G.

4. Polimorfismele investigate ale genelor HSP70 nu s-au dovedit a fi asociate cu artrita psoriazică.

5. Pentru grup de pacienți cu artrita psoriazică, o asociere marginală pozitivă a fost observată pentru haplotipul extins TNF- $\alpha$ -HSP70 857T/308G/238G/1267A.

### **Artrita reactivă**

1. Pentru artrita reactivă, markerul HLA-B27 este asociat cu susceptibilitatea la această maladie, dar frecvența HLA-B27 în grupul analizat a fost mai mică decât în alte studii.

2. Distribuția polimorfismelor -238G/A și -308G/A nu a fost semnificativ diferită între pacienți și martori. Aceste rezultate trebuie să fie interpretate cu prudență, din cauza dimensiunii reduse a grupului de pacienți.

### **Spondiloartrita nediferențiată**

1. Pentru pacienții cu spondiloartrita nediferențiată, HLA-B27 a fost asociat cu susceptibilitatea de această condiție, dar frecvența acestui marker la pacienții români fost semnificativ mai mică comparativ cu datele raportate în literatura de specialitate. Frecvența HLA-B27 este influențată la acești pacienți de cursul bolii, deoarece cel puțin o parte dintre pacienți vor dezvolta spondilită anchilozantă.

2. Nu a fost găsită nici o asocieră cu cele trei polimorfisme TNF- $\alpha$ .
3. Rezultatele acestui studiu arată că cele două polimorfisme ale genelor HSP70 nu contribuie la riscul de spondiloartrita nediferențiată în lotul analizat din populației românească.

## Bibliografie selectivă

- Alamanos, Y., N. G. Papadopoulos, P. V. Voulgari, și colab. (2004). Epidemiology of ankylosing spondylitis in Northwest Greece, 1983-2002. *Rheumatology (Oxford)* 43(5): 615-8
- Braun J, Deodhar A, Dijkmans B, Geusens P, Sieper J, Williamson P, Xu W, Visvanathan S, Baker D și colab., (2008) Efficacy and safety of infliximab in patients with ankylosing spondylitis over a two-year period. *Ann Rheum Dis.*;59:1270–1278
- Brown, M. A. (2009). Genomewide screens in ankylosing spondylitis. *Adv Exp Med Biol* 649: 148-58.
- Brown, M. A., K. D. Pile, L. G. Kennedy, și colab. (1996). HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom. *Ann Rheum Dis* 55(4): 268-70.
- Cordiali-Fei, P., E. Trento, G. D'Agosto, și colab. (2006). Decreased levels of metalloproteinase-9 and angiogenic factors in skin lesions of patients with psoriatic arthritis after therapy with anti-TNF-alpha. *J Autoimmune Dis* 3: 5.
- Davis JC, Heijde DM van der, Braun J, Dougados M, Cush J, Clegg D, Inman RD, Kivitz A, Zhou L, Solinger A, Tsuji W (2005) Sustained durability and tolerability of etanercept in ankylosing spondylitis for 96 weeks. *Ann Rheum Dis.*;64:1557–1562.
- Fernandez-Sueiro, J. L., C. Alonso, F. J. Blanco, și colab. (2004). Prevalence of HLA-B27 and subtypes of HLA-B27 associated with ankylosing spondylitis in Galicia, Spain. *Clin Exp Rheumatol* 22(4): 465-8.
- Gunal, E. K., F. O. Sarvan, S. Kamali, și colab. (2008). Low frequency of HLA-B27 in ankylosing spondylitis patients from Turkey. *Joint Bone Spine* 75(3): 299-302.
- Ho PY, Barton A, Worthington J și colab. (2008) Investigating the role of the HLA-Cw\*06 and HLA-DRB1 genes in susceptibility to psoriatic arthritis: comparison with psoriasis and undifferentiated inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis.*; 67(5):677-82
- Jaakkola, E., Herzberg, I., Laiho, K., Barnardo, M.C., Pointon, J.J., Kauppi, M. și colab. (2006) Finnish HLA studies confirm the increased risk conferred by HLA-B27 homozygosity in ankylosing spondylitis. *Annals of Rheumatic Diseases*, 65, 775.
- Khan, M. A. (2002). Update on spondyloarthropathies. *Ann Intern Med* 136(12): 896-907.

- Kchir, M. M., Hamdi W., Laadhar L., Kochbati S., Kaffel D., Saadellaoui K., Lahmar H., Ghannouchi M. M. și colab., (2010) HLA-B, DR and DQ antigens polymorphism in Tunisian patients with ankylosing spondylitis (a case-control study), *Rheumatol Int* 30:939
- Madsen, O. R., A. Rytter, L. B. Hansen, și colab. (2010). Reproducibility of the Bath Ankylosing Spondylitis Indices of disease activity (BASDAI), functional status (BASFI) and overall well-being (BAS-G) in anti-tumour necrosis factor-treated spondyloarthritis patients. *Clin Rheumatol* 29(8): 849-54.
- Maksymowych, W. P., R. D. Inman, D. D. Gladman, și colab. (2009). Association of a specific ERAP1/ARTS1 haplotype with disease susceptibility in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 60(5): 1317-23.
- Martin, D. and H. Austin (1991). An efficient program for computing conditional maximum likelihood estimates and exact confidence limits for a common odds ratio. *Epidemiology* 2(5): 359-62.
- Paladini, F., E. Taccari, M. T. Fiorillo, și colab. (2005). Distribution of HLA-B27 subtypes in Sardinia and continental Italy and their association with spondylarthropathies. *Arthritis Rheum* 52(10): 3319-21.
- Reich, K., U. Huffmeier, I. R. König, și colab. (2007). TNF polymorphisms in psoriasis: association of psoriatic arthritis with the promoter polymorphism TNF\*-857 independent of the PSORS1 risk allele. *Arthritis Rheum* 56(6): 2056-64.
- Vahamiko, S., M. A. Penttinen and K. Granfors (2005). Aetiology and pathogenesis of reactive arthritis: role of non-antigen-presenting effects of HLA-B27. *Arthritis Res Ther* 7(4): 136-41.
- Vargas-Alarcon, G., J. D. Londono, G. Hernandez-Pacheco, și colab. (2002a). Heat shock protein 70 gene polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 61(1): 48-51.
- Zeidler, H., W. Mau and M. A. Khan (1992). Undifferentiated spondyloarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 18(1): 187-202.
- Zhu, X., Y. Wang, L. Sun, și colab. (2007). A novel gene variation of TNFalpha associated with ankylosing spondylitis: a reconfirmed study. *Ann Rheum Dis* 66(11): 1419-22.

## Lista de lucrări

### *Articole în reviste de specialitate*

Popa O. M., M. Bojinca, V. Bojinca, C. Ciofu, M. I. Dutescu, A. Bardan, R. Sfrent-Cornateanu, M. Petrek, C. Bara, L. Popa, Distribution of HLA-B27 in Romanian spondyloarthritis patients, *International Journal of Immunogenetics*, 2010, 37:513-516, impact factor 1.522

Popa O. M., M. Bojinca, V. Bojinca, M. I. Dutescu, C. Ciofu, C. Bara, L. Popa, Lack of association of HSP70 genes polymorphisms with susceptibility to undifferentiated spondyloarthritis in Romania *Romanian Journal of Rheumatology*, 2010, *in press* (categoria B+ CNCSIS)

Popa O.M., M. Bojinca, V. Bojinca, C. Ciofu, C. Bara, L.O. Popa, Introduction to SNP genotyping by Real-Time PCR, *Travaux du museum National d'Histoire Naturelle "Grigore Antipa"*, Vol. 52, p. 515-522, 2009 (categoria B+ CNCSIS)

Ciofu Claudia, Olivia Popa, L. Popa, V. Mihai, M. Bojinca, V. Stoica, St. Suteanu, Tumor necrosis factor in psoriatic arthritis - pathology, genetic association and biologic therapy, *Medicina Moderna vol XVII nr 10-2010*: 506-511

Claudia Ciofu, Olivia Popa, L Popa, V. Mihai, M Bojinca, St Suteanu, The genetics of psoriatic arthritis - *Medicina Moderna vol XVII nr 1-2010*: 7-10

Popa O. M., M. Bojinca, V. Bojinca, C. Bâră, An introduction to the genetic basis of ankylosing spondylitis, *Medicina Moderna*, *in press*

### **Articole în curs de revizuire**

**O. M. Popa**, L. Popa, M. I. Dutescu, M. Bojinca, V. Bojinca, C. Ciofu, C. Bara, F. Mrazek, M. Petrek, HLA-C locus and genetic susceptibility to psoriatic arthritis in Romanian population, *Tissue Antigens*

### **Lucrări apărute în volumele unor congrese internaționale**

**Popa O. M.**, M. Bojinca, V. Bojinca, C. Ciofu, M. I. Dutescu, M. Milicescu, C. Bara, L. Popa, Tumor necrosis factor alpha -857C/T polymorphism is associated with

psoriatic arthritis in Romania, The EMBO Meeting, 4-7 September 2010, Barcelona, Spain, A145:52-53

**Popa O. M.**, M. Bojinca, M. I. Dutescu, V. Bojinca, R. Sfrent-Cornateanu, M. Milicescu, C. Bara, L. O. Popa, Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms in undifferentiated spondyloarthritis patients in Romania Ann Rheum Dis;69(Suppl 3):664, EULAR 2010

**Popa O.**, M. Dutescu, M. Bojinca, V. Bojinca, R. Sfrent-Cornateanu, F. Raicu, C. Bara, L. Popa Hsp70 genes polymorphisms: lack of association with Undifferentiated Spondyloarthritis in Romania, , European Journal of Human Genetics 18 (Suppl. 1):247, European Conference of Human Genetics, June 2010, Gothenburg, Sweden

**Popa O. M.**, L. Popa, M. I. Dutescu, M. Bojinca, V. Bojinca, C. Ciofu, C. Bara, F. Mrazek, M. Petrek Association of HLA-CW\*06 with susceptibility to Psoriatic Arthritis and its clinical phenotype in Romania, Tissue Antigens 75(5):627-8, 24<sup>th</sup> European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, May, Florence, Italy 2010

**Popa O. M.**, M. Bojinca, V. Bojinca, C. Ciofu, R. Sfrent-Cornateanu, C. Bara, M. Dutescu, C. Mihai, M. Milicescu, L. Popa, Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms in Ankylosing Spondylitis patients in Romania, EMBO Meeting 2009 Late Abstract Book B162:18, August 29-September 1, Amsterdam, The Netherlands

**Popa O.M.**, C. Ciofu, M. Dutescu, M. Bojinca, R. Sfrent-Cornateanu, V. Bojinca, M. Milicescu, C. Bara, L. Popa TNFa promoter polymorphisms in psoriatic arthritis patients in Romania, , European Journal of Human Genetics 17(Suppl. 2):255, European Conference of Human Genetics 2009, May 23 – 26, Vienna, Austria

**Popa O.**, L. Popa, R. Sfrent-Cornateanu, M. Bojinca, C. Bara, N. Coman Unexpectedly low prevalence of HLA-B27 in Romanian ankylosing spondylitis patients, European Journal of Human Genetics 14, Suppl. 1, p. 307, 2006

**Popa O.**, R. Sfrent-Cornateanu, L. Popa, M. Bojinca, C. Bara, The E-selectin S128R polymorphism in patients with ankylosing spondylitis from Romanian population Final Programme and Abstracts, p.315, European Human Genetics Conference, Prague, Czech Republic, 7-10 May, 2005