

TRABAJO ORIGINAL

Análisis de la asociación de HLA DRB1-DQB1 y autoanticuerpos en familias con Síndrome Poliendocrino Autoinmune (APS)

An analysis of the relationship between HLA DRB1-DQB1 and autoantibodies, in families with autoimmune polyendocrine syndrome (APS)

*Botta, Silvia**; *Roveto, Silvana**; *Galarza, P.□*; *Perusco, A.□*; y *Rimoldi, D.**

□ Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética * Departamento de Endocrinología Clínica. Instituto de Investigaciones Médicas. A. Lanari – UBA

Resumen

El APS es la asociación de enfermedades endocrinas autoinmunes, con otros desórdenes autoinmunes no endocrinos, denominados componentes mayores y menores. Este síndrome se clasificó en 4 tipos. Las alteraciones de la respuesta inmune provocan fallas regulatorias de la misma; y polimorfismos de HLA, entre otros, sumado a factores adquiridos o permanentes, representan gatillos disparadores de la autoinmunidad.

Nuestro objetivo fue buscar la asociación de HLA-DRB1*-DQB1* en individuos pertenecientes a dos familias, con diagnóstico en uno o más de ellos de APS, o con enfermedades autoinmunes aisladas. Determinar los anticuerpos séricos: a21-OH, aGAD y aTPO y observar la asociación con el haplotipo HLA. Estudiamos padres e hijos de dos familias, dos integrantes padecían APS tipo 2 y 3; y otros con enfermedades autoinmunes. Buscamos HLA-DRB1*-DQB1* y cuantificamos a21-OH, aTPO y aGAD.

Los pacientes con APS 2 y 3 presentaron el HLA-DRB1*0301-DQB1*0201. De los individuos estudiados, 5/9 tenían este haplotipo HLA y al menos un autoanticuerpo positivo. Hallamos el factor genético en 2/3 de los integrantes con enfermedades autoinmunes correspondientes a componentes mayores. La relación observada, entre APS y HLA-DRB1*0301-DQB1*0201, aumenta la posibilidad de identificar personas en riesgo de contraer afecciones autoinmunes en grupos familiares, en los cuales algún integrante padece APS.

Laboratorio: Av. Combatientes de Malvinas 3150 II Cuerpo 1er Piso. Ciudad Autónoma Bs. As. 1427.

Correspondencia a te: 4514-8701 int. 163. y/o e-mail: drimoldi@lanari.fmed.uba.ar / sbotta@intramed.net

Palabras clave: HLA DRB1-DQB1, autoanticuerpos, APS.

Keywords: HLA DRB1-DQB1, auto antibodies, APS.

Abstract

The APS is the association of autoimmune endocrine diseases, with other non-endocrine autoimmune disorders, named mayor and minor components. This syndrome was classified in 4 types. The alterations of the immune response cause regulatory faults; and HLA polymorphisms, among others; taken in conjunction with acquired or permanent factors, these represent triggers of autoimmunity.

Our objective was to find out the association of HLA-DRB1*-DQB1* in individuals belonging to two families, with diagnosis in at least one of them APS, or with isolated autoimmune diseases. To determine serum antibodies: a21-OH, aGAD and aTPO and to observe the association with HLA haplotype. We have studied parents and offspring of two families, two members who suffered APS type 2 and 3, and others with autoimmune diseases. We have looked for HLA-DRB1*-DQB1* and quantified a21-OH, aTPO and aGAD.

Patients with APS 2 and 3 showed HLA-DRB1*0301-DQB1*0201. Among the population we have studied, 5/9 had this HLA haplotype and at least one positive auto antibody. We have found the genetic factor in 2/3 of the members with autoimmune diseases corresponding to greater components.

The observed relation between APS and HLA-DRB1*0301-DQB1*0201, increases the possibility of identifying people at risk of catching autoimmune affections in familiar groups in which at least one member suffers APS.

Introducción

El síndrome poliendocrino autoinmune (APS) es la asociación de enfermedades endocrinas autoinmunes, con otros desórdenes autoinmunes no endocrinos.

Las enfermedades autoinmunes consideradas como componentes mayores del APS son: hipoparatiroidismo, adrenalitis, enfermedad tiroidea, diabetes y candidiasis crónica. Los componentes menores pueden ser endocrinos: ooforitis autoinmune, hipofisitis o no endocrinos: vitiligo, alopecia universal, hepatitis crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, anemia perniciosa, enfermedad celíaca, síndrome de Sjögren y otros.

Estos últimos pueden preceder, aparecer simultáneamente o hacerlo muchos años después (hasta 10) de los componentes mayores

Las diferentes formas de evolución, las determinaciones de anticuerpos y la clínica resultan relevantes para la clasificación del APS; donde cada uno de los componentes se pueden observar temporalmente en diversas secuencias.

En el año 1980, Neufeld y Blizzard, organizaron y clasificaron este síndrome en cuatro tipos ⁽¹⁾. APS tipo1 es la asociación de candidiasis crónica, hipoparatiroidismo y adrenalitis autoinmune como componentes mayores.

El APS tipo 2 se caracteriza por la presencia de enfermedades autoinmunes: adrenalitis (AA), Hashimoto o Graves Basedow y/o diabetes insulino dependiente (DBT), como componentes mayores del síndrome. El APS tipo 3 asocia enfermedad tiroidea autoinmune y otras autoinmunes como diabetes, excluyendo adrenalitis e hipoparatiroidismo. El tipo 4 con adrenalitis sumado a una o más afecciones autoinmunes que excluyan a los componentes mayores del tipo 1 y 2. La presencia de anticuerpos dirigidos contra: peroxidasa tiroidea (aTPO), receptor de TSH (Trab), 21-hidroxilasa adrenal (a21-OH) y ácido glutámico decarboxilasa de la célula β pancreática (aGAD); reflejan el compromiso de órgano blanco en estas entidades ⁽²⁻⁴⁾

Desde el punto de vista clínico, el APS puede ser completo o incompleto; siendo este último subclínico o latente. El latente presenta sólo el autoanticuerpo, sin alteraciones en las pruebas funcionales endocrinas.

El APS es una enfermedad compleja y multifactorial. Entre los factores se encuentran los adquiridos, que pueden ser transitorios (tabaquismo) o permanentes (autoanticuerpos). Existen también, factores genéticos que en forma asociada contribuyen en la autoinmunidad, entre ellos, polimorfismos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), el receptor de activación de la segunda señal inmunológica Cytotoxic T Lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4 + 49G) y del transductor de

señal Intracelular Tyrosine phosphatase (PTPN22 620 W), entre otros⁽⁵⁻⁷⁾

La asociación con genes del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA), podría contribuir al diagnóstico y/o pronóstico del APS⁽⁸⁻¹³⁾. Esta asociación permite la identificación de individuos, considerados como de alto riesgo a contraer algún tipo de enfermedad autoinmune dentro de un grupo familiar⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

Las enfermedades autoinmunes resultan en parte, de la pérdida de tolerancia inmunológica, a partir de un determinante genético dado, por mutaciones específicas o por alteraciones relacionadas al HLA, en el que distintos fenotipos del mismo estarían involucrados.

Sumado a las alteraciones genéticas, agentes externos (infecciones virales, drogas, productos alimenticios y otros) pueden desencadenar respuestas autoinmunes. Entre las hipótesis propuestas, la teoría más aceptada para explicar el APS es un defecto en la actividad de los linfocitos T. Las citoquinas liberadas por T helpers activos, inducen la activación de linfocitos citotóxicos (Th1) y B (Th2). Se ha sugerido que el desarrollo de autoinmunidad múltiple, estaría relacionado con uno o más epitopes compartidos entre un agente externo y un antígeno común presente en distintos tejidos endocrinos⁽¹⁷⁾.

Además, asociado o en forma separada, pueden existir alteraciones en la activación de la respuesta inmune, ya sea por, deficiencias en la inhibición de la misma (CTLA-4); hiper-respuesta (CD28, CD154, ICOS, etc.) o por fallas regulatorias, a través de los transductores de señales (PTPN22) y/o en menor medida por deficiencia en las moléculas de adhesión (ICAM, VCAM, etc).

El factor de riesgo genético más conocido es el CMH, y los polimorfismos del HLA- DRB1*, DQA1* y DQB1*, están asociados con enfermedades autoinmunes y en particular al APS, de acuerdo al grupo étnico que se estudie. La presencia de dichos marcadores aumentaría el riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes que componen el APS⁽¹⁸⁻²²⁾.

Objetivos

Buscar la posible asociación de los diferentes marcadores moleculares (HLA- DRB1*-DQB1*) en individuos pertenecientes a dos grupos familiares, con diagnóstico en uno o más de ellos de APS, o con enfermedades autoinmunes aisladas que correspondan a componentes mayores de dicho síndrome. Determinar los anticuerpos séricos: a21-OH, aGAD y aTPO y hallar asociación con los marcadores moleculares mencionados.

Sujetos

Familias: O y L compuestas por dos generaciones, padre y madre con (tres hijos: 2 mujeres y un varón) y (dos hijos: 1 mujer y un varón) respectivamente. Ambas familias presentan al menos un integrante con APS y enfermedades autoinmunes endocrinas asociadas.

Métodos

Se realizó una extracción de 10 ml de sangre por punción venosa en pliegue del codo con 8 ho-

Tabla I

Familia O	Edad	a 21 OH	a GAD	aTPO	Clínica	HLA-DRB1*	HLA-DQB1*
Madre	54	0	34 &	< 10	bocio	0701-1101	0301-0312
Padre °	57	13	1.3 &	>1000	AA Hashimoto	0301-1501	0201-0601
Hija	24	0.5	0.3	> 1000	Graves #	0301-1101	0201-0301
Hijo	30	0.5	0.6	> 1000	Graves ##	0301-1101	0201-0301
Hija	27	0.5	0.3	< 10	sana	1501-1101	0601-0301

ras de ayuno previo. Las muestras séricas fueron congeladas hasta su procesamiento y se recolectó también, un tubo con EDTA como anticoagulante. Este fue destinado para extracción de ADN, a través de leucocitos que se ubican en la interfase (plasma-rojos) después de una centrifugación de 10 minutos a 2.500 rpm.

Extracción de ADN: método salino con proteinasa, para genotipificación de los polimorfismos genéticos del HLA clase II-DRB1* y DQB1* por la técnica de PCR-SSOP reversa (Innogenetics-Innolipa), de mediana resolución.

El procedimiento de tipificación es similar para los dos genes y se divide en dos grandes pasos:

- 1- Amplificación
- 2- Hibridización colorimétrica

1- Se amplifica por separado el segundo exón del locus DRB1*, el segundo y tercer exón del DQB1*, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores biotinilados diseñados para abarcar la zona polimórfica. Se utiliza además, DNTP, Buffer, Mg²⁺ y taq polimerasa (2U/ul) que conjuntamente con el DNA extraído, son necesarios para la reacción, obteniendo un volumen final de trabajo de 25 ul.

Se coloca un tubo por paciente y por gen en el termociclador (PTC-100 MJ Research) en un programa de ciclado que consta de los siguientes pasos:

- | | | |
|----------------------|------|--------|
| a. Desnaturalización | 95°C | 5 min. |
| b. Desnaturalización | 95°C | 1 min. |
| c. Pegado o anillado | 58°C | 1 min. |
| d. Extensión | 72°C | 1 min. |
| e. Extensión | 72°C | 1 min. |

Los pasos b al d se repiten 35 ciclos.

Antes de de la hibridización, se extrae 5 ul del volumen amplificado, para comprobar la presencia del producto específico. Se corrobora a través de 1 banda de: 280 pb para el DRB1, 250 pb del exón 3 y 261 pb del exón 2 para el DQB1 de longitud. Esto es corrido en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (10mg/ml). Se visualiza en UV transiluminador .

2- El producto amplificado biotinilado, se desnaturaliza químicamente (separación de hebras) y

se lo hibridiza en tiras de nitrocelulosa que contiene sondas de oligonucleótidos específicos inmovilizados, complementarias a todos los polimorfismos conocidos al momento de la tipificación (37 sondas para DRB1 y 36 sondas para DQB1). Cada tira posee dos bandas de control interno (control de hibridización y conjugación).

Una vez terminado el proceso, la interpretación de resultados para determinar las combinaciones posibles de alelos se realiza a través de tablas (manual) y software, provisto por la empresa que comercializa los equipos (Tecnolab SA).

Para el dosaje de a21-OH y aGAD séricos se utilizaron inmunoensayos isotópicos de R S R Limited, adquiridos a través del distribuidor Diagnos Med y procesados en el Laboratorio de Endocrinología Clínica del Instituto Lanari .

Para cuantificar los anticuerpos a21-OH séricos se utilizó un inmunoensayo no competitivo respetando estrictamente las instrucciones del fabricante. El procedimiento se basa en una incubación de 18 horas a 4 °C, de las muestras séricas, controles y calibradores con la enzima 21 hidroxilasa recombinante humana marcada con 125 Iodo (trazador). Luego separamos el complejo antígeno-anticuerpo formado, mediante precipitación con proteína A incubando a 4° C 1 hora; y adicionando buffer frío centrifugamos a 1700 rpm, 30 minutos a 4° C. Aspiramos el sobrenadante, el precipitado radioactivo fue leído y los datos procesados en un contador gamma automático COBRA II (Packard). Valor de referencia hasta 1 U/ml. Sensibilidad analítica: 0.03 U/ml.

Para cuantificar los anticuerpos aGAD séricos se utilizó un inmunoensayo no competitivo respetando estrictamente las instrucciones del fabricante. El procedimiento se basa en una incubación de 2 horas a temperatura ambiente de las muestras séricas, controles y calibradores con la enzima ácido glutámico decarboxilasa (GAD65) recombinante humana marcada con 125 Iodo (trazador). Luego separamos el complejo antígeno-anticuerpo formado, mediante precipitación con proteína A incubando a temperatura ambiente 1 hora; y adicionando buffer frío centrifugamos a 1700rpm, 30 minutos a 4° C. Aspiramos el sobrenadante el precipitado radioactivo fue leído y los datos procesados en un

contador gamma automático COBRA II (Packard). Valor de referencia hasta 1 U/ml. Sensibilidad analítica: 0.02 U/ml.

Para aTPO se utilizó un inmunoensayo con IMMULITE 1000 del Laboratorio de Endocrinología Clínica, método quimioluminiscente de Diagnostic Products Corporation (actualmente Siemens); siendo nuestros valores de referencia hasta 15 IU/ml.

Consideramos individuos sanos, a los integrantes de las familias sin anticuerpos séricos ni clínica correspondiente a los componentes del síndrome investigado.

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Docencia e Investigación del Instituto Lanari. Todos los sujetos estudiados fueron informados y firmaron el consentimiento.

Resultados

Familia O: padre APS tipo 2 completo; hija e hijo portadores del haplotipo DRB1* 0301-DQB1*0201 con enfermedad de Graves. Madre con aGad positivo, como marcador bioquímico aislado de DBT, que al momento no corresponde a un APS ni posee el haplotipo hallado. Familia L: hija APS tipo 3 completo; comparte el haplotipo estudiado con el padre que presenta autoinmunidad tiroidea. Madre APS tipo 3 incompleto en relación a la DBT. Tabla I y II

Los portadores de los haplotipos investigados presentaron diversas expresiones clínicas al momento de la investigación. Los dos pacientes APS 2 y 3 tienen el HLA DRB1* 0301-DQB1*0201. Los 5 sujetos con dicho haplotipo hallado se relacionan al menos con la presencia de un autoanticuerpo positivo. De los individuos que presentan enfermedades autoinmunes correspondientes a componentes mayores del APS, 2/3 tienen el factor genético asociado.

Discusión

Nuestros pacientes con APS estudiados son portadores del haplotipo HLA DRB1*0301-DQB1*0201. Hallamos una relación del factor genético con dia-

betes, adrenalitis, Graves o Hashimoto, que incrementa el riesgo de adquirir dichas patologías en individuos portadores de estos polimorfismos.

La relación observada, entre APS y HLA, aumenta la posibilidad de identificar personas en riesgo de contraer afecciones autoinmunes en grupos familiares, en los cuales algún integrante padece APS. La detección temprana nos permitiría, además, una intervención precoz reduciendo la morbilidad crónica de estas enfermedades.

Si se manifiesta clínicamente sólo una enfermedad endocrina autoinmune, asociada a la presencia de otros autoanticuerpos, podría representar el comienzo de APS con expresión latente o subclínica de las distintas enfermedades que lo componen.

Agradecimientos

TOKATLIAN SA por la donación de aTPO IMMULITE

Bibliografía

1. **Betterle, C.; Dal Pra, C.; Mantero, F. y col.** Autoimmune adrenal insufficiency and autoimmune polyendocrine syndromes: autoantibodies, autoantigens and their applicability in diagnosis and disease prediction. *Endocrine Reviews*, 23/3/: 327-364, 2002
2. **Botta, S.; Roveto, S. y Rimoldi, D.** Anticuerpos anti 21 hidroxilasa séricos en pacientes con anticuerpos antifracción microsomal. Síndrome Poliendocrino Autoinmune. *Medicina*, 67: 143-6, 2007
3. **Powell, M.; Prentice, L.; Asawa, T. y col.** Glutamic acid decarboxilase autoantibody assay using 125I labelled recombinant GAD65 produced in yeast. *Clin CHIM ACTA*, 30; 256 (2): 175-88, 1996.
4. **Ten, S.; New, M.; Maclaren, N.** Clinical Review 130, Addison's disease. *J of Clin Endocrinol*, 86; 7: 2909-2921, 2001
5. **Kallberg, H.; Padyukov, L.; Plenge, R. y col.** Gene-Gene and Gene-Environment Interactions Involving HLA-DRB1, PTPN22, and

- Smoking in Two Subsets of Rheumatoid Arthritis. *The American Journal of Human Genetics*. Vol 80:867-875, 2007
6. **Criswell, L.; Pfeiffer, K.; Lum, R. y col.** Analysis of Families in the Multiple autoimmune Disease Genetics Consortium Collection: the PTPN22 620W Allele Associates with Multiple Autoimmune Phenotypes. *Am.J.Hum.Genet.* 76:561-571, 2005.
 7. **Ban, Y.; Concepcion, E.; Villanueva, R. y col.** Análisis of Immune Regulatory Genes in Familial and Sporadic Graves Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 98 (9):4562-4568, 2004.
 8. **Cordiano, C.; Betterle, C.A.; Spadaccino, B. y col.** Autoimmune thrombocytopenia (AITP) and thyroid autoimmune disease (TAD): overlapping syndromes?. *Clin. Exp. Immunology*, 113:373-378, 1998.
 9. **Juerg, W.** Mueller-Schoop, Meyer M. Total alopecia, diabetes mellitus and falls. *Lancet*, 348: 1420, 1996.
 10. **Muir, A.** She JX. Advances in the genetic and immunology of autoimmune polyglandular syndrome II/III and their clinical application. *Ann. Med. Intern.*, 150: 301-312, 1999.
 11. **Rabinowe, S. L.; Eisenbarth, G. S.** Polyglandular autoimmunity. *Adv. Intern. Med*, 31: 293-307, 1986.
 12. **Ten, S.; New, M.; Maclaren, N.** Addison's disease 2001. *Clinical Review Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, vol 86 N° 7: 2909, 2001.
 13. **Wiebke, ARLT, Bruno Allocio.** Adrenal insufficiency. *Lancet*, 361: 1881-1893, 2003.
 14. **Barker, J.M.; Eisenbarth, G.S.** Autoantibody sub-specificity in type 1 diabetes: risk for organ specific autoimmunity clusters in distinct groups. *Diabetes care*, 28:850-855, 2005.
 15. **Barker, J.M.;** Type 1 diabetes- Associated autoimmunity: Natural history, genetics associations, and screening. *The J.of Clin.Endocrin. and Metab.* 91,1210-1217, 2006.
 16. **Eisenbarth, G.; Gottlieb, P.** Autoimmune polyendocrine syndromes. *Medical Progress. Review Article. New Engl J of Med*, 350; 20: 2068-2078, 2004.
 17. **Betterle, C.; Lazzarotto, F.; Presotto, F.** Autoimmune polyglandular syndrome type 2: the tip of an iceberg. *Clin & Exp Imm*, 137: 225-233, 2004.
 18. **Wallaschosfski, H.; Lohmann, T.** HLA-DQA1* associated susceptibility for autoimmune polyglandular syndrome type II and III. *Horm.Metab.Res.*, 35, 120-124, 2003.
 19. **Tomer, Y.; Davies, T.** Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: from gene mapping to gene function. *Endocrine Reviews*, 24 (5). 694-717, 2003.
 20. **Kula, D.; Jarzab, B.** Interaction of HLA-DRB1* alleles with CTLA-4 in the predisposition to Graves' disease: the impact of DRB1*. *Thyroid*, May 16, 447-53, 2006.
 21. **Golden, B.; Levin, L.; Tomer, Y.** Genetics Analysis of Families with Autoimmune Diabetes and Thyroiditis: Evidence for common and unique genes. *The J. of Clin.Endocrin.and Metab.*, 90(8): 4904-4911, 2005.
 22. **Hashimoto, K.; Maruyama, H.; Nakamura, T.** Susceptibility alleles and haplotypes of human leukocyte antigen DRB1, DQA1, DQB1 in autoimmune polyglandular syndrome type III in Japanese population. *Horm. Res.*, 64(5): 253-260, 2005.