



67  
28j

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA  
ASOCIADA AL COMPLEJO PRINCIPAL  
DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN  
ALVEOLITIS ALÉRGICA EXTRÍNSECA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A

JOSE IGNACIO PARAMO RAMIREZ



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## C A P I T U L O S

- I. OBJETIVO
- II. INTRODUCCION
- III. MATERIAL Y METODOS
- IV. RESULTADOS
- V. DISCUSION
- VI. RESUMEN
- VII. CONCLUSIONES
- VIII. BIBLIOGRAFIA

**OBJETIVO:**

Determinar si existe una susceptibilidad genética en los pacientes que desarrollan Alveolitis Alérgica Extrínseca por inhalación de antígeno aviario, demostrable con el estudio del Sistema Mayor de Histocompatibilidad.

**INTRODUCCION:**

La Alveolitis Alérgica Extrínseca (AAE) es una enfermedad pulmonar bilateral y difusa que se caracteriza por la presencia de inflamación de predominio mononuclear, la cual compromete a los bronquiolos, alvéolos e intersticio (1-4).

Este padecimiento es provocado por la inhalación repetida de una variedad de partículas de naturaleza orgánica, que incluyen proteínas de aves y mamíferos, hongos y bacterias termofílicas (4). En México los agentes etiológicos más frecuentes son las proteínas aviarias (Enfermedad de los cuidadores de palomas) y las bacterias termofílicas presentes en el bagazo de caña de azúcar (5-7).

Aunque su patogénesis no ha sido completamente esclarecida, la mayoría de las evidencias obtenidas, tanto en humanos como en modelos experimentales, sugieren que las lesiones son producidas por una respuesta inmunopatológica dual, en la que participan la formación de complejos inmunes y fundamentalmente una reacción del tipo de la hipersensibilidad celular (8-11). Sin embargo, desde un punto de vista integral, el daño tisular se deriva probablemente de una compleja interacción anormal de células inflamatorias e inmunocompetentes, mediadores biológicos y enzimas proteolíticas, que en conjunto se traduce en las alteraciones observadas en el parénquima pulmonar.

Una de las preguntas más importantes en torno a la AAE y que hasta la fecha no ha podido ser respondida, es por qué sólo una

pequeña parte de la población expuesta a alguna de estas partículas orgánicas desarrolla la enfermedad (4,12). Si asumimos que, en términos generales, la mayoría de los sujetos de un grupo de riesgo están expuestos al mismo antígeno, tanto cuantitativa como cualitativamente, podemos inferir que la diferencia fundamental entre aquellos que adquieren el padecimiento y los que no lo hacen, reside en el individuo y no en la composición o cantidad de las partículas orgánicas inhaladas (13). Otra observación que apoya este enfoque es que la enfermedad se da en varios miembros de una familia y no en otras personas expuestas en el mismo lugar, pero no emparentadas.

Esta línea de pensamiento, basada en la observación clínica y epidemiológica, sugiere que la predisposición genética puede tener un papel clave en el desencadenamiento de la enfermedad.

Un instrumento apropiado para estudiar esta posible susceptibilidad es la tipificación del Complejo Principal de Histocompatibilidad (Sistema HLA), el cual está constituido por un conjunto de loci ubicados en el brazo corto del cromosoma 6 (Fig.1) que tiene la particularidad de controlar la capacidad para montar respuestas inmunes (genes Ir en el ratón y región D en el humano) y la presencia de isoantígenos de superficie celular, proteínas que son necesarias tanto para la presentación de antígenos por parte de los macrófagos a los linfocitos T cooperadores, como de estas células en la activación de los linfocitos B. A este sistema también pertenecen los genes que controlan la formación de algunos componentes del complemento (C2, C4A, C4B

y Factor B de la properdina). En otras palabras en el HLA radica el control genético de la respuesta inmune y, por lo tanto, es un excelente candidato para explorar la posibilidad de predisposición genética a enfermedad. Existen además antecedentes a este respecto en los que sí se han encontrado relaciones HLA-enfermedad, los casos enlistados en la tabla I son en los que, hasta la fecha, se ha demostrado una gran correlación. Entre ellos destacan el Síndrome de Goodpasture con el HLA-DR<sub>2</sub>, Dermatitis herpetiforme con HLA-DR<sub>3</sub>, Enfermedad de Reiter con HLA-B<sub>27</sub>, mismo marcador que se ha encontrado ligado a la Espondilitis anquilosante; este último ejemplo es el caso de relación más estrecha descubierta hasta hoy, ya que el hecho de ser portador de tal marcador implica un riesgo relativo de padecer la enfermedad de 87.4, lo que significa que la probabilidad de padecerla es 87.4 veces mayor que la de un individuo que no tenga este marcador.

En este contexto, estudios realizados en cepas singénicas de ratón sugieren que una cierta susceptibilidad genética asociada al complejo H-2 (equivalente al HLA humano) parece favorecer el desarrollo y gravedad de las lesiones pulmonares inducidas por inhalación de partículas orgánicas (14). Por otra parte existen algunos reportes en la literatura que intentan asociar este sistema con la susceptibilidad a desarrollar esta enfermedad en humanos, pero los resultados han sido contradictorios y poco concluyentes (15). En esto pueden influir dos factores importantes: la heterogeneidad étnica de las poblaciones es

tudiadas y la inadecuada selección de pacientes, dada la complejidad clínica del padecimiento.

Con el propósito de intentar aclarar esta problemática en población mestiza mexicana se estudiaron los fenotipos del Sistema HLA, locus A,B,C y DR, en 44 individuos con AAE inducida - por inhalación de antígeno aviario, comparándose los resultados con aquellos obtenidos en 200 sujetos control, de características étnicas similares. Además, en 21 pacientes y 20 controles - se analizó el locus DQ, el cual no había sido previamente estudiado en México.



## MATERIAL Y METODOS.

### 1) Población en Estudio.

#### a. Grupo problema.

Se estudiaron 44 pacientes mestizos mexicanos no emparentados, 9 del sexo masculino y 35 del femenino, con AAE inducida por antígeno aviario. La edad promedio en el momento del estudio era de  $34 \pm 11$  años y el tiempo de evolución del padecimiento osciló entre 3 y 12 meses. Ninguno de los pacientes estaba bajo tratamiento ni presentaba otra entidad nosológica asociada al Sistema HLA.

Las bases para el diagnóstico, en todos los casos, fueron las siguientes:

1. Antecedentes de exposición a palomas y relación causa-efecto.
2. Presencia de un cuadro clínico, radiológico y funcional respiratorio caracterizado por:
  - a) Disnea de esfuerzo progresiva.
  - b) Estertores crepitantes y subcrepitantes en ambos campos pulmonares, de predominio basal.
  - c) Alteración funcional respiratoria de tipo restrictivo, puro o predominante; caracterizada por disminución de la Capacidad Pulmonar Total, Capacidad Vital y Distensibilidad Pulmonar, con aumento de la Presión de Retracción Elástica.
  - d) Hipoxemia en reposo, que empeoraba con el ejercicio.

e) Imágenes micronodulares, nodulares o reticulonodulares en la radiografía de tórax, diseminadas en ambos pulmones, sin adenopatía hilar.

3. Presencia de anticuerpos circulantes contra antígenos obtenidos de suero y excretas de paloma.
4. Mejoría parcial, al suprimir la exposición al antígeno aún en ausencia de tratamiento específico.
5. Alteraciones morfológicas en el tejido pulmonar obtenido por biopsia a cielo abierto, que cumplieran los criterios clásicamente aceptados para el diagnóstico (16) (Fig. 2), éstos es, inflamación intersticial de franco predominio mononuclear, con monocitos, linfocitos, células plasmáticas y ocasionalmente células gigantes multinucleadas, tanto en bronquiolos terminales y respiratorios como en los tabiques interalveolares. También se observó la presencia de macrófagos de citoplasma vacuolado ("macrófagos espumosos") en los espacios alveolares y algunos granulomas pobremente formados en el intersticio.

b. Grupo control.

Como controles se estudiaron 200 sujetos sanos, 120 mujeres y 80 hombres, que presentaban condiciones étnicas, socioeconómicas y nutricionales similares al grupo problema.

2) Análisis de los fenotipos del Sistema HLA:

Los marcadores de los diferentes alelos del Sistema HLA fueron determinados con el ensayo de microcitotoxicidad de Terasaki (17), en linfocitos obtenidos de sangre periférica. Los fenotipos de los

locus A,B y C se estudiaron sobre los linfocitos T y los de los locus DR y DQ sobre los linfocitos B.

Se utilizaron antisueros provenientes del Sidney Farber Cancer Institute, Boston, E.U.; de los Institutos Nacionales de Salud de los E.U.; y del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias a través del Programa de Búsqueda de Antisueros en Población Mestiza y Autóctona Mexicana.

#### Purificación de linfocitos (18,19) (Figs. 4 y 5).

Los linfocitos se purifican de sangre periférica obtenida por punción venosa. La sangre es defibrinada utilizando perlas de vidrio, pasándola posteriormente a través de un gradiente de Ficoll-Hypaque (cuya densidad es de 1.076-1.078)\*.

Por centrifugación, los eritrocitos y polimorfonucleares se depositan en el fondo, mientras que los linfocitos quedan muy cercanos a la interfase de suero y solución separadora. Se colectan los linfocitos con una pipeta Pasteur y a continuación se lavan con solución de Hanks (#2) con el objeto de eliminar Ficoll y suero.

#### Separación de linfocitos T y B (20-22):

El método empleado para la separación de linfocitos T y B se basa en la capacidad que tienen los linfocitos B y los macrófagos de adherirse a la fibra de Nylon. Por esta razón, cuando se pasa la suspensión celular a través de una columna de lana de Nylon se eluyen los linfocitos T, mientras que los linfocitos B deben de liberarse mecánicamente por compresión. De esta manera, es posible obtener una pureza de linfocitos T del 96%; la que es adecuada pa-

\*Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. U.S.A. No. Cat. 1077-1

ra la separación de subpoblaciones de linfocitos.

Preparación de las columnas de Nylon:

- Sellar con calor un extremo de la columna, con ángulo de 45°.
- Sumergir 100 mg de fibra de Nylon en solución de Hanks.
- Introducir el Nylon en la columna, distribuyéndolo uniformemente a lo largo de 6 cm.
- Practicar un orificio en el extremo sellado de la columna, de manera que permita el flujo de líquidos.
- Llenar la columna con medio de cultivo (que contenga 5% de suero fetal de ternera [SFT], sellar con medio de cultivo, e incubarla a 37°C durante 30 min colocándola horizontalmente.

Obtención de linfocitos totales:

- Los linfocitos purificados se resuspenden en 0.5 ml de medio de cultivo.
- Se coloca la columna verticalmente y se aplica la suspensión de células con la ayuda de una pipeta Pasteur, de tal forma que ocupe la totalidad del espacio relleno de fibra teniendo cuidado de sellarla.
- Incubar la columna horizontalmente durante 30 min a 37°C.
- Se coloca la columna verticalmente sobre un tubo de ensayo y se lava con 15 ml de medio McCoy (43) para eluir los linfocitos T. Las células obtenidas en la primera lavada son las que se emplean para determinar las especificidades -A y -B.

- El tubo que contiene los linfocitos se centrifuga a 2500 rpm durante 10 min.
- Se descarta el sobrenadante y se resuspenden los linfocitos en medio de cultivo.
- Se cuentan las células en un hemocitómetro y se ajustan a una concentración de  $4 \times 10^6$  células/ml con medio de cultivo.

#### Prueba de viabilidad:

La prueba de microcitotoxicidad requiere células vivas; por lo tanto, es muy importante comprobar la viabilidad de las mismas. Esto es posible determinarlo aprovechando la capacidad de las células vivas de excluir colorantes como el azul tripan (de los llamados colorantes vitales)\* el cual es capaz de penetrar en una célula que tenga dañada su membrana lo que se considera muerte celular. Se realiza un conteo porcentual de células vivas y muertas; el mínimo que se considera adecuado es de 90% de células vivas.

- Se mezcla 0.1 ml de la suspensión de linfocitos con 0.1 ml del colorante en un tubo de ensayo.
- Se incuba a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- A continuación se coloca una gota de la mezcla sobre un portaobjetos y enseguida se pone un cubreobjetos.
- Se lee al microscopio usando el objetivo seco fuerte, las células vivas excluyen al colorante y se observan refringentes, mientras que las células muertas permiten la entrada del azul tripan y por lo mismo se tiñen de color azul.
- Se cuentan 100 células, calculando a continuación el porcen-

\* Trypan Blue SIGMA Chemical Co., St. Louis, Mo. USA Cat.T-0887

taje de viabilidad.

Microcitotoxicidad (17):

Fundamento: La prueba de microcitotoxicidad consiste básicamente en la lisis de células por acción del complemento en caso de que dichas células hayan sido reconocidas por anticuerpos específicos contra sus marcadores de superficie. Para realizar esta prueba se incuban linfocitos en presencia de antisueros que tienen anticuerpos monoespecíficos contra proteínas de superficie que son producto de la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad; si los anticuerpos reconocen a alguna de estas proteínas, se unirán a ellas formando así un complejo Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac). Al ser adicionado a continuación el complemento (C'), éste será fijado y activado por el complejo formado, con la consiguiente lisis parcial de la membrana celular. Esta lisis parcial se visualiza con la ayuda de colorantes vitales (azul tripan), los cuales penetran en las células lisadas pero son excluidos por las células vivas.

Las reacciones son evaluadas en un microscopio óptico en base al siguiente criterio:

Células Muertas (%)	Calificación	Interpretación
0 - 19	1	Negativo
20 - 29	2	Negativo
30 - 49	4	Dudoso
50 - 79	6	Positivo
80 - 100	8	Positivo

### 3. Análisis estadístico.

Después de determinar las frecuencias fenotípicas y genotípicas para cada alelo de la población de enfermos y controles, se estableció la diferencia y se comprobó la significancia estadística mediante la prueba Chi cuadrada, con la corrección de Yates. Con el objeto de evitar la sobreestimación de la significancia en la diferencia de los datos, la P obtenida fue a su vez multiplicada por el número de alelos estudiados en cada locus (P corregida) (23).

Posteriormente se estudiaron todas las combinaciones posibles para obtener los haplotipos inferidos. La existencia de un desequilibrio de enlace se analizó mediante el cálculo del Delta, que representa una medida de la diferencia entre la frecuencia con la cual un par dado de alelos deben ocurrir juntos en un solo haplotipo (frecuencia esperada) y la combinación real de estos dos alelos en la población en estudio, tomando en cuenta que sus frecuencias individuales son conocidas (frecuencia observada). El valor de Delta para una combinación de dos fenotipos expresa el grado de diferencia entre la frecuencia esperada y la observada. Para establecer la significancia estadística de las Deltas se empleó también la prueba Chi cuadrada (24-26).

## RESULTADOS

### Análisis de la frecuencia de alelos por locus.

La comparación de las frecuencias fenotípicas de los locus A, C y DQ no mostró diferencias significativas entre los pacientes y el grupo testigo.

En relación al locus B, (Tabla II), se observó que los individuos con AAE presentaron un incremento del antígeno HLA-B15, el cual no alcanzó significancia estadística cuando la P fue corregida. El aumento del fenotipo B15 fue a expensas de la - disminución de varios alelos, incluyendo al B60, cuyo desequilibrio negativo mostró tendencia a ser significativo.

No se encontraron diferencias en los marcadores B8 y B40 - los cuales han sido asociados a este padecimiento en poblaciones caucásicas (27,28).

En la tabla III, se muestran los resultados obtenidos en relación al locus DR. Puede observarse que los pacientes con AAE mostraron un aumento estadísticamente significativo del fenotipo HLA-DR7 (P 0.0005; P corregida 0.004), con un riesgo relativo de 4.2.

### Haplotipos inferidos.

Después de obtener los haplotipos a través de una tabla de contingencia de  $n \times n$  entre los alelos de los loci A y B, y B y DR (frecuencias observadas), éstos se compararon con los pro



ductos de las frecuencias genotípicas individuales que corresponden a los valores esperados (frecuencia esperada). Cinco haplotipos inferidos de esta manera mostraron una Delta estadísticamente significativa (tabla IV). Estos fueron el A1-B8; A25-B14; A28-B21; B35-DR4 y B5-DR5.

De manera interesante, en ninguno de estos haplotipos se encontró el DR7, que en forma individual estaba fuertemente desequilibrado en la población enferma, ni el B15 que mostró tendencia a desequilibrarse en dicho grupo.

TABLA I  
ENFERMEDADES ASOCIADAS AL HLA

ENFERMEDAD	HLA	FRECUENCIA		R.R.
		E	C	
Enfermedad de Hodgkin	A1	40	32	1.4
Hemocromatosis idiopática	A3	76	28	8.2
Enfermedad de Behcet	B5	41	10	6.3
Hiperplasia adrenal congénita	B47	9	0.6	15.4
Espondilitis anquilosante	B27	90	9	87.4
Enfermedad de Reiter	B27	79	9	37.0
Uveitis anterior aguda	B27	52	9	10.4
Tiroiditis subaguda	B35	70	15	13.7
Psoriasis vulgar	C6	87	33	13.3
Dermatitis herpetiforme	DR3	85	26	15.4
Enfermedad celiaca	DR3	79	26	10.8
Síndrome de Sjögren	DR3	78	26	9.7
Enfermedad de Addison	DR3	69	26	6.3
Enfermedad de Graves	DR3	57	26	3.7
Diabetes mellitus tipo I	DR3	56	26	3.3
Lupus eritematoso sistémico	DR3	70	28	5.8
Esclerosis múltiple	DR2	59	26	4.1
Síndrome de Goodpasture	DR2	88	32	15.9
Artritis reumatoide	DR4	50	19	4.2
Tiroiditis de Hashimoto	DR5	19	7	3.2

E= Enfermos      C= Controles Sanos      R.R. Riesgo Relativo

A. Svejgaard, N. Morling, P. Platz, L.P. Ryder y M. Thomsen.  
HLA and Disease  
Immunology 80 Acad. Press 1980.

TABLA II

<u>FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA LOCUS B, EN LOS PACIENTES</u>					
<u>CON AAE Y POBLACION SANA</u>					
ALELO	FRECUENCIA FENOTIPICA CONTROLES (N=200)	FRECUENCIA FENOTIPICA PACIENTES (N=44)	Chi <sup>2</sup>	P	P CORREGIDA
B5	0.22	0.11	1.62	0.203	3.857
B7	0.13	0.11	0.03	0.58	11.02
B8	0.07	0.13	0.93	0.33	6.27
B13	0.07	0.04	0.87	0.35	6.65
B14	0.08	0.09	0.02	0.55	10.45
B15*	0.10	0.27	5.77	0.01*	0.19
B16	0.02	0.09	2.27	0.13	2.47
B17	0.05	0.09	0.31	0.57	10.83
B18	0.03	0.00	0.28	0.59	11.21
B21	0.12	0.04	1.17	0.28	5.38
B22	0.03	0.00	0.28	0.59	11.21
B27	0.07	0.04	0.035	0.85	16.15
B35	0.36	0.25	1.21	0.27	5.13
B37	0.02	0.00	0.03	0.86	16.34
B40	0.18	0.09	1.24	0.26	4.94
B42	0.00	0.00	0.00	1.00	19.0
B44	0.07	0.04	0.03	0.85	16.15
B45	0.04	0.02	0.0007	0.98	18.62
B60*	0.07	0.02	6.52	0.006*	0.14

\* Indica los alelos que mostraron tendencia al desequilibrio.

TABLA III

<u>FRECUENCIA DE ANTIGENOS HLA LOCUS DR, EN LOS PACIENTES</u>					
<u>CON AAE Y POBLACION SANA</u>					
<u>ALELO</u>	<u>FRECUENCIA FENOTIPICA (N=200)</u>	<u>FRECUENCIA FENOTIPICA (N=44)</u>	<u>Chi<sup>2</sup></u>	<u>P</u>	<u>P CORREGIDA</u>
DR1	0.22	0.11	1.07	0.30	2.4
DR2	0.10	0.18	1.19	0.27	2.16
DR3	0.17	0.18	0.0004	0.95	7.6
DR4	0.56	0.38	3.02	0.08	0.64
DR5	0.17	0.07	1.86	0.172	1.376
DR6	0.05	0.02	0.196	0.65	5.2
DR7*	0.15	0.43	11.93	0.0005*	0.004*
DR8	0.06	0.00	2.28	0.13	1.04

\* Indica al fenotipo con desequilibrio estadísticamente significativo.

TABLA IV

<u>HAPLOTIPOS INFERIDOS DESEQUILIBRADOS EN LOS SUJETOS</u>					
<u>CON A.A.E.</u>					
<u>HAPLOTIPO</u>	<u>FRECUENCIA OBSERVADA</u>	<u>FRECUENCIA ESPERADA</u>	<u>DELTA</u>	<u>Chi<sup>2</sup></u>	<u>P</u>
A1-B8	0.03469	0.00413	0.03055	6.33	.05
A25-B14	0.0229	0.00216	0.02082	4.29	.05
A28-B21	0.0229	0.00134	0.02164	8.42	.01
B35-DR4	0.0954	0.02902	0.06644	4.40	.05
B5-DR5	0.0229	0.00203	0.0209	4.77	.05



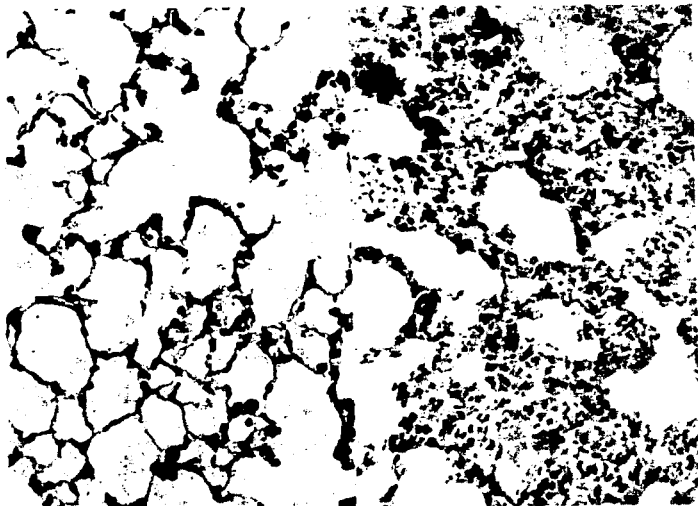
**Figura 1:** Distribución de los genes del Sistema HLA ubicados en el brazo corto del cromosoma 6. Se pueden observar los locus A, B, C y los de la región D (DR, DQ y DP), así como los componentes del complemento (factor B de la properdina, C2 y los dos genes - de C4).



A

B

Figura 2: Comparación entre la radiografía de un individuo normal (A) y la de un paciente de A.A.E. (B).



A

B

Figura 3: A.- Fotomicrografia de parénquima de pulmón normal.

B.- Fotomicrografia de parénquima de pulmón de paciente con A.A.E.



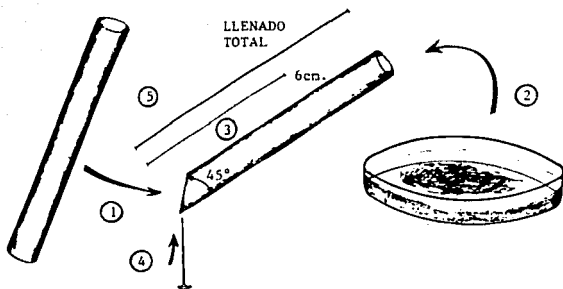


Figura 4

## PREPARACION DE LA COLUMNA DE NYLON.

1. SELLAR CON CALOR UN EXTREMO DE LA COLUMNA, CON ANGULO DE 45°C.
2. SUMERGIR 100 MG DE FIBRA DE NYLON EN SOLUCION DE HANKS.
3. INTRODUCIR EL NYLON EN LA COLUMNA, DISTRIBUYENDOLO UNIFORMEMENTE A LO LARGO DE 6 CM.
4. PRACTICAR UN ORIFICIO EN EL EXTREMO SELLADO DE LA COLUMNA, DE MANERA QUE PERMITA EL FLUJO DE LIQUIDOS.
5. LLENAR LA COLUMNA CON MEDIO DE CULTIVO (QUE CONTENGA 5% DE SFT), SELLAR CON MEDIO DE CULTIVO E INCUBAR A 37°C DURANTE 30 MINUTOS COLOCANDOLA HORIZONTALMENTE.

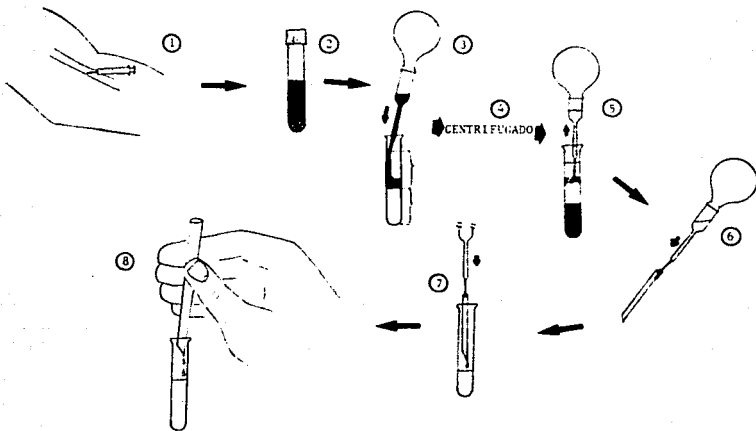
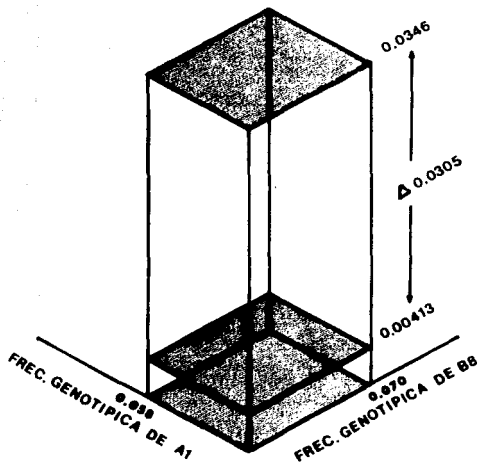


Figura 5

1. OBTENCION DE SANGRE PERIFERICA POR PUNCION VENOSA.
2. SE DESFIBRINA LA SANGRE UTILIZANDO PERLAS DE VIDRIO.
3. COLOCAR LA SANGRE CUIDADOSAMENTE EN UN TUBO QUE CONTenga FICOLL-HYPAQUE.
4. SE CENTRIFUGA A 2000 rpm POR 30 MINUTOS.
5. SE COLECTAN LOS LINFOCITOS DE LA INTERFASE DE SUERO Y SOLUCION SEPARADORA CON AYUDA DE PIPETA PASTEUR.
6. DEPOSITAR LA SUSPENSION DE CLEULAS EN LA COLUMNA DE NYLON PREVIAMENTE PREPARADA.
7. LAVAR LA COLUMNA CON MEDIO DE McCOY PARA DEJAR EN EL TUBO LINFOCITOS T QUE SE USARAN PARA DETERMINAR LAS ESPECIFICIDADES A Y B.
8. SE LLENA LA COLUMNA DE NUEVO CON MEDIO McCOY FRIO (4°C) Y SE LIBERAN MECANICAMENTE (POR COMPRESION) LOS LINFOCITOS B QUE SERAN EMPLEADOS PARA INVESTIGAR ANTIGENOS DR.



**Figura 6:** Diferencia (Delta) entre la frecuencia - observada (.0346) y la esperada (0.00413) para el haplotipo A1-B8 en el grupo de pa cientes con AAE ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSION

Un rasgo característico de la AAE, es que un porcentaje relativamente bajo de sujetos expuestos a un antígeno determinado desarrolla la enfermedad y este fenómeno no parece relacionarse con la duración e intensidad de la exposición a dicho antígeno (4,12,28,29).

Estas evidencias han llevado a la consideración de que factores del huésped pueden ser determinantes en el desencadenamiento del daño pulmonar.

Como en esta enfermedad existen varios desórdenes inmunológicos y dada la estrecha relación entre el Sistema HLA y el control de la respuesta inmune, diversos autores han explorado la posibilidad de que exista una predisposición genética ligada a este sistema. Sin embargo, los estudios han sido escasos y se han limitado a poblaciones caucásicas (15, 27, 28, 30-33). Por otro lado, en los trabajos iniciales sólo se analizaron los locus A, B y C excluyéndose aquellos de la región D (DR, DQ y DP) que ahora sabemos son los que están directamente involucrados en la regulación de la respuesta inmune. Los reportes más recientes que incluyen al locus DR, han sugerido una posible asociación con el DR3 (15,33).

En este contexto, los resultados de nuestro estudio mostraron un claro incremento del marcador HLA-DR7 en los pacientes con AAE. Esta asociación con el DR7 en la población mestiza Mexicana y con el DR3 en otros grupos raciales, puede in-

interpretarse como una evidencia de que existe una susceptibilidad genética relacionada con la región D, pero el fenotipo en particular dependerá de las características étnicas de la población estudiada.

En apoyo a la hipótesis de que la predisposición genética en la AAE se asocia con esta región del cromosoma 6, está la observación reciente de que la subregión I-B, de la región I (equivalente a la región D en humanos), predispone al desarrollo de la AAE experimental en ratones (14).

El hecho de no haber encontrado relación con el locus DQ, puede deberse al pequeño número de alelos (1,2 y 3) y/o al tamaño de la muestra explorada (21 pacientes y 20 controles respectivamente). Sin embargo, es posible que este locus no juegue ningún papel en el desarrollo de la enfermedad como ocurre por ejemplo con la subregión I-A en el modelo en ratones (14).

Por otro lado, es importante destacar la observación de la tendencia a asociarse con el HLA-B15. Aunque después de la corrección a través de la multiplicación por el número de alelos determinados en el locus B, no hubo significancia estadística para este fenotipo, el hallazgo es de interés, dado que este marcador ha sido relacionado con diversas enfermedades que tienen un fondo inmunopatológico tanto en poblaciones caucásicas (34) como locales (35).

No obstante, llama la atención que a pesar de la fuerte

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

asociación con el HLA-DR7 y la débil asociación con el HLA-B15, estos fenotipos no coincidieron en los mismos individuos, como fue demostrado en el estudio de los haplotipos inferidos. En este sentido, 5 combinaciones se presentaron en los pacientes con una frecuencia mucho mayor que la esperada (delta significativa). De éstos, el A1-B8 ha sido asociado con padecimientos autoinmunes en poblaciones caucásicas (36, 37). Los otros cuatro, constituyeron un resultado inesperado y por el momento no tenemos una explicación clara para este hallazgo; es conveniente destacar que este tipo de análisis no se ha realizado previamente en México, dado que los estudios en poblaciones abiertas se han efectuado fundamentalmente con marcadores individuales (38-40).

Sin embargo, el B35-DR4 podría ser para la población mestiza mexicana, lo que es el A1-B8-DR3 para las poblaciones caucásicas; ésto es, alelos relativamente frecuentes en la población normal, pero notablemente desequilibrados en algunos grupos con padecimientos inmunopatológicos (41). No obstante, este hallazgo deberá corroborarse con estudios familiares, los cuales se están llevando a cabo actualmente en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

En conjunto, estos resultados indican que existe una predisposición genética asociada por lo menos en un grupo de pacientes al Sistema HLA, pero que esta parece ser multigénica. Por un lado se asocia con algunas combinaciones entre los loci A y B o B y DR y por otro lado con el DR7.

Esto podría explicar, al menos parcialmente, la heterogeneidad observada a varios niveles en esta enfermedad. Por ejemplo, el curso clínico que puede ser agudo, subagudo o crónico, la presencia o ausencia de fenómenos autoinmunes - asociados a la hiperreactividad al antígeno, los diferentes títulos y tipos de anticuerpos precipitantes y complejos inmunes, etc.

En el caso de nuestros pacientes, todos ellos fueron seleccionados en la forma subaguda del padecimiento, de tal manera, que en este sentido el grupo era relativamente homogéneo. Sin embargo, hubo algunas diferencias interesantes entre ellos, en relación a la presencia de Factor reumatoide y los títulos de complejos inmunes circulantes. Aunque 44 pacientes no constituyen aún una muestra suficientemente significativa para hacer correlaciones con todas las combinaciones de alelos desequilibrados y la presencia o ausencia de DR7, cabe destacar que los sujetos con A1-B8, presentaron los títulos más elevados de complejos inmunes y factor reumatoide.

Podríamos concluir, que un sujeto "predisuesto", desarrollará AAE y un sujeto "resistente" no lo hará (fenómeno - de todo o nada), pero el individuo susceptible puede presentar la enfermedad en diferentes estilos, dependiendo del o de los genes involucrados en esta susceptibilidad.

**RESUMEN:**

Para analizar si existe una susceptibilidad genética en pacientes con Alveolitis Alérgica Extrínseca (AAE) se estudiaron los fenotipos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (HLA), locus A, B, C y DR en 44 pacientes con AAE inducida por inhalación de antígeno aviario. Los resultados se compararon con aquellos obtenidos en 200 sujetos normales de condiciones étnicas similares. Se estudiaron además todas las combinaciones posibles para obtener los haplotipos inferidos y analizar la diferencia entre la frecuencia observada y la esperada en la población enferma.

Los resultados muestran un aumento estadísticamente significativo del antígeno HLA-DR7 (P corregida 0.004) en los pacientes con AAE y una diferencia también significativa en los deltas de los haplotipos A1-B8, A25-B14, A28-B21, B35-DR4 y B5-DR5. Por otro lado, se analizaron los fenotipos del locus DQ en 21 pacientes y 20 controles, sin que se observaran diferencias aparentes.

Estos resultados sugieren que la susceptibilidad genética multifactorial asociada al Complejo Principal de Histocompatibilidad juega un papel importante en el desarrollo de este padecimiento.



**CONCLUSION:**

Existe una predisposición genética asociada al sistema HLA en algunos pacientes con Alveolitis Alérgica Extrínseca, pero ésta parece ser multigénica. Por un lado se asocia con algunas combinaciones entre los loci A y B o B y DR y por otro lado con el DR-7.

BIBLIOGRAFIA

1. M. Selman, T. Fortoul, R. Barrios, L. Terán:  
Alveolitis alérgica extrínseca  
Medicine, segunda edición, pág: 899-905, Marzo 1986.
2. F. Hargreave:  
Extrinsic Allergic Alveolitis  
Can Med Ass J 108:1150-1154, 1973.
3. W. Keith, C. Morgan:  
Extrinsic Allergic Alveolitis  
Ann Allergy 33:155-160, 1974.
4. H. Reynolds:  
Hypersensitivity Pneumonitis  
Clinics in Chest Medicine 3:503-519, 1982.
5. M. Morales, E. García, S. Stanislawsky y cols.:  
Enfermedad pulmonar de los aficionados a las palomas  
Neumol Cir Tórax (Méx) 35:3-8, 1974.
6. A. González, E. García, L. Maldonado y cols.:  
Bagazosis. Estudio preliminar en México.  
Rev Méd IMSS 14:274-285, 1975.
7. M. Selman, R. Chapela, L. Terán y cols.:  
Alveolitis alérgica extrínseca. Retrospectiva y Perspectiva.  
Arch Bronconeumol (España) 21:118-123, 1985.
8. J. Girard, B. Wurstemberger, B. Fernández:  
Analysis of cell-mediated hypersensitivity, immune complexes  
and monocyte-released factors in Allergic Alveolitis and  
asymptomatic exposed subjects.  
Clin Allergy 8:445-450, 1978.

9. J. Fink, J. Barboriak, A. Sosman et al.:  
Antibodies against pigeon serum proteins in Pigeon breeders  
J Lab Clin Med 71:20-24, 1968.
10. J. Fink, T. Tebo, J. Barboriak:  
Characterization of human precipitating antibody to inhaled  
antigens.  
J Immunol 103:244-251, 1961.
11. T. Ghose, P. Landrigan, R. Killen et al.:  
Immunopathological studies in patients with farmer's lung  
J Allergy Clin Immunol 48:224-229, 1971.
12. J. Fink:  
Hypersensitivity Pneumonitis  
J Allergy Clin Immunol 74:1-9, 1984.
13. N. Calvanico, J. Fink, R. Keller:  
Hypersensitivity Pneumonitis  
En: Immunology of the lung and upper respiratory tract.  
J. Bienenstock (ed); McGraw-Hill Book Company; 1984, 365.
14. B. Wilson, J. Sternick, Y. Yoshizawa et al.:  
Genetic control of experimental murine Hypersensitivity  
Pneumonitis  
Chest 83(5): 8S-9S, 1983.
15. G. Rodey, J. Fink, S. Koethe et al.:  
A study of HLA-A,B,C and DR specificities in Pigeon  
breeder's disease.  
Am Rev Resp Dis 119:755-759, 1979.

16. O. Kawanami, F. Basset, R. Barrios et al.:  
Hypersensitivity Pneumonitis in man. Light and electron-  
microscopic studies of 18 lung biopsies.  
Am J Pathol 110:275-289, 1983.
17. P. Terasaki, D. Bernoco, S. Park et al.:  
Microdroplet testing for HLA-A,B,C and D antigens.  
Am J Clin Pathol 69:103-109, 1978.
18. E. Thorsby, A. Bratlie:  
A rapid method for the production of pure lymphocyte  
suspensions.  
En: Histocompatibility Testing. PI Terasaki (ed).  
Munskaaard Copenhagen 1970, 655.
19. J. Danilous, G. Ayoub, P. Terasaki:  
B lymphocyte isolation by thrombin-nylon wool.  
En: Histocompatibility Testing.  
PI Terasaki(ed). Los Angeles California 1980, 287.
20. J.A. Danilous, G. Ayoub, P.I. Terasaki:  
B Lymphocyte isolation by thrombin nylon wool.  
Terasaki, P.I. (ed). Histocompatibility Testing.  
Cal., U.S.A. 287-288 (1980).
21. F. Indiveri, M.A. Pellegrino, G.A. Molinaro, V. Quaranta,  
S. Ferrone:  
Rosetting of human T lymphocytes with goat red blood  
cells: effects of treatment with AET and comparison with  
AET treated sheep red blood cells.  
Journal of Immunological Methods. 30, 317-328 (1979).
22. R.P. Lowry, A.E. Person, J.E. Goguen, C.B. Carpenter,  
M.R. Garodoy:  
T and B cells separation by nylon wool columns.  
Transp. Proc. 10, 4(1978).

23. A. Svejgaard:  
HLA and Disease.  
En: Manual of Clinical Immunology. Am Soc Microbiol  
E.U.A. N. Rose and H. Friedman (eds). 1976, 841.
24. L. Lamm, L. Degos:  
Introduction to HLA genetics.  
En: Histocompatibility Techniques. H. Dick and F.  
Kissmeyer-Nielsen (eds). Elsevier/North-Holland  
Biomedical Press 1979, 131.
25. M. Baur, M. Neugebauer, H. Deppe et al.:  
Population analysis on the basis of deduced haplotypes  
from random families.  
En: Histocompatibility Testing. E. Albert (ed). Springer-  
Verlag Berlin Heidelberg, 1984, 333.
26. B. Schwartz:  
The Human Major Histocompatibility HLA Complex.  
En: Basic and Clinic Immunology. D.P. Stites(ed).  
Lange Medical Publication, Los Altos California 1984, 55.
27. C. Rittner, J. Sennenkamp, F. Vogel:  
HLA-B8 in Pigeon fancier's lung  
Lancet ii 1303, 1975.
28. D. Allen, A. Basten, G. Williams et al:  
Familial Hypersensitivity Pneumonitis.  
Am J Med 59:505-514, 1975.
29. F. Chemlik, G. do Pico, C. Reed et al.:  
Farmer's lung  
J Allergy Clin Immunol 54:180-185, 1974.

30. D. Flaherty, S. Braun, J. Marx et al.:  
Serologically detectable HLA-A,B, and C loci antigens  
in Farmer's lung disease.  
Am Rev Resp Dis 122:437-442, 1980.
31. M. Muers, J. Faux, A. Ting et al.:  
HLA-A,B,C and DR antigens in extrinsic allergic  
Alveolitis (Budgerigar fancier's lung disease)  
Clin Allergy 12:47-53, 1982.
32. J. Sennenkamp, C. Rittner, F. Vogel et al.:  
Distribution of the HLA antigens in patients with  
Pigeon breeder's lung.  
Schweiz Med Wochenschr 108:315-317, 1979.
33. C. Rittner, J. Sennenkamp, E. Mollenhauer et al.:  
Tissue Antig 21:374-379, 1983.
34. E. Varpela, A. Tiilikainen, M. Varpela et al.:  
High prevalences of HLA-B15 and HLA-Dw6 in patients  
with Cryptogenic Fibrosing Alveolitis  
Tissue Antig 14:68-71, 1979.
35. G. Flores, J. Cueva, L. Terán:  
HLA and Solar Dermatitis  
XXIV International Congress of Allergy and Immunology.  
Tel Aviv, Israel. Mayo 1979.
36. Z. Awdeh, D. Raum, E. Yunis et al.:  
Extended HLA-Complement allele haplotypes. Evidence  
for T/t like complex in man.  
Proc Natl Acad Sci USA 80:259-265, 1983.
37. D. Raum, Z. Awdeh, E. Yunis et al.:  
Major histocompatibility markers in disease  
Clin Immunol Allergy 1:305-311, 1981.

- 37
38. C. Gorodezky, L. Terán, A. Escobar:  
HLA frecuencies in a Mexican Mestizo population.  
Tissue Antig 14:347-352, 1979.
  39. C. Gorodezky, A. Escobar, M. Salazar-Mallén:  
Distribution of some of the HLA system lymphocyte  
antigens in Mexicans. 1. Mestizo and Mexican Indian  
population.  
Vox Sang 23:439-444, 1972.
  40. L. Terán, M. Selman, M. Mendoza et al.:  
Increase of unidentified HLA antigens in pulmonary  
tuberculosis.  
Ann Clin Res 17:40-42, 1985.
  41. Y. Matsui, S. Alosco, Z. Awdeh et al.:  
Linkage disequilibrium of HLA-SB1 with the HLA-A1,B8,  
DR3, SC01 and HLA-SB4 with the HLA-A26, Bw38, Dw10,  
DR4, SC21 extended haplotypes.  
Immunogenetics 19:1-9, 1984.
  42. Hanks, J.H. (1975)  
Hanks' Balanced Salt Solution and pH Control.  
Tissue Culture Association Manual, Vol. 1, No. 1. pp. 3-4.
  43. McCoy, J.A., M. Maxwell, and P.S. Kruse, Jr. (1959).  
Amino acid requirements of the Novikoff hepatoma in  
vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100:115-188.