

Asociación de antígenos HLA - Clase II - locus DR con patología hematológica

Etchegoyen O*, Piccinelli G*, Gardenal L*, Mansilla E*, Mena M.E*, Milone J*, Morales V.H*

* ITMO. Instituto de Trasplante de Médula Ósea. La Plata. Argentina.

* CUCAIBA. Histocompatibilidad. La Plata. Argentina

Este trabajo recibió el 1er Premio del XIV Congreso Argentino de Hematología otorgado por la Sociedad Argentina de Hematología



ARTÍCULO ORIGINAL

HEMATOLOGÍA, Vol. 3 N° 3: 265-269
Noviembre-Diciembre, 1999

INTRODUCCIÓN

Hace más de 30 años se describió la primera asociación entre un antígeno del sistema HLA (Human Leucocyte Antigens) y una enfermedad hematológica. En 1967, J.C. Amiel comunica al 3er. Workshop Internacional de Histocompatibilidad efectuado en Torino (Italia) que un antígeno HLA llamado 4c (actualmente incluye los antígenos B5 - B35 y B18) se asociaba de manera positiva con un proceso hematológico, la enfermedad de Hodgkin, con una frecuencia del 51% en pacientes contra un 27% en controles sanos¹. Este trabajo inició una serie de estudios de múltiples patologías asociadas a HLA, que incluyen hoy a más de 500 entidades nosológicas. Muchas de estas asociaciones son fortuitas y débiles, en muchos casos la heterogeneidad del grupo enfermo no permite obtener resultados significativos, pero en otros casos las asociaciones son fuertes y no existen dudas de que uno o varios de los genes codificados dentro del complejo HLA están involucrados en la patogénesis de la enfermedad, en especial si consideramos que los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad juegan un rol central en la respuesta inmune del individuo, ya que la presentación y el reconocimiento de péptidos antigénicos es realizada por moléculas HLA, Clase I y Clase II.

Los procesos oncohematológicos han sido estudiados históricamente buscando encontrar asociaciones entre HLA y enfermedad de Hodgkin², leucemias agudas^{3-4,5,6,7} y con anemia aplásica severa^{8,9,10,11}, encontrándose, en muchos de los casos, genes asociados a la enfermedad, lo que ha sugerido que los mismos estarían involucrados en la etiopatogenia de la misma. Los estudios citados fueron efectuados me-

diante técnicas serológicas, antes de conocerse y definirse los genes de Clase II y sus productos, y sin contar con la sensibilidad y especificidad que aporta los estudios de biología molecular al conocimiento del mismo.

OBJETIVO

El objetivo del presente estudio ha sido:

- 1- Determinar los alelos HLA - Clase II, locus DR mediante la tipificación por biología molecular, (PCR) en diferentes patologías hematológicas: Leucemias Mieloblástica Aguda (LMA), Leucemia Mieloide Crónica (LMC), Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), y en Anemia Aplásica Severa (AAS).
- 2- Establecer las frecuencias HLA-Clase II- locus DR en cada patología.
- 3- Comparar las frecuencias obtenidas en el grupo de pacientes con las encontradas en un grupo control sano, obtenido de la población general y establecer el riesgo relativo, la fracción etiológica y la fracción preventiva para dichas patologías.

Material y Métodos

Pacientes y Controles.

En el período 5/95 y 6/98, fueron estudiados 238 pacientes caucásicos, remitidos a los laboratorios de Histocompatibilidad de ITMO, Instituto de Trasplante de Médula Ósea de La Plata, y de CUCAIBA, Centro Único Coordinador de Ablación e Implante de Órganos de la Provincia de Buenos Aires. En todos los casos los pacientes fueron enviados para determinar el grado de compatibilidad HLA para un eventual alotrasplante de médula ósea.

Las patologías estudiadas fueron: Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA) n=66, Leucemia Mieloide Crónica (LMC) n=59, Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) n=61, y Anemia Aplásica Severa (AAS) n=52. Las características de sexo y edad de los pacientes se observan en la Tabla 1.

Durante ese mismo período se determinó la frecuencia antigénica HLA de 2000 donantes voluntarios de sangre (controles sanos).

Tipificación HLA - Clase II - locus DR

Se utilizaron técnicas de biología molecular PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en sus 2 variantes, SSP (amplificación con primers de secuencia específica) o SSO (hibridación con sondas oligonucleotídicas de secuencia específica).

La extracción de DNA se efectuó a partir de sangre periférica extraída sobre EDTA al 5%, se aislaron células mononucleadas sobre gradiente de ficoll-hypaque (densidad 1,076), y se empleó método de Salting-out. El DNA obtenido fue cuantificado en espectrofotómetro UV (D.O 260/280).

PCR-SSP. Se amplificó el DNA con Taq. DNA polimerasa y 24 pares de primers específicos de secuencia en termociclador de manera que se obtienen diferentes patrones de amplificación de acuerdo al antígeno encontrado. A los productos amplificados se los somete a electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. Se efectúa fotografía del gel con empleo de transiluminador UV y se interpreta el resultado analizando el patrón de bandas obtenido.

PCR-SSO. Se parte de la amplificación del DNA genérico para el locus DR con empleo de 2 primers (sense y antisense). Se controla el producto obtenido en gel de agarosa al 2,5%, teñido con bromuro de etidio (278bp). El producto amplificado se siembra en membranas de nylon con carga positiva mediante técnicas de dot-blott, se hibridiza dicho DNA con 37 sondas marcadas con fosfatasa alcalina (FA) y se efectúa la detección por quimioluminiscencia empleando un sustrato de FA que emite luz y revela a una placa fotográfica. Finalmente se analiza el patrón de manchas obtenido (dot-blott) para cada muestra y se asigna el alelo correspondiente.

Asociación de un marcador genético con la enfermedad.

El significado estadístico de una probable asociación HLA, es decir que un antígeno se encuentre significativamente elevado sugiriendo susceptibilidad asociada a HLA, o significativamente disminuido, sugiriendo protección, en el grupo enfermo comparado con testigos sanos, se calculó con empleo de la prueba del chi cuadrado (χ^2) que uti-

liza una tabla de contingencia 2x2, como se demuestra a continuación:

	Con antígeno	Sin antígeno	Total
N° de pacientes	a	b	a + b
N° de testigos	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	N = a + b + c + d

$$\chi^2 = \frac{(a \cdot d - b \cdot c)^2 / N}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

Una vez obtenido χ^2 se buscó el valor de la probabilidad p en las tablas de estadísticas, tomando en cuenta los grados de libertad, en este caso 1, ya que se comparó 2 poblaciones para un antígeno.

Luego de comprobar que un antígeno está aumentado o disminuido significativamente se procedió a determinar riesgo relativo (RR), fracción etiológica (FE) y fracción preventiva (FP).

El RR es una estimación de la intensidad de la asociación entre la enfermedad y el antígeno, y nos indica cuál será el riesgo de desarrollo de la enfermedad en un individuo que lo posee. Se calcula según la fórmula de Woolf:

$$RR = \frac{a \cdot d}{b \cdot c}$$

La FE es un valor relativo que nos informa cuánto de la enfermedad se debe al antígeno y, cuanto más se acerca al valor a 1, crece la responsabilidad del marcador en estudio.

Se calcula de esta manera:

$$FE = \frac{RR - 1}{RR} \times \frac{a}{a + b}$$

La FP es también una medida relativa y va a indicar cuánto de la protección a padecer la enfermedad se debe al antígeno evaluado. Se calcula en base a:

$$FP = \frac{(1 - RR) \cdot hp}{RR(1 - hp) + hp} \quad \text{en donde } hp = \frac{a}{a + b}$$

RESULTADOS

La determinación de los antígenos del locus DR en pacientes y en controles sanos se pueden apreciar en el gráfico 1.

TABLA 1
PATOLOGÍAS ESTUDIADAS

	LMA	LMC	LLA	AAS
N° pacientes	66	59	61	52
Sexo				
Masculino	31 (47%)	39 (66%)	31 (51%)	40 (77%)
Femenino	35 (53%)	20 (34%)	30 (49%)	12 (23%)
Edad				
Media (años)	26	33	12	20
Rango	1 - 60	1 - 55	1 - 40	3 - 41

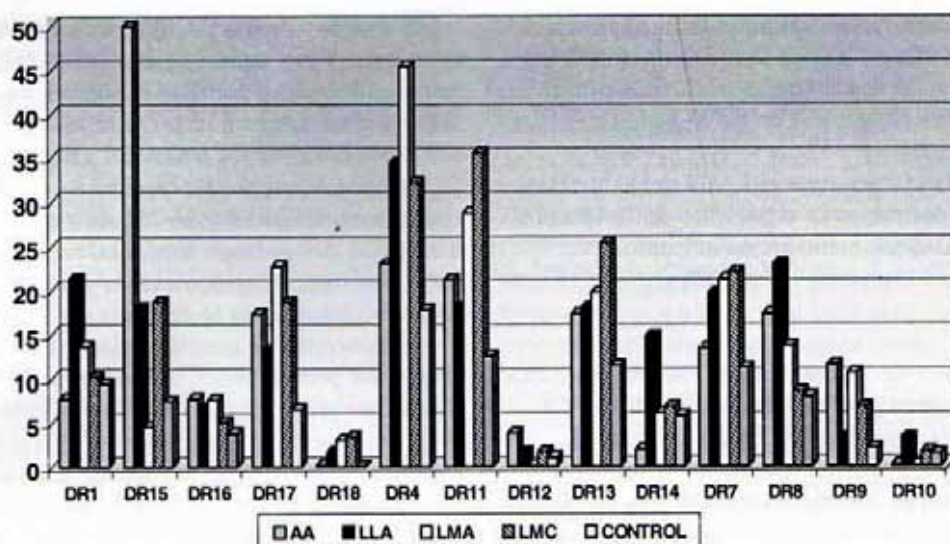


Gráfico 1: HLA Clase II-DR en patología hematológica y controles sanos

Tabla 2. Patología hematológica y alelos HLA.

DR15

AAS					CONTROLES SANOS	
N	%	RR	p	FE	N	%
26	50	5,6	< 0,0001	0,41	283	7,4

DR4

LMA					CONTROLES SANOS	
N	%	RR	p	FE	N	%
30	45,4	1,7	0,03	0,19	645	17,8

DR11

LMC					CONTROLES SANOS	
N	%	RR	p	FE	N	%
21	35,6	1,8	0,01	0,16	470	12,5

Cuando se evaluaron los alelos DR asociados a patologías hematológicas se encontraron asociados de manera positiva los antígenos DR15, DR4 y DR11 para AAS, LMA, y LMC respectivamente. Tabla 2.

En LLA no se encontró antígenos HLA-DR que presentaran asociaciones positivas con la enfermedad.

En AAS se observó prevalencia estadísticamente significativa del sexo masculino (77% vs. 23%, RR = 3,30 y p= 0,008). El antígeno DR15 se encontró más frecuentemente en mujeres afectadas que en hombres (83% vs. 40%; RR= 7,5; p= 0,02).

El alelo HLA-DR52 presentó una frecuencia incrementada en LMC y disminuida en LMA y el alelo HLA-DR53 se encontró aumentado en LMA, como se puede observar en la tabla 3.

Discusión

La relación entre los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), y la leucemia ha sido motivo de controversias durante años.

Tabla 3. Asociación de HLA-DR52 y DR53 con leucemias y anemia aplásica.

		AA	LLA	LMA	LMC	Controles
DR52	Frec. Fenot.	0,6154	0,6557	0,3485	0,8983	0,6506
	P	n.s	n.s	<0,0001	<0,0001	-
	RR	-	-	0,29	4,74	-
	FE / FP	-	-	0,46 (FP)	0,71 (FE)	-
DR53	Frec. Fenot.	0,4808	0,5902	0,7879	0,5938	0,5253
	P	n.s	n.s	<0,0001	n.s	-
	RR	-	-	3,36	-	-
	FE / FP	-	-	0,55 (FE)	-	-

En el ratón la homocigosis para el haplotipo H-2^K determina una susceptibilidad aumentada para padecer leucemias espontáneas inducidas por virus, linfomas y otras neoplasias en un huésped genéticamente predispuesto.¹²⁻¹³⁻¹⁴

La demostración de que el CMH del ratón posee una clara influencia en el desarrollo de la leucemia murina, impulsó los estudios en el hombre.

En los seres humanos la falta de segregación específica de la enfermedad hace difícil suponer que el sistema HLA o sus alelos se involucren directamente en el proceso de leucemización. Se especula que deben existir otros genes recesivos ligados al CMH, que determinan susceptibilidad o resistencia a la leucemia.¹⁵

Por otra parte, alelos o asociaciones de alelos, homocigosis aumentada al igual que antígenos compartidos por los progenitores han sugerido una transmisión preferencial ligada al HLA.

De todos modos debemos tener en cuenta que factores genéticos como ambientales interactúan en los procesos biológicos.

Nuestro trabajo ha estado dirigido a indagar si los alelos del sistema HLA desempeñan algún rol de susceptibilidad o de resistencia en patología hematológica.

Hemos determinado las frecuencias HLA Clase II, locus DR en pacientes y comparado las mismas con controles sanos.

En LMC encontramos aumentada la frecuencia del alelo DR11 (35,6% vs 12,5% - RR= 1,8 - p= 0,01 - FE= 0,16); con un aumento del antígeno DR52 (90% vs 65% - RR=4,7 - p=0,0001 - FE=0,71). El antígeno DR11 contribuiría a la etiopatogenia de la LMC igual que el DR52, aunque este último de manera secundaria.

No determinamos homocigosis aumentada para DR53 tal como ha sido comunicada por otros autores.¹⁶

Un estudio reciente ha comunicado que la expresión de HLA B8 y en particular cuando se asocia a HLA A3, se relaciona con una menor incidencia de LMC. La explicación de este hecho es que la presentación inmunológica de secuencias de aminoácidos específicas (oligopéptidos), derivadas de la proteína de fusión p210 del oncogén bcr/abl, expresadas por moléculas HLA en la superficie de la células leucémicas inducen una respuesta inmunológica de linfocitos T citotóxicos específicos.¹⁷

En LMA hemos encontrada aumentada el alelo DR4 (45,4% vs 17,8% - RR= 1,7 - p= 0,03 - FE= 0,19). Se encontró un aumento en la expresión del HLA DR53, que se asocia a la expresión del alelo DR4. No se observó diferencia en la incidencia según el sexo.

El análisis de los pacientes con LLA no demostró ninguna asociación de antígenos HLA que influya sobre la susceptibilidad o resistencia a padecer la enfermedad. Otros autores han señalado asociaciones moderadas de los alelos del grupo DR53. La causa atribuida de esta asociación ha sido la reacción cruzada entre DR53 y H-2E^K de ratón, la similitud molecular del epítopo inmunodominante del DR53 con virus oncogénicos o quizás genes de susceptibilidad localizados en la cercanía de HLA DR53.¹⁸

El concepto de anemia aplásica fue introducido hace años por Ehrlich¹⁹. La etiología de la misma se desconoce en la mayoría de los pacientes, aun cuando la exposición a medicamentos, tóxicos o infecciones virales se pueden identificar en algunos casos. Su patogenia es heterogénea²⁰, habiéndose señalado como causa, un defecto a nivel del compartimento medular más primitivo (stem cell), un defecto del microambiente medular o como producto de una supresión inmunológica sobre la hemopoyesis con argumentos que avalan cualquiera de los mecanismos indicados.²¹

La susceptibilidad genética a padecer enfermedades ha sido indicada hace ya muchos años.

En nuestro trabajo hemos encontrado un aumento significativo en la población afectada por AAS del alelo DR15 (50% vs. 7.4 de la población control - RR = 5.6 - p> 0.00001 - FE 41%).

Cuando analizamos el sexo de los pacientes, y se asume que tendría que afectar por igual a ambos, encontramos un aumento en los pacientes con AAS de sexo masculino (40 pac. 77% vs 12 pac. 23% p= 0.008).

Del análisis de la presencia del alelo DR 2, en nuestra población existe una mayor probabilidad de padecer AAS en mujeres DR15 + que en varones (RR= 7,5 p=0.02).

Ya en 1986, Chapuis y col²² señalaron un aumento en la frecuencia del alelo DR2 y de la homocigosis en pacientes con AAS, indicando como teoría la presencia de genes recesivos involucrados en su etiopatogenia.

Trabajos posteriores coinciden en mostrar un aumento en AAS del antígeno DR2 (actualmente se conoce sus divisiones en DR15 y DR16) y del antígeno DPw3²³⁻²⁴⁻²⁵.

Además se ha señalado que la respuesta al tratamiento con Ciclosporina (CsA), está circunscrita a una población con el alelo DRB₁ 1501, o a aquellos haplotipos en los cuales se expresa este alelo²⁶. Esto indicaría que un grupo de pacientes con AAS, DR15 + posee como común denominador un factor inmunológico que interviene en su patogénesis, altamente respondedor al tratamiento con CsA²⁷⁻²⁸.

En nuestra experiencia la presencia del alelo DR15 está señalando un riesgo aumentado de padecer AAS, la mayor incidencia de esta patología en varones y la probabilidad de padecer la enfermedad es mayor en mujeres DR15+.

Actualmente se analizan diferentes protocolos de tratamiento y la respuesta según sus características HLA.

BIBLIOGRAFÍA

- Amiel J.C. Study of the leucocyte phenotypes in Hodgkin's disease. In Curtoni E.S, Mattiuz PL, Tosi RM, eds Munksgaard. Histocompatibility Testing. Copenhagen 1967, p79.
- Hors J, Dausset J. HLA and susceptibility to Hodgkin's disease. *Immunol. Rev.* 1983, 70, 167.
- Chan, K.W, Pollack M.S, Braun, D, O'Reilly R.J, Dupont B. Distribution of HLA genotypes in families of patients with acute leukemia. *Transplantation.* 1982, 33, 613.
- Werner-Favre C, Jeannet M. HLA compatibility in couples with children suffering from acute leukemia or aplastic anemia. *Tissue Antigens,* 1979, 13, 307.
- Mc. Sween H.M., Fernandez L.A., Eastwood S.L., Pyesmany A.F. Restricted genetic heterogeneity in families of patients with acute lymphocyte leukemia. *Tissue Antigens,* 1980, 16, 70.
- Fliedner U.V, Llerica H, Jeannet H, Chapuis B, Feldges A, Imbach P, Wyss H. Mise en evidence de facteurs génétiques liés au système HLA conférant une susceptibilité augmentée à la leucémie lymphoblastique aiguë chez l'enfant. *Schweiz. Med.Wschr.* 1983.113, 1445.
- Winchester R., Toguchi T, Szer I, Burmester G, Galbo PL, Cuttner J, Capra J.D, Nuñez Roldan A. Association of susceptibility to certain hematopoietic malignancies with the presence of Ia allodeterminants distinct from the DR series: utility of monoclonal antibody reagents. *Immunol. Rev.* 1983, 70, 155.
- Albert E, Thomas E.D, Nisperos B, Storb R, Camita BM, Parkman R. HLA antigens and haplotypes in 200 patients with aplastic anemia. *Transplantation,* 1976, 22 (5), 528-31.
- Dausset J, Gluckman E, Lemarchand F, Nuñez Roldan A, Contu L, Hors J. Excess of HLA - A2 and HLA - A2 homozygotes in patients with aplastic and Fanconi's anemias. *Nouv. Rev. Fr. Hematol. Blood Cells.* 1977, 18 (2): 315-24.
- Gluckman E, Papon L, Hors J, Devergie A, Busson M, Gony Y, Dausset J. HLA morbers in patients suffering from aplastic anemia. *Haematologia (Budap)* 1981; 14 (2) 165-72.
- D'Amato J, van Rood JJ, Rimm AA, Bortin MM. HLA association Italian and non Italian caucasoid aplastic anaemia patients. *Tissue Antigens* 1983. 21 (3) 184-91.
- Gross L. Biological properties of the mouse leukemia virus and its pathogenic potency for mice and rats. Oncogenic viruses. Pergamon Press ed. 1970 chapter 11 , 286-469.
- Dorak M.T, Chalmers E., Gaffney D., Wilson D., Galbraith I., Henderson N., Worwood M., Mills K., Burnett A. Human major histocompatibility complex contains several leukemia susceptibility genes. *Leuk. Lymphoma.* 1994, 12 (3-4), 211-22.
- Dorak M.T., Burnett A. Major histocompatibility complex, t-complex, and leukemia. *Cancer Causes Control.* 1992, 3 (3), 273-82.
- Jeannet M., Carpentier N. HLA markers in leukemia patients. *Pathol. Biol. (Paris)* 1986, 34 (6), 747-52.
- Dorak M.T., Owen G., Galbraith I., Henderson N., Webb D., Mills K., Darke C., Burnett A. Nature of HLA associated predisposition to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1995, 9 (5), 875-8.
- Posthuma E., Falkenburg J., Apperley J., Gratwohl A., Roosnek E., Hertenstein B., Schipper R., Schreuder G., D'Amato J., Oudshoorn M., Biezren J., Hermans J., Willemze R., Niederwieser B. On behalf of the Chronic Leukemia Working Party of the EBMT. HLA-B8 and HLA-A3 coexpressed with HLA-B8 are associated with a reduced risk of the development of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1999, 93 (11), 3863-65.
- Dorak M.T, Lauson T., Machullia H., Darke C., Mills K., Burnett A., Unravelling an HLA DR association in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999, 94 (2), 694-700.
- Ehrlich P. Über einen Fall von anämie mit Bemerkungen über regenerative Veränderungen des Knochenmarks. *Charité. Ann.* 1988, 13, 300.
- Appelbaum F.A, Fefer A. The pathogenesis of aplastic anemia. *Sem. Hematol.* 1981, 18: 241.
- Sell A.M, Donadi E.A, Voltarelli J.C, Oliveira V.C, Biral A.C, Thomas E.M, Brandalise S.R, Magna L.A, Teixeira M.P, Aranega V.L, Kraemer M.H.S. Population and family study of histocompatibility antigens in acute leukemias and aplastic anemia. Genetic Diversity of HLA. Functional and Medical Implications. D. Charron Ed. 1997. EDK, Paris, France.
- Chapuis B, Von Fliedner V.E, Jeannet M, Merica H, Vuagnat P, Gratwohl A, Nissen C. Increased frequency of DR2 in patients with aplastic anaemic and increased DR sharing in their parents. *Br. J. Haematology.* 1986 (1): 51-7.
- Nimer SD, Ireland P, Meshkinpour A, Frane M. An Increased HLA DR2 frequency is seen in aplastic anemia patients. *Blood* 1994. 84 (3) 923-927.
- Odum N, Platz P, Marling N, Jacobsen N, Jacobsen BK, Rydeer LP, Sverjgaard A. Increased frequency of HLA - DPw3 in severe aplastic (AA). *Tissue Antigens.* 1987 (4): 184-5.
- Nakao S, Takamatsu H, Chuhjo T, Ueda M, Shiobara S, Matsuda T, Kaneshige T, Mizoguchi H. Identification of specific HLA Class II haplotype strongly associated with susceptibility to cyclosporine dependent aplastic anemia. *Blood.* 1994 (12): 4257-61.
- Nakao S, Takami A, Sugimori N, Ueda M, Shiobara S, Matsuda T, Mizoguchi H. Response to immunosuppressive therapy and HLA - DR B1 allele in patients with aplastic anaemia: HLA DB1*1501 does not predict response to antithymocyte globulin. *Br. J. Haematology.* 1996 (1): 155-8.
- Ilhan O, Beksac M, Koc H, Akan H, Keskin A, Arslan O, Gurman G, Ozcan M, Konuk N, Uysal A. HLA - DR frequency in Turkish aplastic anemia patients and the impact of HLA - DR2 positivity in response rate in patients receiving immunosuppressive therapy. *Blood* 1995 (5): 2055.
- Ilhan O, Beksac M, Arslan O, Ozcan M, Koc H, Akan H, Gurman G, Konuk N, Uysal A. HLA - DR2: a predictive marker in response to cyclosporine therapy in aplastic anemia. *Int. J. Hematology* 1997 (3): 291-5.