

HLA Y ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)

Yeilis C. Canónico S¹, Nancy Elizabeth Larocca G², Dolores Moreno³, Juan Bautista De Sanctis⁴

RESUMEN: La enfermedad pulmonar obstructiva crónica se caracteriza por una obstrucción al flujo aéreo a consecuencia de un proceso inflamatorio crónico que depende de muchos factores, entre ellos, el control a nivel genético. La presencia de polimorfismos en el sistema de antígenos leucocitarios humanos ha sido asociado con varias enfermedades. Pocos estudios se han enfocado hacia el posible rol de las variaciones en el locus antígenos leucocitarios humanos humano y el desarrollo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Se realizó la tipificación de antígenos leucocitarios humanos clase I y II en 50 pacientes de raza mestiza, con diagnóstico de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, utilizando la técnica de PCR-SSP, comparando los pacientes estudiados con 108 controles.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y controles, con respecto a la frecuencia de los alelos antígenos leucocitarios humanos clase I y II.

No se encontró asociación de alelos del sistema antígenos leucocitarios humanos con presencia de enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Palabras clave: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica, Antígenos leucocitarios humanos.

ABSTRACT: Obstructive pulmonary disease is characterized by the progressive obstruction of air flow and it is partially reversible due to the destruction of the pulmonary parenchyma and inflammation of the air ways. The development of this inflammatory pathology depends on several factors including the major histocompatibility complex. Few studies have dealt with the possible role of major histocompatibility complex variations and obstructive pulmonary disease development and chronicity.

Major histocompatibility complex class I and II genetic analysis was performed in 50 hybrid patients, with technique of amplification of specific primers (PCR-SSP) (Genovision®). As a comparison 108 controls were used.

No significant differences were encountered in frequencies of class I and II patients with obstructive pulmonary disease and controls.

No association was found in major histocompatibility complex polymorphism and obstructive pulmonary disease. Further studies should assess other genes for ascertain susceptibility to develop the disease.

Key words: Obstructive pulmonary disease, Major histocompatibility complex.

Instituto de Inmunología. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela

Universidad Central de Venezuela, Edificio del Instituto de Inmunología, Los Chaguaramos. Caracas, Venezuela. Código Postal: 1053. Fax: (0212)6932815/2734

Dirección electrónica: <http://www.med.ucv.ve/idi>

Trabajo financiado por:

Proyecto FONACIT # G2005000389.

Recibido: 13-10-08

Aceptado: 30 -10-08.

¹ Licenciada en Bioanálisis. Instituto de Inmunología. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

² MSc. en Inmunología Clínica. Instructor contratado. Cátedra de Patología General y Fisiopatología. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

³ Especialista en Neumonología. Profesor Asistente. Jefe de la Cátedra de Patología General y Fisiopatología. Escuela de Medicina "Luis Razetti". Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

⁴ Doctor en Ciencias Fisiológicas, mención Bioquímica. Coordinación de Investigación y docencia. Instituto de Inmunología. Universidad Central de Venezuela.

INTRODUCCIÓN

El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) está conformado por un grupo de genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6 que codifican para los receptores denominados antígenos leucocitarios humanos (HLA) ubicados en la superficie de todas las células del organismo. Las moléculas del HLA clase I y II tienen como función la presentación de antígenos peptídicos a los linfocitos T. Las moléculas de HLA clase I se unen a péptidos provenientes del procesamiento de proteínas endógenas y que son presentadas en la superficie de todas las células nucleadas para su posterior reconocimiento por parte de los linfocitos T citotóxicos CD8+. Los antígenos que son procesados por macrófagos, células dendríticas y otras células con función de células presentadoras de antígenos se unen a moléculas de HLA clase II que a su vez son reconocidas por los linfocitos T cooperadores CD4+^(1,2).

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es considerada en la actualidad como una enfermedad de las vías aéreas caracterizada por obstrucción del tracto respiratorio y por continuos procesos inflamatorios crónicos^(3,4). En relación con los elementos que determinan su aparición, se considera como una enfermedad compleja, multifactorial, derivada de la interacción de varios genes y de múltiples elementos ambientales. La selección de genes candidatos para el desarrollo de enfermedad se basa en el estudio de un gran número de polimorfismos genéticos con aparente rol central en la patogénesis de la enfermedad dentro los cuales se incluyen los genes que codifican para las moléculas del MHC. Respecto a la asociación de polimorfismos de los genes de HLA con EPOC, existen muy pocos estudios, y los mismos han sido realizados en individuos de distintas razas sin resultados concluyentes⁽⁵⁻⁷⁾.

En el presente estudio, nos propusimos a determinar la posible asociación entre las moléculas del MHC y la presencia de EPOC, determinando la frecuencia de alelos HLA clases I y II en una población de pacientes con EPOC en Venezuela.

PACIENTES Y MÉTODOS

Población de estudio

Se realizó un estudio clínico de casos-controles, descriptivo, transversal prospectivo en el que se incluyeron 50 pacientes con diagnóstico de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) de una población

de pacientes ambulatorios vistos en la Consulta de Neumología del Hospital Universitario de Caracas de la Universidad Central de Venezuela entre los meses de mayo a octubre de 2005 y 108 individuos controles sanos incluidos en la base de datos de la sección de Inmunogenética del Instituto de Inmunología (UCV). Cabe destacar que dichos pacientes no fueron evaluados clínicamente con pruebas de función pulmonar, y que los mismos, por ser una representación fidedigna comprobada de la población mestiza venezolana, fueron utilizados sólo como patrones de referencia del estudio.

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Inmunología de la Universidad Central de Venezuela.

Se realizó un consentimiento informado por escrito a cada uno de los pacientes para solicitar su aprobación y ser incluidos en el estudio.

Una vez seleccionados los pacientes, se les realizó una historia clínica completa y una evaluación funcional pulmonar a través de la realización de una espirometría. (Espirómetro MedGraphics Cardiorrespiratory Diagnostic, Medical Graphics Corporation EE.UU) usando los valores predictivos de referencia de Crapo, con medición del volumen forzado en el primer segundo (VEF_1), capacidad vital forzada (CVF), índice de Tiffenau (relación VEF_1/CVF) en condiciones basales y posterior a la administración de broncodilatador (200 µg de salbutamol inhalado).

Los pacientes reunieron los criterios clínicos y espirométricos para diagnóstico definitivo de EPOC según la Asociación Americana del Tórax (ATS, 2004).

Aislamiento y purificación del ADN

Se realizó el aislamiento del ADN genómico a partir de leucocitos de sangre periférica de los pacientes con EPOC utilizando el estuche comercial QIAamp® DNA Mini Kit (Laboratorios Qiagen), el cual se fundamenta en el tratamiento de cada una de las muestras con una solución tampón de lisis que contiene la enzima Proteinasa K, y la posterior purificación del ADN mediante columnas de sílica gel.

Tipificación de HLA clase I y clase II

Una vez obtenida las muestras de ADN de los pacientes con EPOC se procedió a la caracterización genotípica de las moléculas HLA clase I y II utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

de cebadores específicos de secuencia (PCR-SSP) (Genovisión®).

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: la mezcla de reacción (master mix) fue suministrada por el kit y contenía los nucleótidos (dNTP, 200 μ M), buffer (50 mM KCL, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,001 % p/v gelatina), glicerol (5 %) y rojo de cresol (100 μ g/mL). La misma sólo requirió la preparación de una solución de ADN con una concentración final de 15 a 30 μ g/mL, diluido con agua libre de nucleasas (Promega®), y la Taq polimerasa (Promega®). El kit estaba formado por dos tipos de placas de material inerte con 96 y 32 pozos, para HLA clase I y II, respectivamente, conteniendo las secuencias iniciadoras o cebadores específicos de cada alelo, además de un control positivo para cada uno de los pozos. Los controles negativos estaban incluidos en los pozos 24, 72 y 96 de la placa para HLA clase I, y en el pozo 32 para HLA clase II. La amplificación por PCR se realizó en un termociclador MJ-Research (PTC-200®) cumpliéndose las siguientes fases: fase inicial: 94° C x 2 minutos seguido de 10 ciclos constituidos cada uno por una fase de desnaturalización de 94° x 10 segundos; una fase de hibridación de 65° C x 60 segundos y finalmente la extensión en 20 ciclos distribuidos como sigue: 94° C por 10 segundos, 61° C por 50 segundos y 72° C por 30 segundos. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, tinción con bromuro de etidio (10 mg/mL) y visualización en el transiluminador de luz UV.

Análisis estadístico

El tipaje de los alelos de HLA de cada uno de los pacientes se realizó mediante análisis manual, mediante el conteo de las bandas que resultaron positivas para cada uno de ellos en la corrida electroforética, y posteriormente comparando dichos resultados con los del inserto suministrado por el kit.

Se calculó la frecuencia y el porcentaje de edad, sexo, raza, severidad de la enfermedad (basados en los valores espirométricos y la clasificación clínica de cada paciente según las escalas antes mencionadas) y antecedentes patológicos. Se calcularon las frecuencias fenotípicas de pacientes y controles. Se utilizó la prueba de Chi cuadrado de Pearson para cada uno de los alelos HLA clase I y II, comparándolos con los controles, y aquellos que resultaron tener diferencias significativas, se les aplicó la corrección de Yates y la corrección de Bonferroni.

Se consideró un valor estadístico significativo si P

< 0,05 y altamente significativo si P < 0,01.

Los datos fueron procesados en una base electrónica del programa Microsoft Excel para Windows XP.

RESULTADOS

De los 50 pacientes con EPOC, 27 (54 %) fueron del sexo femenino y 23 (46 %) del sexo masculino, con edades promedio de ambos sexos de 63,36±9,63.

Con respecto a la tipificación de HLA, no se encontró incremento significativo de ningún alelo para el locus A y B en los pacientes con EPOC comparado con los sujetos de referencia. En el locus C, se observó una disminución de la frecuencia del alelo HLA-Cw03 en los pacientes con respecto a los controles (22 % y 50 % respectivamente) pero no significativa al realizar la corrección de Bonferroni (P=0,42). (Tabla 1).

Tabla 1
Tipificación HLA clase I (Locus C) en pacientes con EPOC

HLA	Pacientes (n=50)		Controles (n=24)		P corregido	Corrección de Bonferroni
	N	FF*(%)	N	FF* (%)		
Cw*01	6	12	2	8,33	-	
Cw*02	9	18	2	8,33	-	
Cw*03	11	22	12	50,00	0,03	0,42
Cw*04	13	26	7	29,17	-	
Cw*05	5	10	3	12,50	-	
Cw*06	4	8	2	8,33	-	
Cw*07	24	48	8	33,33	-	
Cw*08	3	6	3	12,50	-	
Cw*09	0	0	1	4,17	-	
Cw*12	2	4	0	0,00	-	
Cw*14	0	0	0	0,00	-	
Cw*15	5	10	0	0,00	-	
Cw*16	5	10	2	8,33	-	
Cw*17	2	4	2	8,33	-	

*Frecuencias fenotípicas
-P>0,05

Para los antígenos HLA clase II encontramos también una disminución en la frecuencia del alelo HLA-DRB1*07 con respecto a los controles (8 % versus 24,3 %), pero que al igual que el anterior no fue significativa al aplicar la corrección de Bonferroni (P=0,30) (Tabla 2).

Tabla 2
Tipificación HLA clase II (Locus DR) en pacientes con EPOC

HLA	Pacientes (n=50)		Controles (n=24)		P corregido	Corrección de Bonferroni
	N	FF*(%)	N	FF*(%)		
DRB1*01	6	12	19	17,76	-	-
DRB1*03	9	18	13	12,15	-	-
DRB1*04	19	38	38	35,51	-	-
DRB1*06	0		1	0,93-	-	-
DRB1*07	4	8	26	24,30	0,02	0,30
DRB1*08	12	24	13	12,15	-	-
DRB1*09	3	6	5	4,67-	-	-
DRB1*10	2	4	4	3,74	-	-
DRB1*11	7	14	17	15,89	-	-
DRB1*12	3	6	4	3,74	-	-
DRB1*13	10	20	25	23,36	-	-
DRB1*14	6	12	11	10,28	-	-
DRB1*15	6	12	28	26,17	-	-
DRB1*16	1	2	5	4,67	-	-
DRB1*18	1	2	0	0	-	-

*FF: Frecuencias genotípicas.
 -P>0,05

DISCUSIÓN

La EPOC constituye un proceso inflamatorio crónico complejo y multifactorial del árbol respiratorio, en donde la asociación con algunos alelos del sistema HLA puede tener un rol fundamental para el desarrollo de la patología. Respecto a la asociación de polimorfismos de los genes de HLA con EPOC, existen muy pocos estudios, y los mismos han sido realizados en individuos de distintas razas, resultando de esta manera en falta de reproductibilidad de los mismos. En 1983, Kauffmann y col.⁽⁸⁾ reportan el HLAB7 como alelo de susceptibilidad para EPOC (independiente del hábito tabáquico) en población caucásica (Franceses), encontrando una alta frecuencia de este alelo en pacientes con EPOC no fumadores, comparados con fumadores con criterios espirométricos normales. Sin embargo, en el 2005, Kasuga y col.⁽⁹⁾, no encontraron diferencia significativa entre pacientes fumadores, con signos espirométricos de EPOC y los individuos controles, con respecto a la presencia de HLA-B7. Cabe destacar que los pacientes incluidos en este estudio fueron 581 individuos de origen caucásico, de los cuales ninguno resultó homocigoto para el alelo Z del gen de la alfa-1 antitripsina (AAT).

Maranetra y col.⁽¹⁰⁾, en 1990, demuestran un incremento significativo en la frecuencia de HLA-Bw60 en dos grupos de pacientes con EPOC con distintos patrones de ventilación, sugiriendo que este alelo puede estar relacionado con la respuesta ventilatoria al CO₂ en EPOC, aunque no relacionado con el riesgo a la enfermedad. Este estudio no puede ser extrapolado a otras poblaciones, debido a que el HLA-Bw60 es un alelo comúnmente encontrado en población del sur este asiático (frecuencia alélica 8 %-16 %), más no en otras poblaciones, por ejemplo caucásicos (frecuencia 3 %-5 %).

La panbronquiolitis difusa es una enfermedad pulmonar obstructiva de curso crónico de etiología desconocida, caracterizada por tos crónica, esputo, disnea y limitación del flujo de aire de curso crónico. Aunque es prevalente en Japón, su presentación es rara en otros países, y sólo han sido reportados pocos casos en Chinos, Italianos y Norteamericanos. Hee y col.⁽¹¹⁾, en 1999, encontraron una fuerte asociación de HLA-A11 en 30 individuos Koreanos y una asociación no tan alta con otros alelos (B55, B62 y Cw4), determinados por métodos serológicos; Keicho y col.⁽¹²⁾, en 1998, reportaron que el 37 % de los individuos estudiados con panbronquiolitis difusa (76 pacientes japoneses), poseen HLA-B*5401, en comparación con el 15 % en individuos sanos, además de encontrar un alelo (HLA-B*5504) en 4 % de los pacientes con esta patología, que es un alelo muy infrecuente, único en asiáticos, y que estuvo ausente en el 100 % de los individuos controles (110).

Nuestros resultados, a diferencia de los obtenidos por los otros investigadores, no son concluyentes para establecer una asociación significativa entre los alelos de HLA clase I y II con la presencia de EPOC. Probablemente se necesiten de estudios que consideren otros tipos de marcadores genéticos más específicos para este tipo de patología.

CONCLUSIONES

No se encontró asociación entre ninguno de los alelos del sistema HLA y EPOC, a pesar de que la frecuencia de los alelos Cw*03 y DRB1*07 fue menor en los pacientes con respecto a los controles.

REFERENCIAS

1. Klein J, Sato A. The HLA System: First of two Parts. N Engl J Med. 2000;343(10):702-709.
2. Cresswell P. Antigen processing and presentation. Immunological

- Reviews. 2005;207:5-7.
3. Mannino D. Chronic obstructive pulmonary disease: Definition and epidemiology. *Resp Care*. 2003;48(12):1185-1193.
 4. Barnes PJ. Small airways in COPD. *N Engl J Med*. 2004;350(26):2635-2637.
 5. Koyama H, Geddes DM. Genes, oxidative stress, and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1998;53:10-14.
 6. Sandford AJ, Silverman EK. Chronic obstructive pulmonary disease. Susceptibility factors for COPD the genotype-environment interaction. *Thorax*. 2002;57:736-741.
 7. Ugenskiene R, Sanak M, Sakalauskas R, Szczeklik A. Genetic polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Medicina (Kaunas)* 2005;41(1):17-22.
 8. Kauffmann F, Kleisbauer JP, Cambon-De-Mouzon A, Mercier P, Constans J, Blanc M, et al. Genetic markers in chronic air-flow limitation. A genetic epidemiologic study. *Am Rev Respir Dis*. 1983;127(3):263-269.
 9. Kasuga I, Ruan J, Conté J, Anthonisen N, Sandford A. Lack of association of human leukocyte antigen-B7 with COPD and rate of decline in lung function. *Resp Med*. 2005;99:1528-1533.
 10. Maranetra N, Chandanayingyong D, Bovornkitti S. HLA antigen and ventilatory drive in Thais with chronic obstructive pulmonary disease. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 1990;8:137-140.
 11. Hee M, Whan Y, Il H, Yoo C, Koo S, Shim Y, et al. Association of HLA Class I antigens with diffuse panbronchiolitis in Korean patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:526-529.
 12. Keicho N, Tokunaga K, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Bannai M, et al. Contribution of HLA to genetic predisposition in Diffuse Panbronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158:846-850.

DIRECCIÓN: Dra. Nancy E. Larocca G. Teléfono: 0212-6053509. E-mail: alaroccaq@cantv.net