

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA ASOCIADA AL COMPLEJO PRINCIPAL
DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN LA FIBROSIS PULMONAR
IDIOPÁTICA**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA:**

Q. C. RAMCÉS FALFÁN VALENCIA

**TUTOR:
DR. MOISÉS SELMAN L.**

**COMITÉ TUTORAL:
DRA. ANNIE PARDO S.
DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA.**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Tabla de contenidos

Abreviaturas utilizadas	6
Resumen	8
Complejo principal de histocompatibilidad	
Antecedentes	9
Historia del MHC	9
Organización genética del MHC	10
Figura 1. Organización genética del MHC humano (HLA)	11
Regulación de la transcripción de los genes HLA	12
Moléculas HLA clase I	
Distribución	14
Estructura	15
Figura 2. Molécula HLA de clase I clásica	16
β_2 microglobulina	16
Moléculas de HLA clase II	
Distribución	16
Estructura	17
Figura 3. Molécula HLA de clase II clásica	17
Características del α -hélice	18
Características de la conformación β	18
Figura 4. Características del α -hélice y la conformación β	19
Región de la grieta o hendidura	19
Figura 5. Región de la grieta	20
Moléculas de HLA clase III	22
Moléculas de HLA clase IV	23
Función biológica de las moléculas HLA	25
Polimorfismo	26
Cuadro 1. Distribución de los alelos HLA	29
Nomenclatura del sistema HLA	29
Cuadro 2. Nomenclatura del sistema HLA. El <i>locus</i> DRB1.	30
Desequilibrio de enlace	30
Asociación HLA y enfermedad	32
Cuadro 3. Enfermedades autoinmunes y alelos HLA asociados	36

Fibrosis pulmonar idiopática	
Antecedentes	38
Patogenia	38
Figura 6. Representación esquemática de la patogenia en FPI	39
Susceptibilidad genética y respuesta fibrosante pulmonar	40
Susceptibilidad genética y fibrosis pulmonar idiopática	41
Fibrosis pulmonar idiopática familiar	41
Polimorfismos genéticos y fibrosis pulmonar idiopática esporádica	42
Apoptosis	43
Citometría de flujo	46
Inmunofluorescencia	46
Citometría de flujo y enfermedad pulmonar	47
Consideraciones estadísticas en los estudios de asociación de HLA y enfermedad	49
Definiciones básicas	49
Diseño del estudio	49
Selección de controles	49
Fuerza del estudio y tamaño de la muestra	50
Métodos estadísticos	50
Tablas de contingencia de 2 x 2	51
Ji cuadrada	51
Ji cuadrada con corrección de Yates	52
Riesgo relativo	53
Odds ratio	53
Intervalos de confianza	54
Frecuencia fenotípica	54
Frecuencia génica	54
Frecuencia haplotípica	54
Hipótesis	56
Objetivo general	56
Objetivos específicos	56
Métodos	
Población en estudio	57
Determinación de genotipos	58

Obtención de DNA genómico	58
Tipificación molecular de alelos clase I y II	58
Análisis estadístico	60
Determinación de fenotipos	60
Lavado bronquioalveolar	60
Ensayo de proliferación de células A549 estimuladas con LBA	60
Ensayos de apoptosis	61
Detección de DNA fragmentado por citometría de flujo	61
Cuantificación de caspasa 3 activada	62
Resultados	
Características generales de los pacientes con FPI	63
Alelos y haplotipos HLA-DRB1 y -DQB1 en pacientes y controles	63
Influencia de los LBA sobre la tasa de crecimiento de células epiteliales alveolares A549	64
Efecto del LBA de pacientes sobre la apoptosis de células epiteliales alveolares A549	65
Influencia de los diferentes haplotipos sobre el comportamiento clínico de la enfermedad	65
Tabla 1. Características basales y hallazgos en LBA de pacientes con FPI.	66
Tabla 2. Frecuencias génicas de HLA-DRB1* en pacientes con FPI y grupo control	67
Tabla 3. Frecuencias génicas de HLA-DQB1* en pacientes con FPI y grupo control	68
Tabla 4. Frecuencias haplotípicas de HLA DRB1*-DQB1* en pacientes con FPI y grupo control	69
Tabla 5. Frecuencias génicas de HLA-B* en pacientes con FPI y grupo control	70
Tabla 6. Frecuencias haplotípicas de HLA B*-DRB1*-DQB1* en pacientes con FPI y grupo control	70
Figura 7. Efecto del sobrenadante de LBA de pacientes con FPI con diferentes haplotipos HLA y controles, sobre la tasa de crecimiento de células epiteliales A549	71

Figura 8. Detección de DNA fragmentado por citometría de flujo en células epiteliales estimuladas con sobrenadante de LBA de pacientes con FPI y controles	72
Figura 9. Efecto del sobrenadante de LBA de pacientes con FPI y controles en la activación de caspasa 3	73
Discusión	74
Bibliografía	80
Anexo 1. Tabla de interpretación de bandeos para HLA-B	101
Anexo 2. Tabla de interpretación de bandeos para HLA-DRB1	104
Anexo 3. Tabla de interpretación de bandeos para HLA-DQB1	105
Anexo 4. Glosario de términos	106

Abreviaturas utilizadas

A continuación se enuncian las abreviaturas utilizadas en la presente tesis, se expone su significado en español, la descripción en inglés se encuentra en el cuerpo del texto, cuando es el caso. Presentados por orden alfabético

- ❖ **AIF**: Factor de inducción de apoptosis.
- ❖ **AIF-1**: Factor inflamatorio en aloinjerto.
- ❖ **BAK1**: Bcl2-antagonista/asesino.
- ❖ **BAT3**: Transcrito 3 asociado a HLA-B.
- ❖ **CDKN1A**: Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1.
- ❖ **CIITA**: Activador de la transcripción de clase II.
- ❖ **CTLA4**: Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos.
- ❖ **DAXX**: Proteína asociada a muerte 6.
- ❖ **DMEM**: Medio de Eagle modificado por Dubelcco.
- ❖ **FADD**: Dominio de muerte asociado a Fas.
- ❖ **FPI**: Fibrosis pulmonar idiopática.
- ❖ **GAF**: Factor de IFN- γ activado.
- ❖ **Glo**: Glioxalasa-1.
- ❖ **HLA**: Antígenos leucocitarios humanos.
- ❖ **HMGA1**: Dominio AT-hook 1 de alta movilidad.
- ❖ **HSP70**: Proteína de choque térmico de 70 kDa.
- ❖ **ICE**: Enzima convertidora de Interleucina-1 β .
- ❖ **IFN**: Interferón, puede ser α , β , γ .
- ❖ **IL**: Interleucina.
- ❖ **IRF-1**: Factor 1 de respuesta a IFN.
- ❖ **I κ B-like**: Proteína similar a I κ B.
- ❖ **kb**: kilobases.
- ❖ **kDa**: kiloDaltones.
- ❖ **LBA**: Lavado bronquioalveolar.
- ❖ **LD**: Desequilibrio de enlace.
- ❖ **LMP**: Proteínas de bajo peso molecular, existen las subunidades 2 y 7.
- ❖ **LST1**: Transcrito específico de leucocitos. Anteriormente denominado **B144** y **D6S49E**.
- ❖ **LTA**: Linfotoxina α .

- ❖ **LTB**: Linfotóxina β . También llamado TNF-C.
- ❖ **Mb**: Megabases.
- ❖ **MHC**: Complejo principal de histocompatibilidad.
- ❖ **MIC**: Genes relacionados a MHC clase I.
- ❖ **NF-Y**: Factor nuclear Y.
- ❖ **NF κ B1**: Factor nuclear κ B1.
- ❖ **NID**: Neumopatías intersticiales difusas.
- ❖ **NK**: Células asesinas naturales
- ❖ **pb**: pares de bases.
- ❖ **PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa.
- ❖ **RFX**: Factor regulador X.
- ❖ **Ski2**: Súper asesino 2.
- ❖ **Smac/DIABLO**: Segundo activador de caspasa derivado de mitocondria/Proteína de unión directa al dominio IAP.
- ❖ **SOX4**: Caja Y 4 de región determinante del sexo.
- ❖ **SP-C**: Proteína C del surfactante.
- ❖ **SSP**: Iniciadores secuencia específica.
- ❖ **Stat91**: Señal de transducción y activador de la transcripción.
- ❖ **TAP**: Transportador asociado con procesamiento antigénico 1 y 2.
- ❖ **TGF- β 1**: Factor de crecimiento transformante β 1.
- ❖ **TNF**: Factor de necrosis tumoral.
- ❖ **TNFR-1**: Receptor 1 del TNF.
- ❖ **TRADD**: Dominio de muerte asociado al receptor de TNF.
- ❖ **X₂BP**: Proteína de unión a X₂.

RESUMEN

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI), es una enfermedad pulmonar crónica, caracterizada por proliferación de fibroblastos y remodelación tisular. Aunque es considerada una enfermedad multifactorial, los posibles genes involucrados son desconocidos. Los estudios a cerca del posible papel que desempeña el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), son pocos y en algunos casos muestran resultados contradictorios. En el presente estudio, analizamos el polimorfismo de los *locus* HLA-B, -DRB1 y -DQB1, en un grupo de 75 pacientes con FPI y 95 sujetos clínicamente sanos (grupo control), utilizando técnicas de PCR en modalidad de iniciadores secuencia específica. Adicionalmente, examinamos el efecto del lavado bronquioalveolar (LBA) de pacientes con FPI con diferentes haplotipos HLA (-B-DRB1-DQB1) en la tasa de crecimiento epitelial alveolar a través de un ensayo de viabilidad con el reactivo WST-1. La apoptosis epitelial se determinó por citometría de flujo y la activación de caspasa 3 en homogenizados celulares por medio de un ensayo de ELISA. Tres haplotipos resultaron incrementados significativamente en el grupo de pacientes con FPI: (1) HLA B*15-DRB1*0101-DQB1*0501 (OR = 10.72, IC = 1.43-459.6; pC = 0.011); (2) HLA B*52-DRB1*1402-DQB1*0301 (OR = 4.42 IC = 1.21-24.1; pC = 0.024); y (3) HLA B*35-DRB1*0407-DQB1*0302 (OR = 4.73, IC = 1.53-19.5; pC = 0.005). El LBA de pacientes con este último haplotipo produjo una reducción significativa de la tasa de crecimiento epitelial (~30%) e indujo apoptosis de células epiteliales tratadas para su activación con caspasa 3 (351.7 ± 16.5 pg/ 10^6 células contra 264 ± 24 de los controles, y 274 ± 36.8 y 256.5 ± 10.7 de otros haplotipos; $p < 0.05$), así como un aumento en el marcaje de la ruptura de DNA por citometría de flujo ($23.7 \pm 6.9\%$ contra $3.1 \pm 0.7\%$ de los controles, y $6.5 \pm 0.6\%$ y $7.6 \pm 1.2\%$ de los otros dos haplotipos $p < 0.01$). Estos hallazgos sugieren que algunos polimorfismos del MHC confieren susceptibilidad a desarrollar FPI, la cual puede estar relacionada con la inducción de apoptosis de células epiteliales, un proceso crítico en el desarrollo de la enfermedad.

COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Antecedentes

El complejo principal de histocompatibilidad, MHC (por sus siglas en inglés *Major Histocompatibility Complex*) fue descubierto hace más de 50 años (1). Se trata de una colección extendida de genes localizada, en humanos, en el brazo corto del cromosoma 6, específicamente en la banda 6p21.3. Este *locus* fue originalmente identificado y denominado así debido a su papel en el rechazo de órganos trasplantados y de hecho muchos de sus genes (>40%) se han asociado a importantes funciones en la biología del sistema inmunológico (2).

Esta región del genoma comprende genes específicos de histocompatibilidad, y en los últimos 25 años su naturaleza ha sido resuelta con el advenimiento de las técnicas de clonación de DNA y la determinación de varias estructuras de los antígenos de HLA clase I y II. En el MHC se han identificado 224 *loci* distintos, que se agrupan en el llamado MHC clásico. Posteriormente se describió un grupo adicional de 40 *loci*, al conjunto total de 264 *loci* se le denomina MHC extendido. Dos hechos resultan relevantes de esta particular región del genoma: es la región de genes más densamente poblada y agrupa a las proteínas humanas más polimórficas conocidas a la fecha, las moléculas de clase I y II (3).

Historia del MHC

Peter A. Gorer, entre 1936-1937, al tratar de diferenciar los grupos sanguíneos en cepas endogámicas de ratón estableció la existencia de dos sistemas antigénicos: el primero era común a todas las cepas difiriendo únicamente en cantidad, a éste le denominó "Antígeno I" (Ag I). El segundo, (Ag II) le pareció particularmente interesante ya que estaba presente en algunas cepas, pero ausente en otras y se transmitía de forma dominante de acuerdo a las leyes de segregación Mendeliana (4). Posteriormente, realizando injertos de tumores entre diversas cepas de ratones, George D. Snell demostró que se trataba de un antígeno de histocompatibilidad al que llamó H-2 (5). En 1948 Snell, Gorer y Lyman describieron un *locus* en el cromosoma 17 de ratones que era el determinante primario de la aceptación o rechazo del transplante de tejidos de una cepa a otra (6).

En 1958, Dausset descubrió el primer antígeno de este tipo en humanos y lo llamó Mac, conocido ahora como HLA-A2, (7). Posteriormente van Rood y van Leeuwen en 1963 y

van Rood en 1967 describieron los antígenos del “grupo 4” 4a y 4b (actualmente denominados Bw4 y Bw6), con métodos de leucoaglutinación (8). En 1965 Jean Dausset e Ivanyi postularon que muchos de los antígenos detectados en humanos formaban parte de un sistema genético análogo al MHC murino y lo denominan Hu-1. Más tarde un comité de nomenclatura lo designó como HLA, del inglés *human leukocyte type A*, puesto que fue en leucocitos donde se definió originalmente (9). Los diferentes estudios a lo largo de la historia del MHC lograron definir 6 *loci* genéticos independientes; los tres primeros, determinados por técnicas puramente serológicas se denominaron como HLA-A, -B y -C (HLA clase I) y los tres posteriores se localizaron en una región genómica adyacente llamada HLA-D (HLA clase II). Al primer producto génico correspondiente a esta región, se le denominó “relacionado con HLA-D” o HLA-DR (del inglés *HLA-D related*) y a los dos posteriores se les asignó el nombre de HLA-DP y HLA-DQ (7).

El descubrimiento de los genes “MIC” o relacionados a MHC clase I (del inglés *MHC class I chain related*) y sus variantes alélicas, son el hallazgo más reciente descrito a la fecha (10).

Organización genética del MHC

En los seres humanos, el MHC se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 donde ocupa alrededor de 8 megabases (Mb). Muchos de los genes encontrados en este complejo codifican proteínas cuya función todavía se desconoce (2). En términos genéticos, el MHC se extiende 4 centimorgans lo que significa que ocurren entrecruzamientos entre cromosomas homólogos con una frecuencia del 4% en cada meiosis. La similitud entre la organización genética del MHC humano y el modelo murino, permite hacer comparaciones en el cartografiado genético. El MHC murino (H-2) se encuentra localizado en el cromosoma 17, y en ambas especies se encuentra telomérico al gen de la Glioxalasa-1 (Glo) (11).

Históricamente y basados en ciertas características funcionales el MHC ha sido dividido en tres regiones: la región de genes que codifican para las moléculas de clase II, que es centromérica, la región de genes de las moléculas de clase III y la región de genes encargados de codificar a las moléculas de la clase I ubicadas hacia el telómero (figura 1) (12). El área más centromérica de la región de genes de las moléculas clase II contiene a los *locus* HLA-DP, -DQ y -DR, en tanto que el área más telomérica de la

región de los genes de las moléculas clase I agrupa a los genes HLA-A, -B y -C, denominados genes HLA clase I clásicos, así como genes relacionados, que se distribuyen en aproximadamente 2 Mb (2). Los *loci* de clase I, denominados no clásicos HLA-E, -F y -G, se encuentran distribuidos entre los genes clásicos, están evolutivamente relacionados, pero parecen tener funciones distintas en la respuesta inmune, principalmente asociadas al reconocimiento de ciertos grupos de células NK (13).

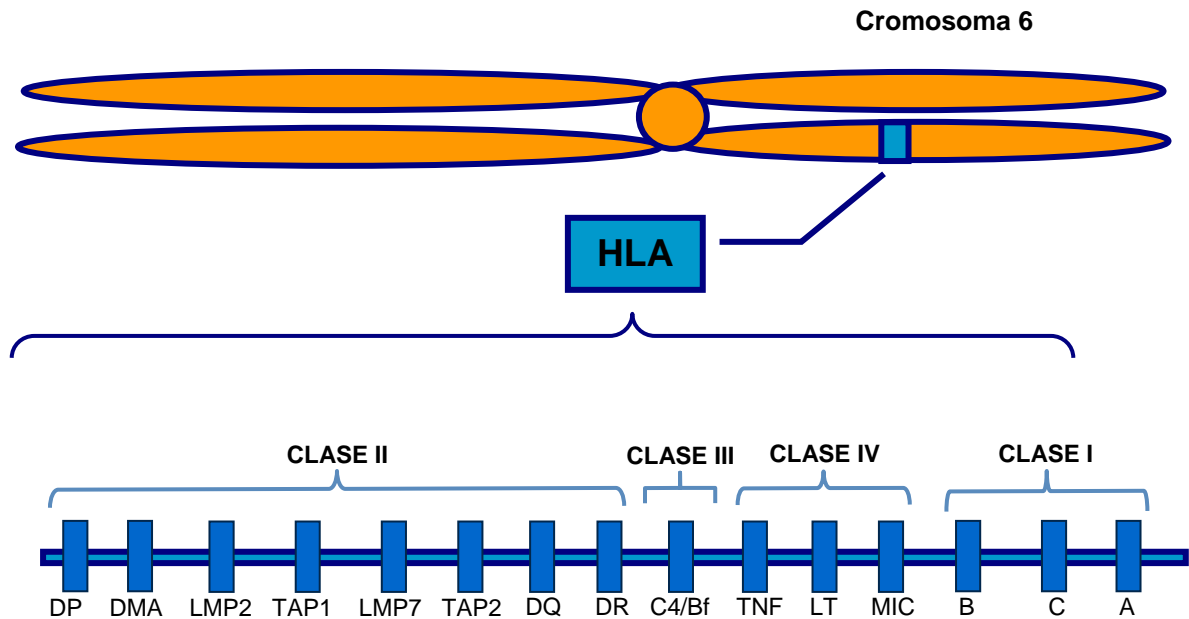


Figura 1. Organización genética del MHC humano (sistema HLA). Se sólo se esquematizan los genes clásicos de cada región.

En 1999 Austin Hughes propuso una nueva clasificación para los genes de la región de clase I basándose en la biología evolutiva y la localización cromosómica, en donde se tomó en consideración a todos los genes de HLA clase I y genes ligados al mismo (14). La región de genes de clase II, esta constituida en dos subregiones, la primera o clásica incluye a los *locus* HLA-DR, -DQ y -DP, en tanto que los agrupados como no clásicos comprenden a HLA-DO, -DM, los genes TAP1 y 2, así como las subunidades del proteosoma LMP2 y 7 (15).

La región de clase III agrupa a los genes que codifican para componentes del sistema del complemento C2, C4a, C4b de la vía clásica y el factor B de la vía alterna de la cascada del complemento.

Ciertos genes involucrados en inflamación, estrés e infección, identificados en la región central del MHC, en el extremo telomérico de la clase III han sido reagrupados como

clase IV. Entre estos se encuentran tres miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral “TNF” (por sus siglas en inglés *Tumor Necrosis Factor*), el gen codificante para AIF-1 (en inglés *allograft inflammatory factor-1*) y la HSP70 (en inglés *heat shock protein 70 kDa*).

Existen numerosas diferencias evolutivamente significativas en cuanto a la secuencia y la estructura entre los genes de clase III y los reagrupados en clase IV que no pueden explicarse por mecanismos de duplicación génica o divergencia, lo que los hace suficientemente distintivos para agruparlos como región de clase IV (16, 17).

Regulación de la transcripción de los genes HLA

Existen características importantes para la expresión de las moléculas HLA:

- 1) La expresión constitutiva de las moléculas de clase I es distinta de las de clase II. En general las moléculas de clase I están presentes en todas las células nucleadas (con raras excepciones), mientras que las moléculas de clase II normalmente se expresan sólo en células dendríticas, linfocitos B, macrófagos, células endoteliales y algunas otras (18).
- 2) La tasa de transcripción es el principal determinante de la expresión de las moléculas de HLA en la superficie de la célula. Puede haber también una regulación post-transcripcional, pero es poco importante (19).
- 3) La transcripción y la expresión de los diversos genes de las moléculas de clase I y clase II están reguladas en forma coordinada. Sin embargo, la transcripción de las moléculas de clase I y II puede ser regulada de manera independiente en la misma célula (18, 19).
- 4) En una amplia variedad de tipos celulares, diversas citocinas modulan la tasa de transcripción de los genes de las moléculas de clase I y II, y este es un mecanismo importante de amplificación para la respuesta de las células T. En casi todas las estirpes celulares examinadas, el interferón (IFN)- α , IFN- β e IFN- γ aumentan de manera significativa el nivel de la expresión de los genes HLA clase I. El TNF y la linfoxina α (LTA), también pueden incrementar la expresión de las moléculas de clase I (19).

En el caso de las moléculas de clase II, no sólo se muestran diferencias en las estirpes celulares en que éstas se expresan, sino también en la regulación por citocinas específicas del tipo celular; por ejemplo, los fagocitos mononucleares expresan

constitutivamente niveles bajos de moléculas de clase II hasta que son estimulados por IFN- γ u otras citocinas. El incremento en la expresión es antagonizada por IFN- α , IFN- β e interleucina (IL)-10. Los linfocitos B expresan constitutivamente moléculas de clase II, las cuales se incrementan con el estímulo de IL-4, IL-10 e IL-13, y se inhibe por prostaglandinas y glucocorticoides. Algunas células como las neuronas no responden a ninguna citocina conocida y permanecen sin expresar moléculas de clase II (19). Los efectos de las citocinas están mediados por la activación de diferentes factores de transcripción que se ligan a secuencias reguladoras de DNA de los genes en cuestión.

En la mayoría de los tipos celulares, los genes de las moléculas de clase I se transcriben constitutivamente en respuesta a dos secuencias cortas denominadas amplificador A y B. En las células en reposo, el amplificador A tiene una secuencia consenso κ B, que está ocupada por el factor de transcripción KBF1 (homodímero de subunidades p50 NF κ B-1). Se desconoce el factor que se une al amplificador B. Cuando las células se tratan con TNF las subunidades p50 son desplazadas por los heterodímeros p50/p65 (NF κ B-1/RelA) aumentando la transcripción. Situada a unos 20 nucleótidos del amplificador A se encuentra una secuencia que se adapta a los requerimientos de una secuencia consenso del IFN. En células tratadas con IFN (α , β o γ) este lugar se ocupa por un factor de transcripción llamado IRF-1 (del inglés *IFN response factor-1*) y esto incrementa la transcripción. Cuando se trata las células con ambas citocinas a la vez, se produce un efecto sinérgico (18).

Los genes que codifican proteínas implicadas en la síntesis de las moléculas de clase II se transcriben de manera coordinada con los genes estructurales con los cuales comparten secuencias reguladoras en *cis* y a los cuales se unen proteínas multiméricas. La caja X está ocupada por el complejo proteico RFX (*regulator factor X*), la caja X₂ por la proteína de X₂BP (*X₂ binding protein*), y la caja Y por el complejo NF-Y (*nuclear factor-Y*). La unión de estos complejos proteicos al DNA es cooperativa y requiere que estén presentes en la célula los tres complejos para que cualquiera de ellos se una con eficacia.

En humanos se ha identificado una mutación en la proteína CIITA (*class-II transcription activator*), la cual no se une directamente al promotor de los genes de clase II, sino que se une al complejo RFX/X₂BP/NF-Y. Esta mutación provoca una inmunodeficiencia primaria severa caracterizada por ausencia de expresión de moléculas de clase II en la superficie celular, llamada síndrome del linfocito desnudo. La síntesis de CIITA es

inducida por IFN- γ y ciertos factores de crecimiento. Distintos estudios han demostrado que CIITA es el principal regulador de los genes de las moléculas de clase II, actuando como un interruptor molecular que controla tanto la expresión constitutiva como la inducible de las moléculas de clase II (20-23). Además se ha observado que la expresión de CIITA es suficiente para activar los genes de las moléculas de clase II, aun en ausencia de estimulación con IFN- γ , lo que sugiere que CIITA es el principal regulador de la expresión constitutiva e inducible de clase II. En general, los IFN's, regulan la transcripción génica por medio de la fosforilación de varios factores de transcripción que comparten una proteína de 91 kiloDaltones (kDa) llamada Stat91 (*signal transducer and activator of transcription*), Stat91 es también conocida como GAF (IFN- γ -activated factor) (21).

Moléculas HLA clase I

Distribución

Las células somáticas nucleadas expresan moléculas de clase I, aunque el nivel de expresión varía dependiendo del tejido, se expresan en abundancia en células linfoides, en menor proporción en hígado, pulmón y riñón, de forma muy aislada en cerebro y músculo esquelético, y no se expresan moléculas de clase I en el endotelio corneal ni en neuronas (24). De manera interesante, el trofoblasto humano no presenta las moléculas HLA clase I clásicas, sino las llamadas moléculas adicionales de clase Ib (no clásicas). Al menos tres de estas proteínas han sido identificadas, las cuales tienen alta homología con las moléculas HLA clásicas. Se trata de las moléculas HLA-E y HLA-F que se expresan en muchos tejidos fetales y adultos, y HLA-G, que solo se expresa en tejidos placentarios y en la interface materno fetal donde las moléculas clásicas de clase I y II están ausentes (25). Carosella y colaboradores en 1999 describieron la ausencia de la expresión de moléculas HLA clase I clásicas y la relevancia de la expresión de HLA-G especialmente en el primer trimestre de la vida fetal, donde se encuentra en células endoteliales de vasos sanguíneos placentarios, células de epitelio tímico, monocitos activados en sangre periférica y en menor proporción en células de la glía.

Finalmente, la presencia de IFN- γ mejora la expresión de HLA-G en la superficie de monocitos. (25, 26).

Estructura

Las moléculas de clase I están constituidas por dos cadenas polipeptídicas, una cadena α o cadena pesada, con una masa relativa estimada entre 43 y 45 kDa y unida de manera no covalente a una cadena β no polimórfica de 12 kDa. La cadena α es una glucoproteína altamente polimórfica determinada por un gen en el MHC mientras que la cadena β , a la que se le ha denominado β_2 microglobulina, es determinada por un gen localizado en el cromosoma 15. La β_2 microglobulina es necesaria para que las moléculas de clase I adquieran una conformación adecuada y sean transportadas del interior de la célula a la membrana plasmática (24, 27).

La cadena α esta conformada por un polipéptido central de 40 kDa el que se orienta de tal manera que tres cuartas partes del polipéptido completo, incluyendo la región amino terminal y el grupo oligosacárido se extiendan en el medio extracelular; un pequeño segmento hidrófobo atraviesa la membrana y los 30 aminoácidos del extremo carboxilo terminal se localizan en el citoplasma (tallo citoplasmático). Como se mencionó, la cadena β interactúa de manera no covalente, con la porción extracelular de la cadena α y no tiene unión directa a la célula (27, 28).

Con base en la secuencia primaria de aminoácidos y a la estructura cristalina de las porciones extracelulares, las moléculas de clase I se han dividido en cinco dominios separados, dos dominios extracelulares de unión al péptido (α_1 , α_2), un dominio similar a inmunoglobulina (α_3), un dominio transmembranal y un dominio intracitoplasmático, según se aprecia en la figura 2 (24).

La cadena α completa se encuentra constituida por 338 aminoácidos divididos por regiones: una porción extracelular hidrofílica inicia en el extremo amino terminal y abarca los residuos 1 a 281; una porción transmembranal hidrofóbica constituida por los aminoácidos 282 a 306 y finalmente una región intracelular hidrofílica formada por los aminoácidos 307 a 338. La región de las moléculas de clase I que interactúa con el antígeno peptídico está formada por los primeros 180 aminoácidos. Aunque el sitio de captación del antígeno de la molécula clase I tiene cierta selectividad por los elementos peptídicos que capta, es bastante distinto de su homólogo en las inmunoglobulinas debido principalmente a que la hendidura es demasiado pequeña para unirse a una proteína globular intacta (27-29). Los estudios mutacionales y estructurales de las moléculas de clase I han demostrado que el dominio no polimórfico α_3 contiene un bucle que se proyecta y es responsable de la unión al CD8 del linfocito T (30).

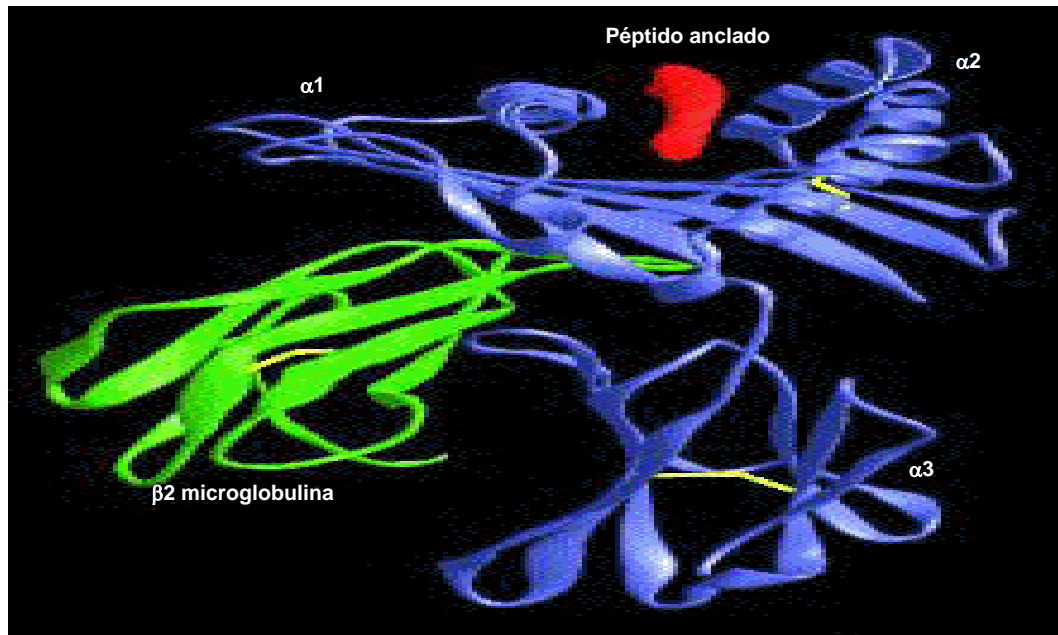


Figura 2. Molécula HLA de clase I clásica. Representación esquemática en modelo de listón de un antígeno HLA clase I.

β2 microglobulina

A diferencia de la especie murina en donde existen 2 alelos comunes, esta cadena es invariable para todas las moléculas de clase I estudiadas en el hombre. Caracterizada como β2 microglobulina, este polipéptido fue denominado β2 por su movilidad electroforética, micro por su tamaño y globulina por su solubilidad. La β2 microglobulina interactúa con la plataforma de la lámina plegada β2 del dominio de unión al péptido, permitiendo un contacto extenso con los residuos de aminoácidos de α1 y α2. La interacción de la β2 microglobulina con los dominios α1 y α2 se refuerza cuando α1 y α2 interactúan con el péptido. De manera similar, la interacción energéticamente favorable de la β2 microglobulina con la cadena α de la clase I estabiliza la unión peptídica (31, 32).

Moléculas HLA clase II

Distribución

En contraste con la amplia expresión de las moléculas de clase I, las moléculas de clase II son expresadas primordialmente por células presentadoras de antígeno de tipo profesional, los linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, epiteliales de ductos mamarios, de túbulos renales y de tracto digestivo (24). Sin embargo, bajo la influencia

de IFN- γ se induce su expresión en casi cualquier célula somática. Los linfocitos T humanos (no así los murinos) expresan moléculas de clase II al ser activados, los monocitos y macrófagos las expresan constitutivamente, mientras que para los ratones la expresión de moléculas clase II depende de IFN- γ (20, 21, 24).

Estructura

Las moléculas de clase II consisten de un heterodímero de dos cadenas polipeptídicas, una α a la que se le ha estimado con una masa relativa de 32 a 34 kDa y una cadena β de 28 a 30 kDa (33). Ambas cadenas son muy similares en cuanto a su estructura (aunque la cadena α tiene mayor grado de glucosilación) y se encuentran asociadas de manera no covalente. Las dos cadenas poseen un extremo amino terminal extracelular y un extremo carboxilo terminal intracelular y alrededor de dos tercios de ellas están localizados en el espacio extracelular (figura 3).

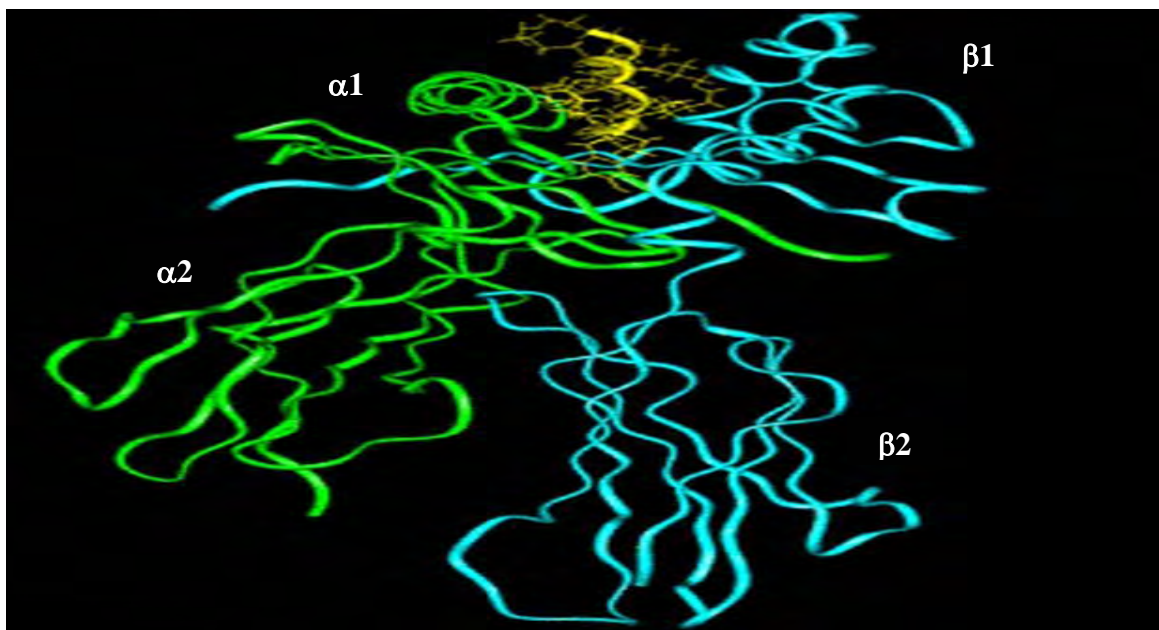


Figura 3. Molécula HLA de clase II clásica. Representación esquemática en modelo tubular de un antígeno HLA clase II. La cadena α se representa en verde y la β en azul.

Poseen una distribución por regiones: 1) Una región extracelular que a su vez se divide en dos dominios, ubicados en el extremo amino terminal de la molécula y que le otorgan la carga hidrofílica que la caracteriza. 2) Una región transmembranal hidrofóbica y finalmente, 3) una región intracelular hidrofílica. Estas dos últimas regiones anclan las cadenas a la membrana celular (34). Con el conocimiento de la secuencia de

aminoácidos de muchas moléculas de clase II se ha podido determinar que existen similitudes estructurales entre las moléculas de clase I y II, especialmente en la hendidura de unión del péptido.

Las cadenas α y β de las moléculas clase II están compuestas por 229 y 237 aminoácidos respectivamente (34, 35). La región extracelular hidrofílica de la cadena α , contiene, como se describió antes, 2 dominios, que los constituyen los residuos 1 al 84 y 85 al 178, denominados respectivamente α_1 y α_2 . La región extracelular hidrofílica de la cadena β también contiene dos dominios, que van de los residuos 1 al 91 y 92 al 192, denominados respectivamente β_1 y β_2 . El extremo carboxilo terminal, tanto de la cadena α como β , continúan en regiones cortas de conexión, seguidas de tramos de 25 aminoácidos hidrófobos que atraviesan la membrana. En ambas cadenas la región hidrófoba transmembranal termina en un grupo de aminoácidos básicos que se continúan por los extremos carboxilo terminal de los polipéptidos que forman apéndices citoplasmáticos hidrofílicos. Las características estructurales de las moléculas HLA-DQ y -DP son similares a las de -DR. Las cadenas de la molécula -DQ α y β poseen 264 y 229 aminoácidos mientras que las cadenas α y β de los DP tienen cada una 229 (34).

Las moléculas clase II tienen características estructurales que las hacen similares a las inmunoglobulinas (34, 36) y únicas entre sí. De las estructuras que las caracterizan están el alfa hélice (α -hélice) y la conformación beta (conformación β).

Características del α -hélice:

- Los grupos alquilo de todos los aminoácidos se extienden hacia el exterior.
- La hélice realiza un giro completo cada 3.6 aminoácidos.
- La hélice está orientada hacia la derecha y gira en dirección de las manecillas del reloj (dextrógiro).
- El grupo carboxilo (-C=O) de cada unión de péptidos se extiende paralelamente al eje de la hélice y apunta directamente al grupo amino del péptido unido, 4 aminoácidos abajo en la hélice, formando un puente de hidrogeno entre ellos (figura 4).

Características de la conformación β :

- Consiste de pares de cadenas tendidas lado a lado.
- Se estabiliza por puentes de H entre el átomo de oxígeno del grupo carboxilo en una cadena y el grupo amino en la cadena adyacente.

- Las cadenas son antiparalelas; de amino terminal a carboxilo terminal, la dirección de una es opuesta a la otra (figura 4).

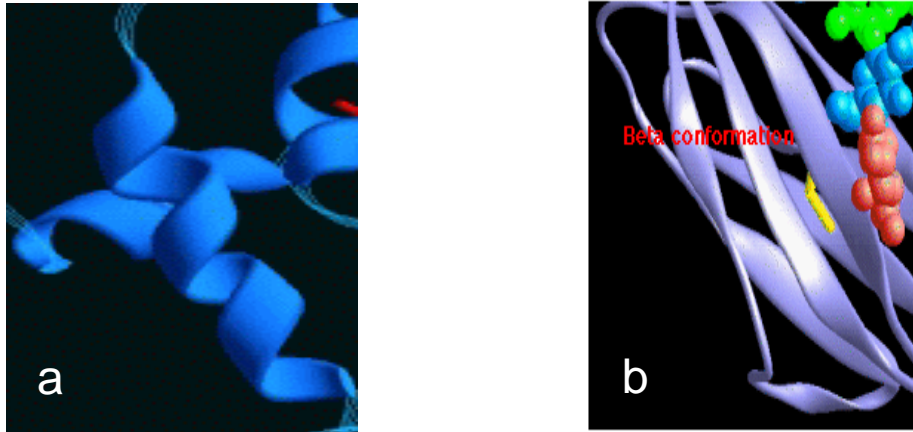


Figura 4. Características estructurales del α hélice (panel a) y la conformación β (panel b). Esquemas en modelo de listón

La estructura tridimensional de las moléculas clase II se ha resuelto mediante cristalografía de rayos X. Este análisis reveló una notable similitud estructural entre las moléculas MHC. Ambas clases (I y II) presentan una profunda hendidura en la superficie, donde se anclan los péptidos (34, 37, 38).

Puesto que cada molécula HLA, tiene “cargado” un péptido antigénico, cada célula despliega en su superficie cientos de miles de péptidos diferentes (39).

Región de la grieta o hendidura

La hendidura o fosa acanalada tiene un tamaño consenso de 25 Å de largo por 10 Å de ancho y 11 Å de fondo (40); se trata de una formación flexible y extendida que representa el sitio de unión de los péptidos procesados y de hecho, aquí se localiza el polimorfismo de las moléculas clase II. Una molécula de clase II solo puede captar un número limitado de fragmentos peptídicos antigénicos, por lo tanto, muestra cierta selectividad para los antígenos, pero carece de la especificidad fina del sitio de captación de una inmunoglobulina. En la hendidura captadora de antígeno creada por las dos α hélices y la plataforma, se puede aceptar un péptido antigénico procesado (figura 5) (39). Las α hélices y el péptido antigénico forman el ligando reconocido por el receptor de los linfocitos T CD4 (facilitadores). Las restricciones para el reconocimiento del complejo péptido antigénico y clase II por los linfocitos T CD4, son similares a

aqueños para el reconocimiento del complejo péptido antigénico y clase I por los linfocitos T CD8 (supresores/citotóxicos). Las orillas del surco o canal de unión a péptidos de la molécula HLA están abiertos lo que permite la unión de péptidos de longitud variable (generalmente de 13 a 25 aminoácidos) (27, 39).

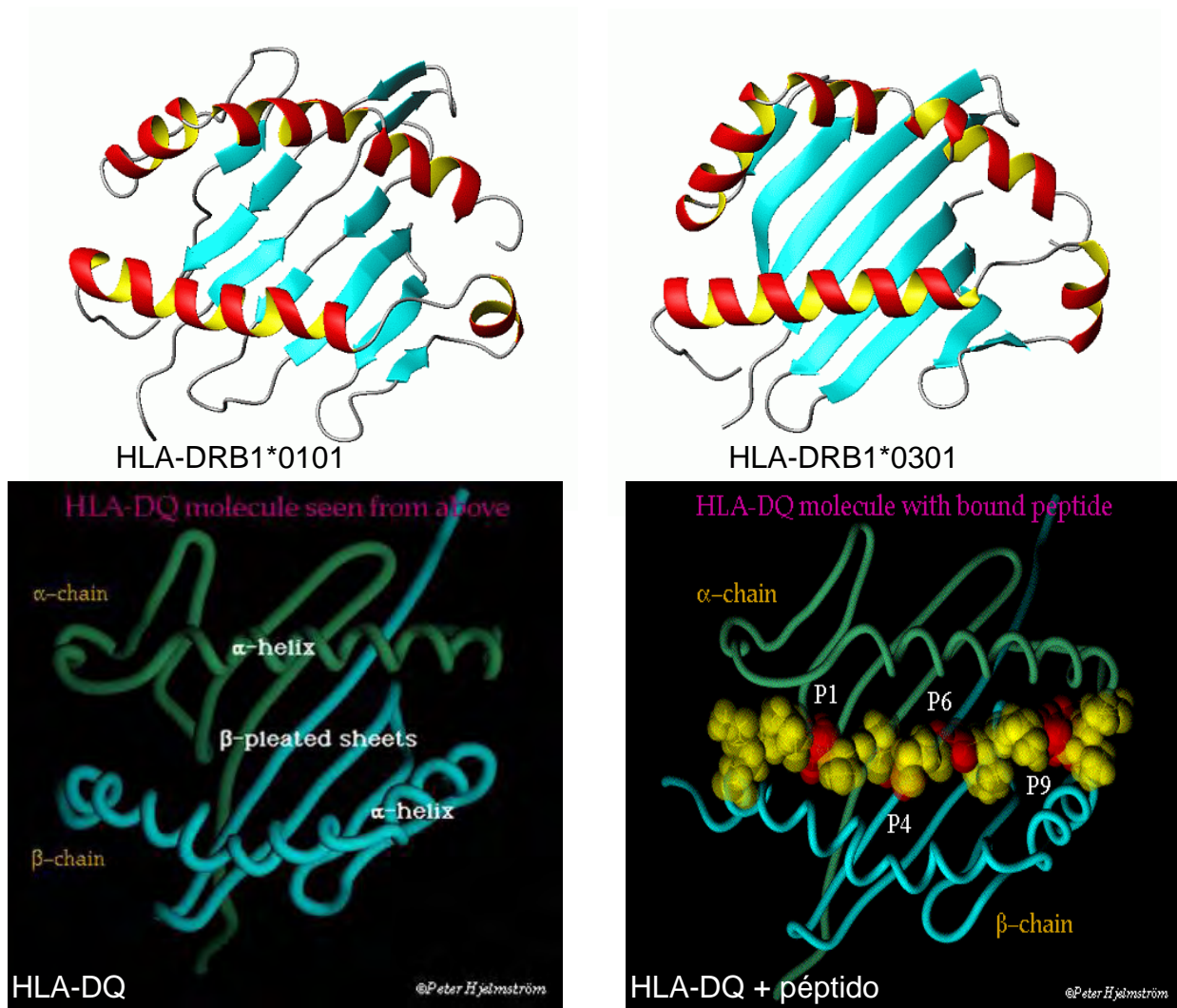


Figura 5. Región de la grieta. Modelo tubular de las moléculas HLA-DR y DQ.

Los residuos de péptidos son anclados en cavidades o “pockets”, por su significado en inglés, (27, 34); típicamente, una molécula de HLA tiene seis pockets (denominados del A al F), distribuidos a lo largo de la grieta. Dos o tres de ellos, generalmente B y F, son particularmente interesantes, debido a que influyen en la selección entre el péptido a unir y su correspondiente molécula de HLA; además se constituyen como péptidos de anclaje en la fosa de las moléculas HLA. El resto de los pockets, aunque tienen importancia en la unión con el péptido, no son determinantes en la selección específica

del péptido a unir (39). El producto de un alelo particular, es capaz de unir un gran número de péptidos, generalmente miles de ligandos (41).

Los péptidos difieren en su secuencia, pero comparten dos o tres residuos de aminoácidos, a los que se les llama motivos, mismos que se unen dentro de las cavidades de anclaje (39, 42).

Las primeras moléculas de HLA que se cristalizaron por métodos bioquímicos fueron HLA-DR1 (34, 43) y HLA-DR3 (44), revelando que son muy similares a las estructuras de clase I, (43, 45) y confirmando los modelos hipotéticos previamente propuestos por Brown (46). Posteriormente se conocieron los motivos para varios alelos de las moléculas HLA-DQ (42, 47-53).

Como ya se mencionó, ambas cadenas polipeptídicas de clase II pueden ser polimórficas, especialmente los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$. Los productos clase II mejor caracterizados en el humano son HLA-DR, -DQ y -DP.

El gen de la cadena α del *locus* HLA-DR es DRA y no es polimórfico. Las cadenas β son codificadas por los genes DRB1, que determinan la cadena β con las especificidades DR1 a 18, DRB3 que determina las especificidades DR52, Dw24, Dw25 y Dw26, DRB4 que es responsable de la especificidad DR53, y DRB5 que codifica DR51. DRB2, 6, 7, 8 y 9 son pseudogenes (54).

No todos los individuos expresan todos los genes DRB. En ciertos haplotipos puede haber dos (o tres) productos DR, ambos con la misma cadena α pero con cadenas β diferentes. DR52 se encuentra en individuos DR3, DR5, DR11, DR12, DR13, DR14, DR17 y DR18, mientras que DR53 se asocia a DR4 (Dw4, Dw10, Dw13, Dw14, Dw15, Dw17, Dw23), DR7 y DR9. Finalmente, DR51 está presente en DR15 y DR16. El único alelo con un solo dímero DR es DR8.

En HLA-DQ hay dos genes α y tres β ; sólo -DQA1 y -DQB1 son funcionales mientras que -DQA2, -DQB2 y -DQB3 son pseudogenes.

En HLA-DP hay cuatro genes, dos codifican la molécula HLA-DP y los otros dos son pseudogenes. Los productos de los genes DMA y DMB forman un heterodímero con 30% de homología con otras moléculas clase II (49, 54).

Otros genes de la región clase II, que son estructuralmente distintos de las moléculas del HLA, codifican polipéptidos que colaboran en el procesamiento de antígenos. Entre éstos se encuentran los genes TAP1 y TAP2 (del inglés *transporter associated with antigen processing 1 y 2*), que codifican transportadores de péptidos, y los LMP2 y

LMP7 (del inglés *low molecular weight polypeptide proteasome 2 y 7*), que codifican componentes del proteosoma. Estas moléculas son esenciales para la generación y transporte de péptidos que se unirán a las moléculas clase I en el interior del retículo endoplásmico (55).

Moléculas HLA clase III

A los aproximadamente 700 kb de DNA que separan a las regiones HLA clase II de la clase I se les denomina región de HLA clase III, la cual agrupa a una colección de genes de funciones dispares. La mayor parte de estos genes han sido identificados por estudios de secuenciación y aún no han sido definidos a nivel funcional. Algunos de ellos están relacionados con la respuesta inmune innata e inflamación (56).

La clonación molecular ha logrado la identificación de 60 genes en esta región; la delineación de la organización global, estructura génica, formas de empalme alternativo, similitud entre proteínas y elementos reguladores potenciales en *cis* conducen a varias conclusiones:

- 1) HLA clase III es la región génica mas densa del genoma humano: >14% de su secuencia es codificante, aproximadamente 72% de la región es transcrita y hay un promedio de 8.5 genes por cada 100 kb.
- 2) El tamaño de los genes, el número de exones, y las distancias intergénicas son similares entre distintas especies.
- 3) La región contiene una heterogénea mezcla de genes, de los cuales solo pocos se han definido con claridad y comprobado su función.
- 4) Las secuencias no codificantes conservadas entre especies se encuentran principalmente en la región 5' UTR (5' no traducida) o al menos cercana a esta; muchos de estos bloques conservados son probables elementos reguladores en *cis*. El tamaño promedio de las secuencias codificantes de la región de clase III es de 1.79 kb; la región 5' UTR es de 233 pb (pares de bases) y la 3' UTR (3' no traducida) de 413 pb. El número promedio de exones por gen en esta región es de 11.2 (57).

Varios genes dentro de la clase III del MHC tienen funciones definidas en la respuesta inmune innata (57) e inflamación (2, 3) incluyendo miembros del sistema del complemento (C2, C4a, C4b, de la vía clásica y el factor B de la vía alterna o vía de la properdina), así como varios genes de reciente descubrimiento, miembros de dos

diferentes superfamilias; la superfamilia de las inmunoglobulinas (IC7, G6b y G6f) y la superfamilia Ly6 (G5b, G5c, G6c, G6d y G6e) (58).

En el extremo centromérico se encuentra el gen G15, que tiene homología con la acetiltransferasa de ácido lisofosfatídico, y está probablemente implicado en señalización intracelular e inflamación (59). I κ B-like, que se encuentra adyacente a la LTA, es probablemente un factor de transcripción de la familia de NF κ B (60). Otros genes, por ejemplo la valina tRNA sintetasa está involucrada en el ciclo celular y parece no tener una función especializada en el sistema inmune (57).

Moléculas HLA clase IV

Recientemente, cierto número de genes involucrados en la inflamación, incluyendo tres miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF, LTA y linfotóxina β “LTB”), AIF-1 y HSP70 han sido identificados en la región central del MHC, específicamente en el extremo telomérico de la clase III. Estos genes se extienden en un espacio de 300 kb y están implicados en varios aspectos de la respuesta a estrés, inflamación o infección o bien su expresión esta condicionada a células especializadas del sistema inmune. Gruen y Weissman en 1997 sugirieron que estas características son suficientes para considerar a esta colección de genes como una clase independiente de la clase III, y propusieron denominarla clase IV (16, 17).

Superfamilia del TNF: Se trata de un grupo de genes de tres citocinas relacionadas, TNF, LTA y LTB, próximas al extremo telomérico de la región de clase III. El TNF ha sido ampliamente estudiado y desempeña un papel preponderante en inflamación, así como en infecciones bacterianas y virales. Es producido por una gran variedad de células, incluyendo monocitos, macrófagos, y algunos subgrupos de células T. Algunos polimorfismos en el gen del TNF se asocian con incremento en la susceptibilidad a malaria cerebral fatal, y a diversos desordenes de tipo autoinmune (61). Actualmente se ha documentado la existencia de variantes alélicas en el TNF; se trata de polimorfismos puntuales en el promotor donde el cambio radica en una base y sitio específicos (62). Principalmente se han estudiado dos polimorfismos, Guanina (G) por Adenina (A), en la región reguladora 5', en las posiciones -238 y -308. El significado biológico de este polimorfismo indica que el alelo TNF-308.2 (A en la posición 308), está asociado con altos niveles constitutivos e inducibles de esta citocina (63).

LTA (también llamada TNF- β): Tiene acciones similares a las que realiza el TNF, pero su patrón de expresión es considerablemente más limitado. Se ha demostrado que la delección del gen de LTA, conduce a una ausencia específica de nódulos linfáticos, placas de Peyer y centros germinales esplénicos en el ratón, mientras que en ausencia del gen de TNF, se desarrollan nódulos linfáticos y placas de Peyer, pero se carece de folículos primarios de células B esplénicos en el mismo modelo experimental (64).

LTB (también llamada TNF-C): Es una molécula unida a la membrana celular, que forma un heterotrímero con LTA; este complejo puede inducir la activación de NF κ B en ciertas líneas celulares, el cual es un factor de transcripción pleiotrópico capaz de activar la expresión de una gran variedad de genes críticos en la respuesta inflamatoria. El complejo LTA-LTB es débilmente citotóxico (65).

B144 (D6S49E), también llamado LST1 (del inglés *leukocyte specific transcript*): Se expresa exclusivamente en monocitos, macrófagos y células T y su expresión es estimulada en especial por IFN- γ . El RNA de B144 es un ensamble de cuatro secuencias derivadas provenientes de la región 5' y tres exones internos, así como varias formas del exón 3'; los exones 5 y 6 pueden estar asociados con algunas partes de 5' y pueden ser separados u omitidos del producto final del mRNA; como resultado se han encontrado 24 o más formas de mRNA final en células U937 (66).

IC7: Es preferentemente expresado en monocitos y otros tipos celulares de la línea hematopoyética, se encuentra inmediatamente adyacente a B144; el producto codificado por este gen tiene similitud parcial con antígenos de superficie como CTLA4 (del inglés *Cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) (16).

AIF-1: Este gen, específico de monocitos y linfocitos, fue identificado a causa de su elevado nivel de expresión en trasplantes cardiacos experimentales; sin embargo, su función no ha sido elucidada (67).

I κ B-like (I κ BL): Se denomina así por la homología de ciertos motivos de su proteína con I κ B, el cual es un regulador negativo de NF κ B a través de fosforilación, ubiquitinación y degradación. Por analogía I κ BL, resulta ser un candidato a regulador de la respuesta inflamatoria (60).

SK12W: Se encuentra centromérico a los genes de HSP70 y codifica una proteína con similitud parcial a *Ski2* (*superkiller 2*), descrita en levaduras; a la que se le ha atribuido un efecto antiviral. En levaduras impide la traducción de mRNA no poliadenilados,

haciéndolos susceptibles de degradación. Se ha propuesto que en el humano pudiera tener funciones similares actuando como mediador con efectos antivirales (68).

Familia MIC: Se trata de un grupo de genes homólogos y pseudogenes espaciados en las regiones distales de las regiones de clase III y I. Aunque la estructura de sus genes y la de sus proteínas los hacen similares a las moléculas de clase I, son claramente divergentes. Los únicos miembros de esta familia conocidos por expresar mRNA, son MICA y MICB; la proteína MICA se expresa y pliega de manera independiente de la $\beta 2$ microglobulina y se ha encontrado especialmente expresada en la mucosa intestinal (69).

Es con base en estos hallazgos, que Gruen y Weissman ofrecen para estos genes, una designación separada e independiente de la clase III, denominándola clase IV, reconociendo sus múltiples y potenciales implicaciones en la respuesta inflamatoria y estrés (16).

Función biológica del complejo principal de histocompatibilidad

La función primordial de las moléculas MHC es proveer al organismo de protección contra patógenos. Esta función la realizan a través de vías sofisticadas, en las cuales las moléculas de clase I presentan péptidos endógenos a linfocitos T CD8, en tanto que las moléculas de clase II, presentan péptidos exógenos a los linfocitos T CD4. Una gran cantidad de moléculas participan en estas vías, muchas de ellas codificadas dentro del mismo MHC, como es el caso de las moléculas TAP, LMP, DM y DO (70). El procesamiento de los antígenos está vinculado a los mecanismos de síntesis y reciclaje de todas las proteínas en el interior de las células y al proceso de transporte a través de distintos compartimentos (71).

Zinkernagel y Doherty descubrieron en 1974 que los linfocitos T aislados de un ratón podían reconocer las células infectadas de un segundo ratón, siempre y cuando ambos ratones expresaran las mismas moléculas MHC de clase I. La respuesta inmunitaria se producía exclusivamente en presencia del antígeno correcto y de la molécula MHC correcta. A este doble requisito, de un antígeno foráneo y una molécula MHC apropiada, se le denominó reconocimiento de antígeno restringido por el MHC o “restricción antigénica” (72, 73).

Polimorfismo

Entre los individuos normales, al menos 1% de ellos expresará un gen “variable” al gen homólogo del resto de la especie. A este tipo de genes se les llama polimórficos y cada variante común de un gen polimórfico se denomina alelo. Se dice que un individuo es homocigoto cuando posee el mismo alelo en un *locus* genético de ambos cromosomas homólogos; cuando presentan alelos diferentes en cada cromosoma, se habla de un individuo heterocigoto (74). El polimorfismo genético con cambios funcionales en la proteína codificada, no es una característica común en genes de vertebrados; muchos genes tienen alelos comunes y frecuentemente estos no exhiben diferencias perceptibles en su función (funcionalmente neutrales). En contraste, existen datos, que indican que el polimorfismo de los genes clásicos de los *loci* de clase I y II del MHC son seleccionados por distintos mecanismos (75).

Los polimorfismos en MHC se encuentran predominantemente en los dominios $\alpha 1/2$ y $\beta 1$ de las moléculas de clase I y II respectivamente. Estos dominios forman la región de unión al péptido, permitiendo a las distintas versiones alélicas de estas moléculas unirse a diversos arreglos de péptidos (76). En el cuadro 1, se muestran los alelos de cada uno de los distintos *locus* de la región de HLA.

Existe evidencia de que el polimorfismo se mantiene por selección sobredominante (o por una forma similar a la selección de balanceo, como por ejemplo la selección dependiente de frecuencia), producto del análisis del rango de sustitución de nucleótidos, en diferentes regiones de los genes HLA clase I. En el caso de muchos genes, el rango de sustitución de genes ‘sinónimos’ (o silenciosos), excede el rango de sustitución de ‘no sinónimos’ (sustitución o reemplazo), porque muchas mutaciones de ‘no sinónimos’ son deletéreas y entonces son eliminadas por selección natural. En contraste, se puede presentar el raro caso en donde la selección natural actúa a favor de la diversidad de aminoácidos, como una fuerza excluyente de patrones de sustitución contraria. Esto es precisamente lo que se encuentra en los genes de clase IA (14). Esta observación es un punto central en el mantenimiento del polimorfismo, presumiblemente conducida por la resistencia a organismos patógenos. La naturaleza molecular de este mecanismo selectivo, es debatida, al igual que la contribución relativa de la conversión génica, mutación, recombinación, u otros mecanismos por los cuales se generan polimorfismos. Los genes no clásicos de clase I, -E, -F, -G y de la clase II HLA-DM y -DO, son menos variables en sus secuencias, lo cual apoya el hecho de que

el polimorfismo es producto de la presentación antigénica (2). Gruen y Weissman han postulado que los requerimientos para mantener el polimorfismo funcional en la clase II, sean cuales sean, puedan incrementar el riesgo de reacciones autoinmunes y que quizá por desequilibrio de enlace, los *loci* de clase IV, actúan como un *loci* inmunomodulador de compensación (16).

Al parecer son tres los mecanismos primarios para la generación de una secuencia nueva de un gen clásico clase I: mutación puntual, recombinación y microrecombinación, con diferentes grados relativos en diferentes *loci*. Las mutaciones puntuales son atribuidas a errores durante la replicación y reparación del DNA (comúnmente en genes de vertebrados), pero la evidencia ha resultado controversial. La recombinación ha sido propuesta como un mecanismo de generación de polimorfismo principalmente entre exones (75). La microrecombinación (o conversión génica) implica la reposición de una secuencia de un gen por la de otro gen sin combinación recíproca; se puede definir como un mecanismo de mutación génica sin pérdida de la función pero más eficaz que la mutación puntual debido a que se introducen varios cambios a la vez. Los aminoácidos necesarios para mantener la estructura proteica permanecen sin alterarse, si ambos genes implicados en la conversión codifican en esas posiciones aminoácidos idénticos. A partir de los estudios en genética poblacional, parece claro que la conversión génica es el principal mecanismo responsable del enorme grado de polimorfismo de las moléculas del MHC (74).

Sin embargo, la comparación de diversos *loci* del MHC sugiere que para cada *locus* las variantes son generadas por una mezcla de mecanismos diferentes (77). Para los genes humanos de clase I, HLA-A, se ha relacionado principalmente con mutaciones puntuales así como un ocasional evento de mutación a gran escala. Las secuencias de HLA-B en cambio, muestran muchos segmentos de intercambio e incidentalmente un elevado grado de evolución (como ejemplo, la presencia de nuevos alelos en poblaciones aisladas) y como consecuencia un gran número de alelos alrededor del mundo. Para las moléculas de clase II HLA-DQA y -DQB predomina al parecer la mutación puntual, en tanto que el intercambio de segmentos se presenta en los genes HLA-DPA y -DPB. Los genes HLA-DRB representan una mezcla de estos mecanismos. En el caso de la aparición de nuevos polimorfismos, se han descrito varias vías por las

cuales las frecuencias de estos aumentan o permanecen, entre ellas están: selección, arrastre genético, efecto fundador, tasa elevada de mutación y deriva génica.

La selección ocurre cuando un alelo en particular confiere cierta ventaja a un individuo, conduciendo a mas descendientes; si la ventaja es importante, el “nuevo alelo” remplazará al “viejo alelo” completamente (es decir, el nuevo alelo, se “fija” en la población).

El arrastre genético ocurre si el alelo de un gen particular aumenta en frecuencia porque es seleccionado (individuos portando alelos que conducen a mas descendencia), entonces el alelo se “ligará” a un gen, el cual no pueda ser separado fácilmente por recombinación, siendo “arrastrado” en frecuencia.

El efecto fundador es observado principalmente en poblaciones aisladas. Si un par de individuos se trasladan a un territorio aislado y procrean, los pocos alelos (no importando que tan raros y/o deletéreos hayan sido en la población original) transportados por aquellos dos individuos, se encuentran ahora en una frecuencia elevada en esta nueva población aislada (75).

Las moléculas clásicas, tanto de clase I como de clase II muestran todas las características de la selección natural. Esto incluye un amplio número de alelos comunes e índices de heterocigocidad en poblaciones por arriba de lo esperado. Existe un gran número de diferencias que conducen a cambios en la secuencia de aminoácidos (cambios no sinónimos o de reemplazo) comparados con aquellos que no conducen a cambio en la secuencia de aminoácidos (cambios sinónimos o silenciosos), lo que se considera una buena evidencia de selección a nivel de proteína más que de DNA. Estos cambios ocurren en ciertos sitios involucrados directamente en la región de unión a péptidos, lo que apoya que éstos tienen claras razones funcionales para ser seleccionados (78). Los péptidos derivan de proteínas intra y extracelulares para su presentación a linfocitos T, siendo esta función, la presión selectiva más comúnmente aceptada que explica el gran numero de alelos de HLA. Esta presión selectiva es la misma identificada en las relaciones entre predador-presa (de hecho, los patógenos son considerados predadores, en este y muchos sentidos), denominada ventaja de alelos raros (también conocida como selección dependiente de frecuencia) y ventaja heterocigota o de heterocigocidad (también conocida como selección sobredominante). Es decir, si un alelo presenta un efecto protector, y este es suficiente para la apropiada supervivencia, entonces los alelos sin este efecto protector, denominados alelos de

susceptibilidad, por poseer mutaciones desventajosas pueden ser eliminados de un grupo de genes en una población, como resultado de una selección negativa (75). En 1968 se creó el comité de nomenclatura para factores del sistema HLA; hasta Abril de 2006 se han identificado 2479 alelos. (cuadro 1) (79, 80).

Cuadro 1
Distribución de alelos del sistema HLA.

<i>Locus</i>	Alelos	Proteínas	Alelos nulos
HLA-A	451	358	36
HLA-B	782	672	25
HLA-C	238	188	6
HLA-E	9	3	0
HLA-F	20	4	0
HLA-G	23	6	1
HLA-DRA	3	2	0
HLA-DRB	522	430	7
HLA-DQA1	34	25	1
HLA-DQB1	71	55	1
HLA-DPA1	23	14	0
HLA-DPB1	124	111	2
HLA-DMA	4	4	0
HLA-DMB	7	7	0
HLA-DOA	12	3	1
HLA-DOB	9	4	0
TAP1	7	5	1
TAP2	4	4	0
MICA	61	52	0
MICB	25	20	2

Fuente: <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG>

Nomenclatura del sistema HLA

La organización y nomenclatura de este sistema es realizada por el Comité de Nomenclatura de Factores del Sistema HLA, con los auspicios de la Organización Mundial de la Salud, el cual se encarga de considerar las adiciones y revisiones a la nomenclatura de las especificidades del sistema, definidas tanto por técnicas moleculares como serológicas (79, 80).

Los alelos clase I se denominan de acuerdo con el tipo serológico original con un número adicional, que indica el alelo en razón de su secuencia de nucleótidos, precedido por un asterisco. La nomenclatura de los genes y moléculas clase II resulta más compleja, por el hecho de estar constituidas por dos cadenas. De tal manera que los genes de las cadenas α son designados como A y los de cadenas β como B; a esto se debe agregar el hecho de que en algunas regiones isotópicas existe más de un gen

codificador para la cadena α y/o β . Por tanto, los genes se designan como DRA (DR solo cuenta con un codificador para la cadena α) DRB1, DRB2, etcétera. Los subtipos de los alelos serológicos se designan (de acuerdo con su secuencia) al igual que las moléculas de clase I, es decir, en razón del isotipo seguido de un asterisco, el serotipo original y dos cifras más (81). En el cuadro 2 se puede apreciar la nomenclatura en uso para los alelos de HLA clase II.

Cuadro 2
Nomenclatura del sistema HLA. Ejemplo con el *locus* DRB1*.

Nomenclatura	Indica:
HLA	Indica la región de HLA y el prefijo de un gen de esta región.
HLA-DRB1	Un <i>locus</i> HLA en particular, en este caso DRB1.
HLA-DRB1*13	Un grupo de alelos que codifican para el antígeno DR13.
HLA-DRB1*1301	Un alelo HLA específico.
HLA-DRB1*1301N	Un alelo nulo.
HLA-DRB1*130102	Un alelo que difiere por una mutación sinónima.
HLA-DRB1*13010102	Un alelo que contiene una mutación fuera de la región codificante.
HLA-DRB1*13010102N	Un alelo nulo que contiene una mutación fuera de la región codificante.

Fuente: <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG>

La convención para usar un código de cuatro dígitos para definir a los alelos HLA de las proteínas que codifican, fue establecida en 1987. En 1990 se añadió un quinto dígito, para permitir la distinción entre secuencias que varían solo por una sustitución sinónima (no codificante) dentro de los exones. Cuando estas convenciones fueron adoptadas se pensó que serían óptimas para la definición total de los alelos de HLA, pero actualmente se reconoce que ciertos genes exceden el número de alelos que acepta el código de 4 y 5 dígitos arriba mencionado, para lo cual el comité de nomenclatura ha tomado las provisiones correspondientes, como lo evidenciamos en el cuadro 2 (82).

Desequilibrio de enlace

Debido a que las parejas humanas son formadas al azar, la frecuencia para encontrar un alelo HLA específico unido o “ligado” a un segundo *locus* HLA particular, deberá dar como resultado el producto de las frecuencias de cada alelo como individual en la población, según se ejemplifica a continuación:

Los alelos HLA-B8 y HLA-DR3 se encuentran en población británica blanca con frecuencias de 0.09 y 0.12, respectivamente. Así la frecuencia esperada con la cual el

haplotipo HLA B8-DR3 debería encontrarse es $0.09 \times 0.12 = 0.0108$, sin embargo, este haplotipo presenta una frecuencia de 0.074, aproximadamente 7 veces la frecuencia esperada.

A esta situación (combinaciones de alelos que muestran frecuencias que exceden la esperada) se conoce como desequilibrio de enlace o "LD" (por sus siglas en inglés *linkage disequilibrium*). Esta se valora como la diferencia (Δ) entre las frecuencias observada y la esperada que por ejemplo en el caso del haplotipo HLA B8-DR3, es igual a 0.0632 (frecuencia observada - frecuencia esperada: $0.074 - 0.0118 = 0.0632$) (70, 83).

El patrón de LD a lo largo del genoma humano varía marcadamente entre regiones y poblaciones; actualmente es el objetivo central de intensas investigaciones en busca de elucidar posibles herramientas de mapeo de genes de susceptibilidad a diversas enfermedades, así como para revelar la historia demográfica de las poblaciones del mundo y las fuerzas selectivas que actuaron sobre estas últimas (84). Diferentes estudios han demostrado sólo breves puntos de recombinación dentro del MHC, lo que explicaría, al menos en parte, el mantenimiento del LD en esta región. Sin embargo, este fenómeno no es exclusivo del MHC y se han descrito otras regiones del genoma en donde este tipo de desequilibrio está presente; datos recientes muestran que los puntos de recombinación en el MHC se acompañan de conversión génica parcial, producida por reparación de intervalos, con eventual extinción de estos puntos de recombinación (85). El nivel de LD entre un determinado par de marcadores, depende principalmente de factores moleculares y genéticos de la población en estudio. A nivel molecular, el entrecruzamiento, conversión génica y mutaciones recurrentes, pueden reducir el LD. Por otro lado, los factores genéticos de la población se ven afectados por el tamaño de la misma, efecto de cuello de botella, mezcla poblacional, deriva génica y selección (positiva o negativa) pueden tener efectos complejos.

Para estudiar el LD se han utilizado microsatélites como marcadores genéticos, pero más recientemente las investigaciones se han enfocado en el empleo de los llamados SNPs (por sus siglas en inglés *single-nucleotide polymorphisms*), debido a su dinámica mutacional simplista y su elevada prevalencia en el genoma humano. El LD entre microsatélites se extiende en grandes distancias génicas que abarcan desde 1 hasta 4 Mb y puede variar entre distintas poblaciones. Estas asociaciones a 'larga distancia' no se observan, salvo raras excepciones, entre SNPs como marcadores. Estas diferencias

probablemente reflejan las dinámicas mutacionales de los dos tipos de marcadores, los microsatélites son multialélicos, mutan frecuentemente y entonces portan o acarrean alelos 'jóvenes', en tanto que los SNPs son bialélicos con alelos relativamente 'antiguos' (85).

Las características globales del LD entre genes de clase I y II, han sido estudiadas por más de 30 años (86, 87) y el término 'haplotipo ancestral' fue acuñado para describir haplotipos conservados de poblaciones específicas. Estos comprenden intervalos de LD consistentemente elevados denominados 'bloques congelados' que fueron arrastrados en una evolución reciente (84). Una explicación adicional, quizás histórica, postula que las poblaciones humanas han crecido a partir de un número reducido de familias en los últimos miles de años, y aun no ha ocurrido el tiempo suficiente para que se produzca una combinación en equilibrio apropiado (3).

Asociación HLA y enfermedad

Los genes del sistema inmunológico son fundamentales en la resistencia a infección lo que ha sido confirmado por diversos métodos en más de 80 inmunodeficiencias primarias, en donde alteraciones en diferentes propiedades del sistema inmunológico, como transcripción, traducción, fenotipo en la superficie celular, o fagocitosis resultan en vulnerabilidad ante la infección (88). Frecuentemente estas alteraciones provocan susceptibilidad a un espectro muy preciso de microorganismos, tal es el caso de la infección por micobacterias en individuos con mutaciones en la vía del interferón (89).

Para muchos genes relacionados a funciones inmunológicas, ha sido difícil demostrar una asociación directa con la resistencia o susceptibilidad a enfermedad. Gran cantidad de moléculas de clase I y II se asocian a diversas enfermedades autoinmunes, pero resulta difícil esclarecer que enfermedades infecciosas condujeron al desarrollo de estas susceptibilidades. Una posible explicación es que los padecimientos que originaron el extremo polimorfismo del MHC en humanos están extintos (90). Actualmente existen algunos ejemplos de alelos individuales del MHC asociados con resistencia o susceptibilidad a enfermedades infecciosas, como son HLA-B*27 y -B*57 y lenta progresión en SIDA, pero en la mayoría de los casos es difícil mostrar una asociación concluyente, debido a que el alelo que inicialmente provee resistencia, eventualmente predomina (91). En el modelo de selección dependiente de frecuencia, es probable que un alelo común de MHC se transforme en un alelo de susceptibilidad,

como consecuencia de la variación en la secuencia génica de los patógenos, que éstos llevan a cabo como un mecanismo de escape ante la respuesta inmunológica. De esta manera el modelo de selección dependiente de frecuencia ha sido propuesto para explicar la asociación que existe entre malaria y algunos *loci* HLA-B en diferentes partes de África; en países del Oeste, como Sudan y Kenia, el alelo HLA-B*5301, derivado de B*3501 por un evento de conversión génica, confiere cierta protección contra la malaria, en tanto que en Este africano (Gambia) el parásito de la malaria se ha adaptado, provocando que B*5301 no sea un alelo protector (92, 93).

El MHC esta asociado con más enfermedades que cualquier otra región del genoma humano y la mayor parte de las asociaciones son con enfermedades de tipo autoinmune (94). Estos padecimientos son comunes en países desarrollados, en donde afectan al 4% de la población; su etiología es compleja (por ejemplo: poligénica y no Mendeliana) e involucra factores genéticos, epigenéticos y ambientales. Estudios realizados en gemelos idénticos han sugerido que los factores genéticos pueden influir de un 50 a 90%, lo que deja de 10 a 50% atribuible a factores no genéticos y epigenéticos como alteraciones en la metilación del DNA (70, 95).

La susceptibilidad para algunas enfermedades no autoinmunes también se relaciona con el MHC; estas asociaciones van desde el cáncer hasta la narcolepsia. Es importante señalar que los alelos de “susceptibilidad a enfermedad” son comunes en individuos normales no afectados (sanos), lo cual es consistente con la noción de que la autoinmunidad es influenciada por la contribución de múltiples factores que pueden incluir otros genes y el efecto de factores ambientales. En ningún caso se puede argumentar que un alelo particular de HLA es suficiente para causar determinada enfermedad.

En algunos modelos, como HLA-B27 y espondilitis anquilosante, aunque el 95% de los pacientes con esta enfermedad expresan el alelo HLA-B27, sólo el 3% de la población Caucásica portadora de este alelo desarrolla la enfermedad. Una condición similar se presenta con narcolepsia y HLA-DQB1*0602, en donde este alelo se presenta en la mayoría de los pacientes y resulta un útil indicador diagnóstico, pero la frecuencia de este alelo en la población normal no afectada alcanza el 25%, haciendo difícil su interpretación como un indicador específico de la patología (3).

La hemocromatosis es una de las pocas enfermedades cuyo origen ha sido resuelto gracias a su relación con el MHC. Después de intensas búsquedas en la vecindad del

locus HLA-A (de hecho HLA-A3, se manejó como un indicador temprano de la enfermedad) se logró la identificación del *locus* HLA-HFE, >3 Mb telomérico a HLA-A, primero por estudios de clonación posicional y después por análisis funcional. El gen Hfe está relacionado con la familia de moléculas HLA clase I, con 55% de identidad con HLA-A3, identificándose dos mutaciones sin sentido, Cys282Tyr y His63Asp, que se presentan en la mayoría de los pacientes con la forma hereditaria de la patología. En esta enfermedad el fuerte desequilibrio de enlace fue crucial para la identificación del gen causal (96).

El establecimiento de una correlación directa entre una enfermedad y un determinado gen MHC es particularmente difícil por dos factores principales; casi todas las enfermedades asociadas a HLA son multifactoriales y, aun cuando se haya establecido una relación con HLA, los hallazgos pueden resultar ambiguos o contradictorios en diferentes poblaciones. A pesar de estos problemas, se han realizado notables avances en investigación de este tipo. Por ejemplo, una mutación en el promotor del gen BDR2 ha sido asociada con una forma común de epilepsia idiopática generalizada, y epilepsia mioclónica juvenil (97). Por otro lado, se han encontrado asociaciones que involucran la estructura tridimensional de las proteínas; un ejemplo lo constituye HLA-DQA1*0102/DQB1*0602, en el cual el volumen del *pocket* P4 de la región de la grieta, se asocia a la susceptibilidad a la narcolepsia; en contraste el volumen de P6 y la especificidad de P9, se encuentran asociados a la protección contra diabetes tipo 1 que el alelo DQB1*0602 confiere (98). En el caso de la espondilitis anquilosante, la asociación se establece con el alelo HLA-B*2705, el cual puede presentar un péptido propio en dos conformaciones estructurales extremadamente diferentes, mientras que el alelo HLA-B*2709, que no se encuentra asociado con la enfermedad, difiere en sólo un aminoácido con B*2705. Individuos con este último alelo generan repertorios de células T especializadas contra péptidos propios, enlazando de esta manera un polimorfismo genético con la presentación de péptidos, la selección de células T y el desarrollo de espondilitis anquilosante (99).

Se han propuesto varias hipótesis que pretenden explicar los mecanismos de asociación entre los alelos del MHC y el establecimiento de la susceptibilidad a enfermedades; los de mayor relevancia de acuerdo a las evidencias que los sustentan son:

Mimetismo molecular: En ciertos casos, proteínas de agentes infecciosos comparten algunas secuencias con proteínas del huésped. En condiciones normales, estas proteínas no inducirían una respuesta inmune por tres posibles razones; 1) inducen tolerancia inmunológica, 2) son “ignorados” por los linfocitos T, ó 3) son determinantes críticos que solo bajo circunstancias especiales son procesados y asociados a moléculas de HLA. En este último caso, el equilibrio es frágil y la presentación de estos péptidos desencadenará una respuesta de tipo autoinmune contra los tejidos que expresen la proteína de secuencia compartida con la del agente infeccioso (100, 101). Son varios los ejemplos en los cuales proteínas de agentes externos comparten secuencias parciales de aminoácidos con proteínas de las moléculas de HLA, tal es el caso de la “identidad parcial” existente entre la nitrogenasa de la *Klebsiella pneumoniae* y HLA-B27, que comparten los aminoácidos *Gln-Thr-Asp-Arg-Glu-Asp*. Por otra parte se ha descrito la existencia de bacterias entéricas como *Salmonella species*, *Yersinia enterocolítica*, *Shigella flexneri*, *Campylobacter fetus jejuni*, *Clostridium difficile* y no entéricas como *Chlamydia trachomatis*, y *Yersinia pseudotuberculosis*, que son capaces de disparar una respuesta de tipo autoinmune. (102, 103).

Antígeno HLA como receptor: Ciertos antígenos HLA pueden actuar como receptores específicos para agentes infecciosos y este evento se puede relacionar directamente con el desarrollo de enfermedad. Esta hipótesis se apoya en la identificación de virus que utilizan a las moléculas de HLA como receptores específicos para su ingreso en la célula; ejemplos de esta situación lo constituyen el virus del bosque de Semliki y el adenovirus tipo 2 que se unen a moléculas de clase I (104).

Gen en desequilibrio con HLA: El desequilibrio de enlace podría conferir a una especie ventajas selectivas desde el punto de vista evolutivo. En el MHC existen varios alelos que se encuentran en desequilibrio de enlace, particularmente en ciertas poblaciones. Al considerar la asociación HLA y enfermedad es necesario tomar en cuenta al desequilibrio de enlace, lo cual dificulta la identificación precisa del alelo asociado. De hecho podría inclusive presuponerse que los genes del HLA no son responsables en realidad de la enfermedad, si no que únicamente están indicando la presencia de otro gen (conocido o no), en desequilibrio de enlace con el alelo asociado. Un ejemplo de lo anterior es la hiperplasia adrenal congénita que se asocia a HLA-B47. En este caso el gen mutado es el de la 21-hidroxilasa de la vía de biosíntesis de

esteroides, que se codifica en la región clase III y cuya mutación segrega con HLA-B47 por desequilibrio de enlace (81, 105).

La presencia de genes de susceptibilidad se puede estudiar básicamente de dos maneras: en enfermedad familiar (principalmente estudios de segregación) y en población abierta (estudios de asociación). Una de las herramientas más útiles para establecer la posible relación entre un determinado marcador genético y una enfermedad es el estudio de genes candidatos, comparando las frecuencias alélicas o genotípicas de los casos clínicos contra sujetos control. Los genes candidatos son seleccionados basándose en su función y probable relevancia en la enfermedad de interés, así como la existencia de una o más variantes genéticas (106).

Cuadro 3. Principales enfermedades autoinmunes y alelos HLA asociados

Enfermedad	Alelo HLA asociado
Artritis crónica (peruanos)	DRB1*04, DRB1*1501
Artritis reumatoide (caucásicos)	DRB1*0404, DRB1*0101, DRB1*0401
Artritis reumatoide (indios americanos)	DRB1*1402
Artritis reumatoide (japoneses)	DRB1*0405
Artritis reumatoide juvenil periarticular	DRB1*0801, DRB1*11
Cardiomiopatía tardía familiar	DRB1*04
Dermatomiositis juvenil	DQA1*0501
Enfermedad celíaca	DQB1*0201, DQB1*0302
Enfermedad de Adison	DRB1*0404
Enfermedad de Graves	DRB1*0301
Escleroderma	DRB1*11
Esclerosis múltiple	DRB1*04, DRB1*1501
Esclerosis múltiple (en Sicilia)	DRB1*04, DRB1*03
Hepatitis autoinmune (argentinos)	DRB1*1302
Hepatitis autoinmune (caucásicos)	DRB1*0301, DRB1*0401
Hipotiroidismo autoinmune	DRB1*0301
IDDM (caucásicos)	DRB1*0302, DRB1*0201
IDDM (japoneses)	DRB1*0405-DQB1*0401, DRB1*0901-DQB1*0303
Miastenia Gravis	DRB1*0301
Miastenia Gravis de Lambert-Eaton	DRB1*0301-DQB1*0201
Pemphigus foliáceo	DRB1*0404, DRB1*14
Pemphigus vulgaris	DRB1*0402
Pemphigus vulgaris (asiáticos)	DRB1*14-DQB1*0503
Síndrome autoinmune a la insulina	DRB1*0406
Síndrome crónico del Berilio	DPB1*0201
Síndrome de Goodpasture	DRB1*15
Síndrome de Sjögren	DRB1*0301-DQB1*0201

La mayoría de los datos de susceptibilidad relacionada a HLA, provienen de estudios de asociación que describen la tendencia de dos marcadores (o genes) para ser heredados de manera conjunta, uno de los marcadores es el responsable del fenotipo de la enfermedad y el otro segrega por encontrarse ligado de manera física al primero (107). En el cuadro 3, se pueden encontrar las principales enfermedades autoinmunes y alelos HLA asociados (108).

FIBROSIS PULMONAR IDIOPÁTICA

Antecedentes

Con el término neumopatías intersticiales difusas (NID) se agrupa un conjunto heterogéneo de enfermedades pulmonares subagudas y crónicas que se caracterizan por comprometer difusamente al parénquima pulmonar, afectando al compartimiento intersticial y espacios alveolares. Las NID pueden ser de etiología conocida o desconocida. Entre las primeras destacan las enfermedades relacionadas con exposiciones ambientales y ocupacionales (neumoconiosis, neumonitis por hipersensibilidad), por ingestión de diversos medicamentos o asociada a enfermedades colágeno-vasculares, entre otras. Las neumonías intersticiales idiopáticas, forman parte de las NID y comprenden una variedad de entidades clínico-patológicas que comparten muchos rasgos clínicos y funcionales pero que a su vez presentan las suficientes diferencias entre sí, en especial histológicamente, para designarlas como enfermedades independientes (109).

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la NID más frecuente y se caracteriza por ser crónica, inexorablemente progresiva, incapacitante, y usualmente letal en un plazo relativamente breve; de hecho, aproximadamente la mitad de los pacientes fallecen entre 2 a 3 años después del diagnóstico (110, 111).

La FPI tiene una prevalencia estimada de 3 a 20 casos por 100,000 individuos, no muestra predilección racial, ocurre generalmente en mayores de 50 años y es más frecuente en sujetos del género masculino y fumadores (112-114).

Patogenia

Como se mencionó previamente, la FPI es la más común de las neumonías intersticiales idiopáticas y de hecho, la más agresiva de todas las enfermedades pulmonares intersticiales difusas.

Durante muchos años se consideró que la persistencia de células inflamatorias en el intersticio y los espacios alveolares (alveolitis) era la responsable del proceso fibrótico. Sin embargo, la terapia diseñada (y utilizada durante los últimos 50 años) para abatir el componente inflamatorio (corticoesteroides, medicamentos inmunosupresores/citotóxicos) no ha mostrado ningún beneficio (115). Recientemente se ha sugerido que la inflamación no desempeña un papel importante en la patogenia de la FPI, la cual representa más bien una enfermedad "epitelial-fibroblástica". (116-118).

En este contexto, numerosos estudios han señalado que las células epiteliales alveolares dañadas/activadas, expresan una variedad de citocinas y factores de crecimiento involucrados en la migración, proliferación y cambio de fenotipo de fibroblastos, así como en la remodelación de la matriz extracelular. Por medio de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* se ha demostrado que las células del epitelio alveolar son el principal sitio de síntesis del factor de crecimiento derivado de plaquetas, del factor de crecimiento transformante beta, del factor de necrosis tumoral, del factor de crecimiento de tejido conjuntivo de la endotelina-1 y la osteopontina, moléculas clave en el desarrollo de la fibrosis pulmonar.

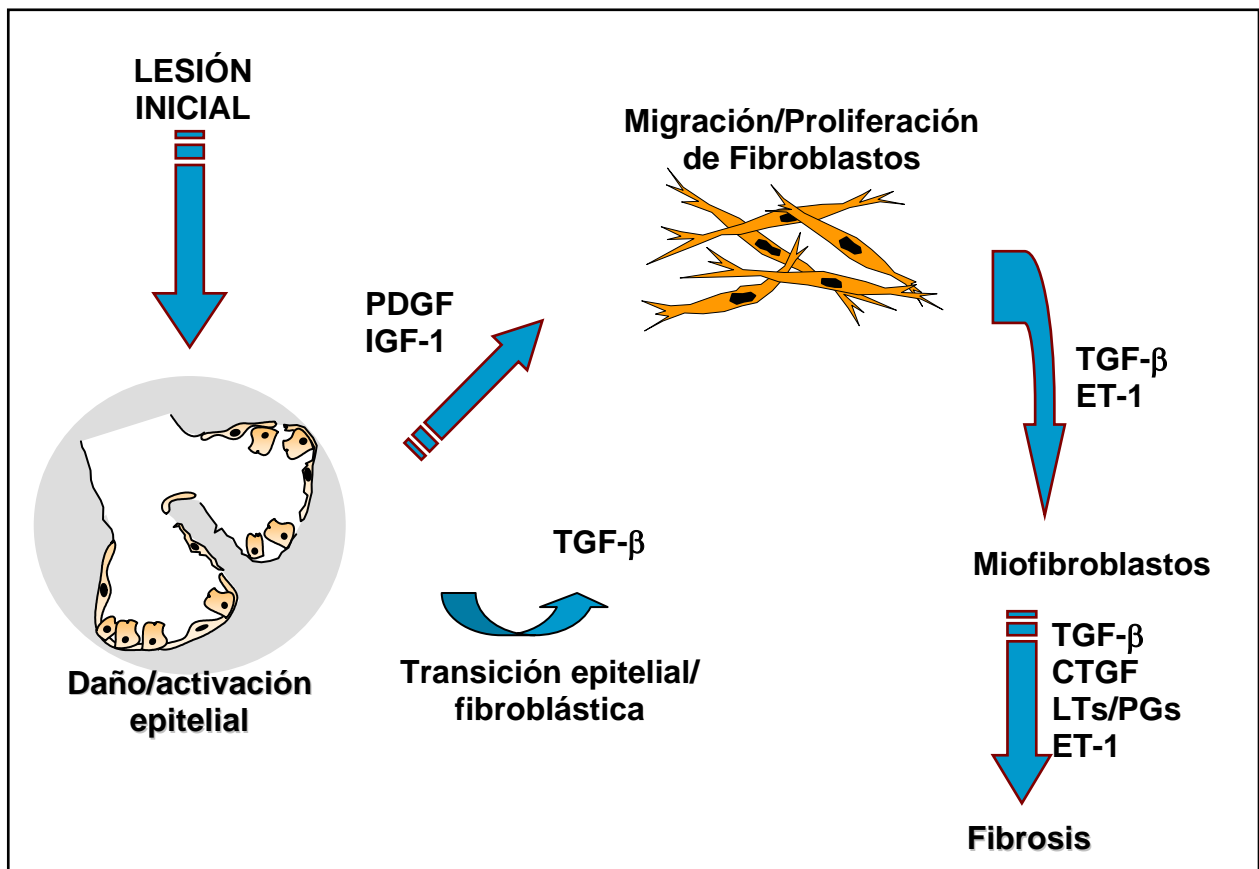


Figura 6. Representación esquemática de la patogénesis en FPI. Una lesión inicial, conduce a la activación epitelial, provocando la expresión de distintos tipos de citocinas y factores de crecimiento, generando un microambiente alveolar procoagulante que facilita la respuesta fibrosante.

Además, recientemente se ha descrito que el epitelio alveolar contribuye a la generación de un patrón de citocinas similar a Th2 en el microambiente pulmonar. Asimismo, existen datos de que las células epiteliales alveolares activadas, en pulmones con FPI, sintetizan el factor tisular y el activador del inhibidor del plasminógeno-1 los cuales pueden generar un ambiente intraalveolar procoagulante

que facilita un aumento en la respuesta fibrosante, como se ilustra en la figura 6 (116-119).

Finalmente, datos recientes sugieren de manera consistente que existe un profundo desarreglo en el proceso de reepitelización de los pulmones de los pacientes con FPI. Este proceso patológico, junto con alteraciones en la membrana basal epitelial, facilita la migración de fibroblastos dentro del espacio alveolar con la consecuente acumulación de matriz extracelular intraalveolar.

Dentro de este marco podemos resumir que existen al menos dos vías diferentes para el desarrollo de fibrosis pulmonar:

- 1) La vía inflamatoria que participa en las NID asociadas al uso de diferentes medicamentos, exposición a agentes ocupacionales, ambientales y enfermedades autoinmunes entre otras. En estos padecimientos se puede identificar claramente una fase inicial de inflamación que puede ser seguida de una fase tardía de fibrosis.
- 2) La vía epitelial/fibroblástica la cual participa en la patogenia de la FPI. De acuerdo con este paradigma, la lesión y activación epitelial puede orquestar una respuesta fibrótica sin participación de la inflamación.

En este contexto, aunque la secuencia de mecanismos patogénicos es desconocida, se ha postulado que la enfermedad se caracteriza inicialmente por daño y activación del epitelio alveolar, el cual es seguido por formación de focos subepiteliales de fibroblastos/miofibroblastos y excesiva acumulación de matriz extracelular. Este proceso patológico usualmente conduce a la destrucción irreversible de la arquitectura pulmonar, lo que resulta en insuficiencia respiratoria progresiva y de desenlace letal.

Susceptibilidad genética y respuesta fibrosante pulmonar

Diversas observaciones clínicas y experimentales sugieren la existencia de una susceptibilidad genética para desarrollar fibrosis pulmonar (120, 121). Así, en los casos de fibrosis de etiología conocida, la enfermedad se manifiesta solamente en un pequeño subgrupo de individuos, mientras que la mayoría de los sujetos expuestos al mismo agente agresor permanecen sanos. Por ejemplo, de 100 pacientes que son tratados con dosis similares del agente antiarrítmico amiodarona, sólo 5 desarrollan una

neumopatía intersticial difusa, lo que sugiere un patrón genético que determina niveles de susceptibilidad y resistencia (122).

Asimismo, diversos estudios experimentales han demostrado que existen cepas de ratones susceptibles y cepas resistentes al desarrollo de fibrosis pulmonar inducida con bleomicina, asbesto, gamaglobulina bovina o radiaciones de acuerdo a los antecedentes genéticos de la cepa de ratones así como al haplotipo del complejo principal de histocompatibilidad (H2) cuando se trata de ratones singénicos (123-127). Estos hallazgos sugieren que el complejo principal de histocompatibilidad puede ser importante en determinar la susceptibilidad a desarrollar este tipo de padecimientos.

Susceptibilidad genética y fibrosis pulmonar idiopática

Se ha sugerido que complejas interacciones entre genes (desconocidos) y factores ambientales (también desconocidos) participan en la patogenia de la FPI.

Fibrosis pulmonar idiopática familiar

Una de las evidencias más convincentes de que la presencia de factores genéticos desempeña un papel en el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática, es la existencia de FPI familiar (128, 129). Esta se define como la presencia de al menos dos parientes relacionados en primer grado, con una enfermedad respiratoria con características clínicas de una NID y con fibrosis pulmonar idiopática confirmada por biopsia o autopsia. En los ejemplos más notables se han encontrado pacientes con FPI en 3 o 4 generaciones sucesivas de una familia, aunque en la mayoría de los casos el problema involucra sólo a pares de hermanos. Observaciones adicionales en favor de factores genéticos se encuentran en los reportes de gemelos idénticos que desarrollaron FPI aún cuando estuvieron separados por 25 años antes de morir (130).

Aunque el modo de transmisión genética en los casos de FPI familiar no ha podido ser precisado, se ha sugerido que puede ser autosómica dominante con penetrancia variable (131, 132). En términos generales, la FPI familiar parece contribuir con alrededor del 3% de las fibrosis pulmonares idiopáticas que se diagnostican. La excepción la constituye el estudio de Uchiyama y colaboradores (132) quienes de manera retrospectiva encontraron la enfermedad en 14 de 37 familias, cifra que parece reflejar factores étnicos peculiares de la población estudiada. Investigaciones de análisis de unión y FPI familiar se han limitado a un estudio en el cual se encontró que

los 6 sujetos afectados de una familia de 12 miembros compartían el haplotipo de inmunoglobulinas Gm1 (133).

Polimorfismos genéticos y fibrosis pulmonar idiopática esporádica

Más del 95% de los pacientes con FPI presentan la forma esporádica (no familiar). En fechas recientes se han realizado estudios en diferentes poblaciones tratando de identificar polimorfismos genéticos asociados a esta enfermedad, los cuales muestran en general asociaciones débiles o ausencia de relación (134-139). En nuestro Instituto hemos encontrado recientemente que algunos polimorfismos de los genes de las proteínas A y B del surfactante pulmonar, un complejo de lipoproteínas involucradas en funciones de regulación de la inflamación pulmonar, se localizan con mayor frecuencia en los pacientes con FPI (134).

En algunos casos, un determinado polimorfismo no se ha asociado con el desarrollo de la enfermedad, sino con su comportamiento clínico (136, 138). Por ejemplo, recientemente se observó que los polimorfismos en el codón 10 y 25 del gen de TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*) no se encuentran con mayor frecuencia en los enfermos con FPI en comparación con controles, pero se asocian con peor evolución clínica (136).

De manera interesante, las investigaciones relacionadas con el extraordinariamente polimórfico complejo principal de histocompatibilidad, son escasas, antiguas y con resultados contradictorios. Así, mientras una incidencia elevada de los alelos HLA-B15, -B8, -B12 y -DR2 fue reportada en algunos estudios, en otros este hallazgo no pudo ser confirmado (140-143). Asimismo, en estas investigaciones se utilizaron técnicas serológicas, que actualmente han sido superadas por métodos moleculares que definen con mayor detalle cada alelo debido a que aprovechan las ventajas de la reacción en cadena de la polimerasa.

APOPTOSIS

La apoptosis es un tipo de muerte celular que implica la activación de mecanismos específicos que conducen a la muerte de células. Aunque puede parecer a primera vista paradójica la existencia de este tipo de mecanismos, el fenómeno de apoptosis o “muerte celular programada” es más común de lo que pudiera pensarse. Se produce apoptosis de modo natural durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano en múltiples tejidos, cuya función es eliminar células superfluas en un lugar determinado: por ejemplo, la eliminación de un exceso de neuronas para inervar un músculo o la eliminación de linfocitos autorreactivos que reconocen antígenos propios. Durante el ciclo celular también se lleva a cabo la apoptosis, cuando el DNA que va a ser replicado presenta aberraciones, como uniones incorrectas entre bases o estructuras anómalas inducidas por agentes químicos, rupturas, etc. La muerte celular apoptótica tiene dos fases: en la primera o fase de determinación las células reaccionan ante un estímulo (o ante su ausencia) decidiendo iniciar el proceso de muerte; en la segunda, o fase de ejecución, las células sufren una serie de alteraciones estructurales que se acompañan y son debidas a la activación de enzimas proteasas y nucleasas. En la fase de ejecución comienza la acción de una familia de proteasas relacionadas con la ICE (por las siglas en inglés de *Interleukin-1 β Converting Enzyme*) que tienen actividad de cisteín-proteasas (144, 145).

La apoptosis puede ser inducida por varios mecanismos, pero uno de los que ha sido particularmente definido es la interacción de la molécula receptora Fas con su ligando, la molécula Fas ligando. Fas es un miembro de la familia de receptores del TNF y Fas ligando es un homólogo estructural de la citocina TNF. Las proteínas de estas familias receptor-ligando controlan la elección entre la proliferación celular y la muerte por apoptosis. El ligando de Fas se expresa principalmente en células T activadas, por lo que esta vía de muerte celular inducida por activación es usada con frecuencia por los linfocitos T. Tanto Fas como su ligando son inducidos normalmente durante el curso de una respuesta inmunitaria adaptativa. TNF y su receptor TNFR-1 (*TNF receptor-1*) pueden actuar de una manera similar a como lo hacen Fas y su ligando, pero sus acciones son menos significativas (146, 147).

Todas las vías que inducen apoptosis provocan la activación de una serie de cisteín-proteasas que cortan las cadenas proteicas tras residuos de ácido aspártico y que

reciben el nombre de caspasas (por su acrónimo en inglés: *cysteiny*, *aspartate-specific proteases*) (148).

Los primeros estudios relacionados con apoptosis fueron realizados en células del compartimiento hematopoyético, actualmente las investigaciones en el tema incluyen al sistema nervioso y células epiteliales de diversos órganos (149). Son dos las vías en las que se agrupan la serie de eventos que culminan en la activación de las caspasas: la vía extrínseca y la intrínseca (150).

En el caso de la vía extrínseca, la apoptosis se inicia por estimulación de los receptores Fas o TNFR-1. Los ligandos para estos receptores están en forma de trímeros y al unirse inducen la trimerización de los receptores. Las colas citoplasmáticas de estos receptores comparten un motivo conocido como dominio de muerte. Las proteínas adaptadoras que interactúan con los dominios de muerte de Fas y TNFR-1 se llaman FADD (*Fas associated death domain protein*) y TRADD (*TNFR associated death domain protein*) respectivamente (148). Estos interactúan a través de una región diferente con la proteína caspasa-8, cuyo dominio carboxilo terminal es una pro-caspasa (forma inactiva de una caspasa). La unión inicia la actividad enzimática de la caspasa-8, y así conduce a una cascada de proteasas en la cual las caspasas activadas cortan y activan una sucesión de caspasas inferiores en la cascada. Al final de esta vía una DNasa activada por caspasas entra en el núcleo y corta el DNA para producir los fragmentos característicos de una célula apoptótica (146, 148).

La vía intrínseca se caracteriza por la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, con la consecuente liberación de varios factores pro-apoptóticos al citoplasma. Estos factores incluyen al citocromo c, Smac/DIABLO Smac (*second mitochondria-derived activator of caspase*), también conocido como DIABLO (*direct IAP-binding protein with low pI*) AIF (*Apoptosis-inducing factor*), y endonucleasa G (150). La liberación de estos mediadores está regulada por la familia de proteínas Bcl-2. Una vez liberado el citocromo c se une a una proteína adaptadora (Apaf-1), la cual se polimeriza a sí misma y recluta a la pro-caspasa 9, para formar el complejo denominado apoptosoma. Este evento promueve el autoprocésamiento de caspasa-9, la cual recluta y libera a la pro-caspasa-3, que degrada diferentes sustratos hasta activar las DNasas (150, 151).

Los cortes de DNA tienen lugar en los segmentos que conectan los nucleosomas y como consecuencia se producen fragmentos de DNA que tienen una longitud de

aproximadamente 180 pares de bases o múltiplos de esta cifra. Cuando se extrae DNA que esta siendo degradado en células en proceso de apoptosis se detectan estos fragmentos que forman una escalera típica de la apoptosis. En ocasiones tiene lugar la ruptura del núcleo en trozos así como el aumento de las vesículas membranosas en el citoplasma con preservación de organelos hasta la fase final. También a diferencia de la necrosis, la membrana celular no estalla, sino que se forman los llamados cuerpos apoptóticos, constituidos por trozos de citoplasma rodeados de membrana, que son englobados y digeridos por otras células tipo macrófagos o similares, sin que se produzca liberación de material celular al medio y por tanto, sin reacción inflamatoria (145, 152, 153).

CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz. Una de las características más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño forma, complejidad y por supuesto cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo. Las aplicaciones más relevantes de la citometría de flujo en la práctica médica se relacionan con hematología e inmunología clínicas, midiendo parámetros como número y clasificación de células sanguíneas. En los últimos 20 años, el análisis de enfermedades pulmonares de origen inmunológico por citometría de flujo ha jugado un papel importante en el entendimiento y diagnóstico de enfermedades como sarcoidosis, neumonía eosinofílica o neumonitis por hipersensibilidad (154).

Aunque desde el punto de vista cronológico, la citometría de flujo es una tecnología reciente, sus características especiales como técnica de análisis celular han hecho que su uso se haya extendido de forma rápida desde los laboratorios de investigación básica hasta los laboratorios clínicos (155).

La conjugación de marcadores fluorescentes con anticuerpos monoclonales y policlonales ha hecho posibles los estudios de la densidad y la distribución de determinantes y receptores de la superficie y del citoplasma celular, permitiendo de esta manera identificar subpoblaciones celulares (156).

El principio en el que se basa esta tecnología es simple: hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y de una en una por un haz luminoso. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de la luz por parte de los fluorocromos presentes en la célula o partícula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora (157).

Inmunofluorescencia

El término inmunofluorescencia se utiliza para describir las técnicas en que se emplea un fluorocromo para marcar un anticuerpo, el descubrimiento de los anticuerpos

monoclonales por Kohler y Milstein en 1975 (158), incrementó el uso de la inmunofluorescencia para la identificación de antígenos de superficie celular.

Cuando una molécula absorbe luz y por tanto energía, algunos de sus electrones pueden alcanzar una orbita de mayor energía. Se dice entonces que la molécula ha alcanzado un estado de excitación y puede volver a su estado basal cuando estos electrones vuelven a su orbita de menor energía, emitiendo un cuanto de luz o fotón y desprendiendo energía, esta transición radiante se denomina fluorescencia y a este tipo de compuestos se les denomina fluorescentes o fluorocromos (159).

La citometría de flujo permite medir diferentes parámetros de una célula, en general se pueden dividir en parámetros nucleares, citoplásmicos, de superficie y extracelulares. Un aspecto importante y que representa una ventaja de esta técnica, es la posibilidad de medir tantos parámetros, como anticuerpos se dispongan para ello, marcados con distintos fluorocromos (154).

La citometría de flujo ha sido utilizada en el monitoreo del contenido de DNA (160), expresión fenotípica, transporte de drogas, flujo de calcio, proliferación y apoptosis (161). Virtualmente es posible marcar cualquier molécula que sea de interés siempre que se disponga de un anticuerpo acoplado a un fluorocromo que pueda ser detectado por el citómetro de flujo.

Citometría de flujo y enfermedad pulmonar

Una de las aplicaciones más recientes e interesantes de esta tecnología, es la evaluación de pacientes con enfermedades inmunológicas del pulmón (162). Una muestra típica es aquella que es recolectada a partir de lavados bronquioalveolares (LBA), cuya utilidad diagnostica ha quedado ampliamente demostrada (163-168). Cuando el lavado es realizado en pulmones normales, la célula presenta mas predominante es el macrófago, el cual esta en un porcentaje de aproximadamente 90% o mas de celularidad. Los linfocitos usualmente representan menos del 10% de la población celular, los granulocitos representan la población celular minoritaria con el 1-2% (169). En fumadores, el porcentaje es aún menor (170). En muchos pacientes con enfermedades pulmonares inmunológicas, el LBA puede estar acompañado por un incremento en linfocitos o eosinófilos. Cuando las células que están incrementadas son los linfocitos resulta importante saber cual subpoblación se encuentra elevada. La citometría de flujo es ideal para esta evaluación. La proporción relativa de linfocitos,

macrófagos y granulocitos se determina fácilmente a partir de graficas de tamaño (Forward Scatter FSC) contra complejidad celular (Side Scatter SSC). Los estudios de fluorescencia empleando diferentes fluorocromos permiten determinar fácilmente la composición de subconjuntos de linfocitos (CD4, CD8). De esta manera, es posible ensayar hasta 7 colores con citómetros modernos, que representan 7 marcadores diferentes sobre poblaciones celulares, requiriéndose solo una pequeña cantidad de muestra (250,000 células en 50 μ L) a partir de un LBA.

Por ejemplo, un incremento en el número de células inflamatorias en un LBA sugiere una alveolitis (171). El tipo de células en lavado puede correlacionar con el tipo de inflamación visto en las paredes alveolares de la biopsia aunque estas correlaciones no son diagnósticas, pueden ayudar en el diagnostico cuando son combinadas con otros datos clínicos.

Actualmente están en proceso protocolos de investigación en el INER que contemplan la determinación de un amplio perfil fenotípico que proporciona información fundamental sobre el estado celular de la neumonitis por hipersensibilidad inducida por antígeno aviario, la de mayor incidencia en México, en sus diversas etapas clínicas, así como la fibrosis pulmonar idiopática.

El citómetro de flujo que ha revolucionado la era moderna de la citometría es el FACSAria de Beckton Dickinson, se trata de un separador de alta velocidad y desempeño, capaz de medir hasta 11 parámetros de manera simultanea. Este instrumento cuenta con la alineación automática del láser y una nueva plataforma de análisis en sistema Windows. Cuenta con un sistema de limpieza automático entre muestras. Gracias a su sistema totalmente digital es capaz de adquirir 70,000 eventos (células o partículas) por segundo y es posible separar 25,000 células con una pureza al menos del 98%.

Las aplicaciones en investigación básica del FACSAria son innumerables, van desde la caracterización fenotípica de 7 colores hasta análisis de parámetros intracelulares, análisis de cromosomas, organelos celulares, apoptosis, estudios funcionales, así como separación celular altamente especifica con fines de clonación.

CONSIDERACIONES ESTADÍSTICAS EN LOS ESTUDIOS DE HLA Y ASOCIACIÓN CON ENFERMEDAD

Desde que en 1967 J. L. Amiel reportó por primera vez una asociación entre el linfoma de Hodgkin y la región de genes de las moléculas HLA de clase I (172), ha surgido una fuerte y creciente relación entre los genes de esta región y la susceptibilidad a enfermedades. Hoy en día es claro el papel de los genes HLA en la regulación de la respuesta inmunológica y su responsabilidad, en cierta medida en la etiología de diferentes patologías, principalmente aquellas de origen autoinmune e infeccioso, muchas de éstas condiciones actualmente se sabe están asociadas con ciertos alelos HLA en particular (173). La mayoría de estas asociaciones han sido identificadas a través de estudios de casos contra controles (174).

Definiciones básicas

Los términos **asociación** y **enlace** son frecuentemente confundidos y utilizados de manera inapropiada. El enlace clásico intenta demostrar que un locus o región cromosómica cosegrega con una enfermedad o un fenotipo en particular. El patrón de herencia de marcadores genéticos polimórficos puede ser rastreado a través de familias que incluyen múltiples casos de la enfermedad, un ejemplo de enlace es la corea de Huntington (175).

En contraste, la asociación genética se refiere a la demostración de una relación estadística entre el alelo de un gen en particular y un fenotipo o enfermedad. Las bases para tales estudios, se basan en que si un alelo en particular (o un grupo de alelos) incrementa el riesgo de desarrollar la enfermedad, entonces, dicho alelo será encontrado más frecuentemente en casos que en controles. De manera similar, si un marcador polimórfico se encuentra cercano a un desequilibrio de enlace con un locus de enfermedad, entonces la distribución de los alelos del marcador diferirá entre casos y controles (174).

Diseño del estudio

Selección de controles

La apropiada selección de los controles es crucial para desarrollar un estudio de asociación eficaz. En un estudio clásico de casos contra controles, los controles deben ser seleccionados de la misma población que los casos. Pueden surgir problemas si los

casos y los controles son obtenidos de poblaciones estratificadas donde diferentes subpoblaciones han evolucionado de manera separada. En este caso, el estudio de asociación puede detectar diferencias en la distribución de los alelos que no tienen relación con la enfermedad, sino con las diferencias genéticas propias de las poblaciones en estudio (que pueden ser, regionales, étnicas o raciales). Un estudio de casos contra controles en epidemiología genética puede ser ajustado a factores tales como grupos étnicos y lugar de nacimiento, con el fin de evitar el potencial efecto de factores de confusión relacionados con la estratificación de la población (174).

Fuerza del estudio y tamaño de la muestra

Otra importante consideración en el diseño, es la fuerza del estudio. La fuerza es la probabilidad de que un estudio detecte un efecto en una muestra de un tamaño en particular. Por ejemplo, si un estudio tiene fuerza del 80% para detectar un riesgo relativo de 1.5 a padecer una enfermedad en portadores de un alelo comparados con individuos no portadores, significa que 80% de los estudios con un tamaño de muestra similar detectarían una asociación significativa similar. La fuerza de un estudio de asociación genética con un diseño estándar de casos contra controles, así como el tamaño de muestra necesario para producir una fuerza en particular pueden ser estimadas utilizando parámetros, que en algunos casos, solo se conocen de manera imprecisa (como la frecuencia del factor de riesgo en la población) o son especificados de manera arbitraria (como el riesgo relativo de interés). Además es importante interpretar los resultados del cálculo del tamaño de muestra con cierto grado de sentido común. Por ejemplo, un genotipo raro, con un efecto modesto, solo sería probable encontrarlo en un estudio extremadamente grande (174).

Métodos estadísticos

Son muchos y diversos los métodos para el análisis de datos de estudios de asociación genética. El más apropiado depende del factor (o los factores) de riesgo en investigación y del diseño del estudio.

Si el objetivo del estudio es examinar el efecto de un alelo o genotipo en particular, el mejor estudio se logra estimando este efecto a través de tablas de contingencia de 2 x 2, cálculo de χ^2 y cálculo del odds ratio (OR).

Mientras que un método diferente será necesario si lo que se requiere investigar es la asociación entre un gen polimórfico y una enfermedad (comparación de frecuencias alélicas y/o haplotípicas en dos grupos en estudio). De esta manera la distribución de los alelos en los estudios de casos contra controles puede ser comparada. La unidad de observación es cada copia de un gen, por lo que cada individuo contribuye con dos observaciones a la tabla. Los parámetros generalmente investigados son (174): frecuencia fenotípica, génica, y haplotípica.

Tablas de contingencia de 2 x 2

El estudio mas simple de tipo casos contra controles investiga la exposición binaria, donde cada individuo es expuesto o no expuesto al factor de riesgo (174).

En estudios genéticos tal exposición puede ser un fenotipo en particular (portando al menos una copia de un alelo en particular, por ejemplo DRB1*0404) o puede ser un genotipo particular (el caso de un homocigoto para DRB1*0404) (176).

En tal situación los resultados de los estudios de casos contra controles son resumidos en tablas de 2 x 2 (174,177).

	Expuestos	No expuestos	Total
Casos	a	b	M1
Controles	c	d	M2
Total	M3	M4	N

Dónde:

a = Pacientes con el alelo de interés. b = Pacientes sin el alelo de interés.

c = Controles con el alelo de interés. d = Controles sin el alelo de interés.

M1 = a + b M2 = c + d M3 = a + c M4 = b + d N = Total de sujetos

Ji cuadrada (χ^2)

La prueba de χ^2 puede ser utilizada para hipótesis y datos en donde las observaciones caen naturalmente en categorías discretas que los estadistas llaman celdas. Es usada tanto para contestar como para estimar el valor de la varianza (o desviación estándar) de una población. Esta prueba también sirve para comparar datos experimentales con resultados esperados a fin de determinar (1) preferencias, (2) independencia y (3) homogeneidad (178).

En general se utiliza cuando se quiere investigar una asociación entre dos variables categóricas con una misma población o cuando interesa investigar si en las diferentes

poblaciones estudiadas los valores o categorías de cada una de las manifestaciones se presentaran en la misma proporción. Lo anterior se fundamenta en el hecho de que si dos variables no están asociadas, la proporción de individuos en cada categoría de una de las variables no depende de las categorías de la otra, en cambio cuando están asociadas, la proporción de individuos en cada una de las categorías de una variable se modifica al cambiar las categorías de la otra variable (179).

La significancia estadística de una posible asociación HLA, es decir, que un alelo o genotipo se encuentre significativamente elevado (sugiriendo susceptibilidad asociada a HLA) o significativamente disminuido (sugiriendo protección) se calcula mediante la prueba de ji cuadrada (χ^2), utilizando la tabla de contingencia de 2 x 2 descrita con anterioridad y desarrollando la siguiente formula (177):

$$\chi^2 = \frac{(ad - cd)^2 N}{M_1 \cdot M_2 \cdot M_3 \cdot M_4}$$

Ji cuadrada (χ^2) con corrección de Yates ($\chi^2 y$)

Es importante para evaluar las compa La mayoría de los datos de susceptibilidad relacionada a HLA, provienen de estudios de asociación que describen la tendencia de dos marcadores (o genes) para ser heredados de manera conjunta, uno de los marcadores es el responsable del fenotipo de la enfermedad y el otro segrega por encontrarse ligado de manera física al primero (107). En el cuadro 3, se pueden encontrar las principales enfermedades autoinmunes y alelos HLA asociados (108).

raciones de un alelo o genotipo en dos grupos (casos y controles), sobre todo cuando el tamaño de la muestra es pequeño, pues es más estricta y por lo tanto la significancia estadística es mas real (174).

$$\chi^2 y = \frac{(ad - cd - \frac{N}{2})^2 N}{M_1 \cdot M_2 \cdot M_3 \cdot M_4}$$

En general el cálculo de χ^2 determina que tan significativa es la asociación HLA con la enfermedad. Es decir, si la probabilidad de asociación es debida al azar o bien significativa (177).

Una vez que se conoce la χ^2 se busca el valor de la probabilidad (p) en las tablas de estadística, tomando en cuenta que el número de grados de libertad es N-1. Mientras menor es el valor de la probabilidad (0.05), mayor es el significado de la asociación (177, 180,181).

El siguiente paso que es calcular el riesgo relativo de aquellos quienes están expuestos, comparados con los que no lo están (177).

Riesgo relativo

Indica cuántas veces es más frecuente la enfermedad en individuos portadores de un alelo respecto a los que carecen de él. Un riesgo relativo mayor de 1 indica que el alelo es más frecuente en los pacientes que en los controles; mientras que un riesgo relativo menor de 1 indica una asociación negativa.

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

No obstante, estas probabilidades no pueden ser estimadas en estudios de casos contra controles, por el hecho de que los sujetos han sido seleccionados en base a su categoría de enfermos (casos) (174, 177).

Odds ratio (OR)

Sin embargo en el análisis de casos contra controles es posible calcular el odds ratio, OR. El OR significa la probabilidad de que un efecto ocurra dividido entre la posibilidad de que este no ocurra. El OR se calcula de la siguiente manera.

$$OR = \frac{a / b}{c / d}$$

Este es un equivalente del ratio de la probabilidad de aquellos quienes están expuestos, entre la probabilidad de un caso de aquellos quienes no están expuestos. La importancia de esto, radica en que en las enfermedades raras, el OR es una muy buena aproximación al riesgo relativo. Por lo tanto el riesgo relativo en estudios de casos contra controles puede ser estimado por medio del cálculo del OR. Por ejemplo, un OR = 5.0, indica que una persona expuesta a un factor de riesgo, tiene 5 veces mas probabilidad de desarrollar la enfermedad que una que no lo tiene (182, 183).

Los estudios de casos contra controles que involucran al OR, en idioma español son escasos, aún así la traducción que se atribuye al odds ratio es la de razón de probabilidad o razón de momios, para efectos de esta tesis se decide conservar las siglas en inglés del parámetro en cuestión, OR.

Intervalos de confianza

La estimación del OR debe ser acompañada de ser posible por sus intervalos de confianza, los cuales dan un rango del valor de la razón de probabilidad verdadera y que ayuda a ser consistentes los datos (184, 185).

El método más simple para calcular los intervalos de confianza de un OR estimado, es el uso de la aproximación de Wolf. La varianza del logaritmo natural del OR (lnOR) puede ser calculada de la siguiente manera:

$$1/a + 1/b + 1/c + 1/d$$

Usando una aproximación de la distribución normal un intervalo de confianza del 95% para ln(OR) esta representada por:

$$\ln(OR) \pm 1.96\sqrt{(1/a + 1/b + 1/c + 1/d)}$$

Tomando el antilogaritmo de esta valor, se obtiene el intervalo de confianza de 95% para el OR (184, 185, 186).

Frecuencia fenotípica (FF)

Es la proporción de sujetos del total de un grupo que son portadores de un determinado antígeno. Cuya fórmula es:

$$FF = \frac{\text{Número de sujetos positivos a un alelo dado}}{\text{Número total de sujetos}} \quad (177)$$

Frecuencia génica (FG)

Define las proporciones de un determinado alelo en un locus, en una población establecida. Se calcula a partir de la FF, la cual se toma en números absolutos mediante la fórmula de Haldane:

$$FG = 1 - \sqrt{1 - FF} \quad (177)$$

Frecuencia haplotípica (FH)

Número de veces que coinciden dos marcadores de diferentes locus, que normalmente es proporcional al producto de las frecuencias individuales de estos marcadores. Combinaciones más frecuentes representan un desequilibrio de enlace.

$$FH = \frac{\textit{Frecuencia del haplotipo en estudio}}{\textit{Total de haplotipos presentes en el estudio}} \quad (177)$$

HIPÓTESIS

Existen factores genéticos asociados al complejo principal de histocompatibilidad en el desarrollo de FPI.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la posible existencia de una susceptibilidad genética asociada al sistema HLA Clase I y II en pacientes con FPI.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar los alelos del sistema HLA clase I, *locus* -B en pacientes y controles.
- 2) Determinar los alelos del sistema HLA clase II de las regiones -DRB1 y -DQB1 en pacientes y controles.
- 3) Evaluar el efecto del lavado bronquioalveolar obtenido de pacientes con diferentes alelos/haplotipos sobre células epiteliales de pulmón humano *in vitro*.
- 4) Definir los alelos y/o haplotipos del sistema HLA involucrados en la susceptibilidad a desarrollar FPI, así como en la velocidad de su progresión clínica.

MÉTODOS

Población en estudio:

Se estudiaron 75 sujetos mestizos mexicanos no relacionados (49 hombres y 26 mujeres; 63 ± 9.5 años) con diagnóstico de FPI. El diagnóstico se realizó de acuerdo a los parámetros recomendados por la Sociedad Americana de Tórax (187) y se confirmó mediante el análisis histológico de la biopsia pulmonar (188). Todos los pacientes incluidos en este grupo firmaron una carta de consentimiento de participación en el estudio y el protocolo fue aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Los criterios de inclusión fueron:

- ❖ Ser mestizo mexicano por abolengo. Considerados así cuando un individuo tiene al menos tres generaciones previas de residencia en el país.
- ❖ Diagnóstico confirmado de fibrosis pulmonar idiopática.
- ❖ No padecer enfermedades autoinmunes u otras (diabetes, etc) relacionadas al MHC.
- ❖ Estar de acuerdo con participar en el protocolo de investigación, y firmar una carta de consentimiento informado.

Posteriormente, y de acuerdo con los resultados obtenidos se estudió en promedio a 4 familiares por paciente para asegurar la correcta asignación de haplotipos.

Como grupo control se analizaron 95 individuos mestizo mexicanos, (48 hombres y 47 mujeres) no relacionados entre si, ni con los pacientes de FPI, clínicamente sanos, a los cuales se les realizaron los mismos estudios de biología molecular que a los pacientes.

Los pacientes fueron seguidos por lo menos 1 año y posteriormente examinados clínicamente y con pruebas de función respiratoria y tomografía computada de tórax para determinar su evolución.

Determinación de genotipos

Obtención de DNA genómico

A partir de células de sangre periférica extraídas por punción venosa, se obtuvo DNA genómico utilizando el estuche comercial *BD tract DNA isolation kit* (Maxim Biotech, San Francisco CA, USA). El DNA se cuantificó por espectrofotometría de absorción de luz ultravioleta a 260 nm de longitud de onda. La contaminación con compuestos orgánicos y proteínas se determinó al establecer la relación de las lecturas 260/240 y 260/280 respectivamente; las muestras se consideraron libres de contaminantes cuando en ambos casos la relación se encontró entre 1.7-2.0.

Tipificación molecular de los alelos HLA clase I y II

La amplificación del DNA, así como la identificación específica de los alelos pertenecientes a los *loci* HLA-B, y HLA-DQB1 se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la técnica de iniciadores secuencia específica (PCR-SSP) con el sistema de tipificación Fastype HLA-DNA SSP (Bio-synthesis Inc; Dallas TX, USA). Esta metodología ha sido acreditada y certificada por la Sociedad Americana de Histocompatibilidad e Inmunogenética.

Para la tipificación molecular del *locus* HLA-B, se utilizaron 47 pares de iniciadores que determinan las 45 principales grupo-especificidades (desde HLA-B*07 hasta HLA-B*81), en la modalidad de baja resolución.

La tipificación de HLA-DQB1 se realizó por medio de 24 pares de iniciadores de alta resolución, que permiten la identificación de 55 alelos de los grupos HLA-DQ6, HLA-DQ3, HLA-DQ4, HLA-DQ5 y HLA-DQ2.

HLA-DRB1 fue determinado en modalidad de baja resolución, la cual cubre los alelos pertenecientes a los genes DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5 en 24 reacciones independientes. Para DR4 permite discriminar los alelos conocidos hasta DRB1*0422. En el caso de DR11, cubre las especificidades pertenecientes hasta DRB1*1122, para DR13 hasta DRB1*1322, para DR14 hasta DRB1*1421 y para DR8 hasta DRB1*0811.

La discriminación específica de cada uno de estos alelos, se realizó por HLA-DRB1 en modalidad de alta resolución, en donde la subtipificación para DR3, DR4, DR11, DR13 y DR14 se realizó con un panel extra de 16 pares de iniciadores cada una. DR1, DR7, DR12, DR15 y DR16 se examinaron con un panel adicional de 8 pares de iniciadores cada una.

En todos los casos (la determinación de los tres *locus* y sus alelos), se coamplificó un fragmento de 410 pb del gen de G3PDH, como control interno de amplificación, y en el último tubo de cada serie de reacciones (por *locus* y por alelo especificidades), se incluyó una reacción libre de DNA, como control de contaminación a reacciones previas y a contaminación externa por manipulación.

En el caso del *locus* HLA-DQB1 se llevaron a cabo 24 reacciones para la identificación de los subtipos aleloespecificos y en el caso de HLA-B, se realizaron 47 reacciones diferentes.

Para la tipificación se utilizó una mezcla maestra de reacción, que en los *loci* HLA-DRB1 y HLA-DQB1 incluye 1300 ng de DNA suspendidos en 24 μ l de agua destilada, bidesionizada libre de DNAsas y RNAsas, 2.6 μ l de DNA Taq polimerasa/reactivo E (Gibco BRL, Grand Island NY, USA) en una relación 1:1, 24 μ l de solución indicadora y 198 μ l de agua. Para HLA-B, la concentración de DNA fue de 2600 ng (por tratarse de 47 reacciones independientes, en comparación con 24 de los *locus* -DRB1 y -DQB1).

El programa de ciclaje para la amplificación fue el siguiente: 94°C 20 seg., 65°C 1 min. por 10 ciclos. 94°C 20 seg., 61°C 50 seg., 72°C 30 seg. por 25 ciclos y 72 °C 5 min. usando un termociclador automatizado (GeneAmp PCR system 9700, PE Applied Biosystems. Foster City CA, USA).

La información de las secuencias y especificidades para los iniciadores de HLA-B, -DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5 y -DQB1 se obtuvieron del “12^{avo} taller internacional de histocompatibilidad”. La síntesis de oligonucleótidos se hizo utilizando la técnica de cianoetil fosforamidita en un sintetizador de DNA automatizado (Beckman, Palo Alto CA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. La nomenclatura de los alelos corresponde a la establecida por *IMGT/HLA database alignment* (189).

Las reacciones individuales de PCR, en todos los casos, se realizaron con 75 ng de DNA genómico, en una reacción de 10 μ l, que contenía 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂ y 60 μ M de cada dNTP (190, 191).

Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0.2 μ g/ml), por 40 min. (30V/cm) y las bandas amplificadas se visualizaron en transiluminador de luz UV (UVP Inc. Upland, CA, USA) para su análisis en el equipo de fotodocumentación EDAS 290 (Kodak, Rochester NY, USA) con fines de interpretación y bajo el auxilio de las hojas de tipificación provistas por el fabricante según fue el caso de cada *locus*.

Análisis Estadístico

Las diferencias entre los dos grupos en estudio fueron evaluadas mediante la determinación y comparación de las frecuencias génicas y haplotípicas encontradas partiendo de las frecuencias fenotípicas. La significancia estadística se estableció mediante el paquete estadístico Epi Info versión 6.04b, tomando en cuenta los valores de χ^2 con corrección de Yates. Los resultados se consideraron significativos cuando el valor de p fue <0.05. De igual forma se estimó la razón de momios (OR) con intervalos de confianza del 95%, con el fin de conocer la fuerza de la asociación.

Determinación de fenotipos

Lavado bronquioalveolar (LBA)

El LBA se realiza para fines de diagnóstico mediante una técnica estándar (192). Previa anestesia local, el fibrobroncoscopio se introdujo en un segmento pulmonar seleccionado de acuerdo con las lesiones observadas en la tomografía axial computada y se instilaron 300 ml de solución salina en alícuotas de 50 ml. El líquido recuperado se centrifugó a 1,300 rpm por 10 minutos a 4°C. El concentrado celular se resuspendió en 1 ml de PBS y una alícuota se utilizó para evaluar el número total de células. Otras alícuotas se fijaron en carbowax y tres laminillas por muestra se tiñeron con hematoxilina y eosina para el conteo diferencial de células inflamatorias. El sobrenadante se congeló de inmediato a -70°C hasta su uso. Alícuotas de 1 ml de estos sobrenadantes se utilizaron para la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford (utilizando curva patrón de albumina).

Ensayo de proliferación de células A549 estimuladas con LBA de pacientes con FPI.

Se establecieron cultivos de células epiteliales de la línea celular A549 (ATCC, Rockville, MD) en frascos T-25 cm² (Costar, Corning Inc., NY, USA) con medio nutriente de DMEM (*Dulbecco's modified eagle's medium*) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco, BRL, Grand Island, NY, USA), los cuales se mantuvieron en incubación a 37°C, con una mezcla de 95% aire y 5% CO₂. Cuando las células alcanzaron confluencia se cosecharon con Tripsina-EDTA. Después de eliminar la tripsina, se resuspendieron en medio suplementado con suero y se contaron en un hemocitómetro.

Las células se sembraron en cajas de 96 pozos a una densidad celular de 2500 células por pozo y después de 24 horas el medio fue remplazado con medio con suero al 1% más 25% del fluido de los LBA concentrados a 2X de pacientes FPI y controles.

Después de 48 horas se determinó el número de células en cada uno de los pozos con el reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche Applied Science, Indianapolis IN, USA) (193). Esta es una sal de tetrazolio que se oxida en la cadena respiratoria de células viables y forma un cromóforo soluble llamado formazán. Brevemente, el medio de las células se remplazó con 100 μ l de medio sin suero y se agregaron 10 μ l del reactivo WST-1. Después de incubar 3 horas a 37°C, el medio se colectó y se determinó la absorbancia de las muestras en un lector de ELISA a 450 nm, utilizando un filtro de referencia a 620 nm (Abs 450 nm - Abs 620 nm). La tasa de crecimiento celular se determinó como la diferencia del incremento en los valores de absorbancia a las 48 horas respecto a los valores basales (día 0). Estos ensayos fueron hechos por cuadruplicado.

Ensayos de apoptosis

Detección de DNA fragmentado por citometría de flujo

Para determinar la fragmentación de DNA por citofluorometría, 1×10^6 células epiteliales A549, fueron cultivadas por 48 horas en medio HAM libre de suero, en presencia de LBA (25% del volumen total) de pacientes con FPI y controles.

A un panel adicional de células se le indujo apoptosis por 24 horas con cisplatino (20 μ g/ml; Bristol-Myers, Puerto Rico) como control positivo.

Las células fueron resuspendidas en 5 ml de PBS con 1% de paraformaldehído, (en hielo, 15 minutos), lavadas con PBS y almacenadas en etanol frío-congelado al 70%. Entonces se utilizó el estuche APO-BrdU (Pharmingen, San Diego CA, USA), según el procedimiento descrito por el fabricante. Brevemente, las células fueron lavadas 2 veces con Buffer de lavado y el sobrenadante se descartó por centrifugación. La solución de marcado de DNA recién preparada (con TdT y Br-dUTP) fue añadida al paquete celular, e incubada 1 hora a 37°C, con agitación ocasional. Las células fueron marcadas con FITC-conjugado, anticuerpos anti-BrdU, lavadas nuevamente y suspendidas en solución de tinción que contenía yoduro de propidio y RNAsa. Las células fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e inmediatamente analizadas utilizando un citómetro de flujo FACSAria (Becton Dickinson). El porcentaje

de células positivas verde fluorescente con ruptura de DNA fue calculada usando el software FACS Diva v.4.1.

Cuantificación de caspasa 3 activada

Los niveles de caspasa 3 activada (proteolisis en Asp175) fueron analizados por un ensayo de ELISA (Cell Signalling Technology, Beverly MA, USA) de acuerdo con la guía de procedimientos del proveedor. Células epiteliales alveolares A549 fueron estimuladas con LBA de pacientes con FPI de diferentes haplotipos durante 6 horas y los niveles de caspasa 3 activada se determinaron por medio de las lecturas espectrofotométricas de la absorbancia a 450 nm.

RESULTADOS

Características generales de los pacientes con FPI

Los datos demográficos, pruebas de función pulmonar, así como los porcentajes de células inflamatorias en los LBA se resumen en la tabla 1. Todos los pacientes exhibieron evidencia clínica, radiológica y funcional que apoyaba el diagnóstico de FPI, con disnea variable, disminución de los volúmenes y capacidades pulmonares e hipoxemia de reposo que empeoraba con el ejercicio. La tomografía computada de alta resolución, el perfil celular de LBA con predominio de macrófagos y moderado incremento de neutrófilos y eosinófilos, así como los hallazgos histopatológicos de la biopsia, corroboraron el diagnóstico de FPI.

Alelos y haplotipos de HLA-B, -DRB1 y -DQB1 en pacientes con FPI y controles.

Las tablas 2 y 3 ilustran las frecuencias génicas para los *locus* HLA-DRB1 y HLA-DQB1 de la clase II de HLA, en pacientes y sujetos control. En el caso del *locus* HLA-DRB1, se encontró un incremento significativo de los alelos HLA-DRB1*0407, HLA-DRB1*1402 y HLA-DRB1*0101 en el grupo de pacientes con FPI. El alelo HLA-DRB1*0802 mostró una tendencia al aumento en el grupo de controles, pero no alcanzó una diferencia estadística significativa (tabla 2). En el *locus* HLA-DQB1, el alelo 0301 mostró un aumento significativo en el grupo de pacientes con FPI (tabla 3).

El análisis por haplotipos del HLA de clase II, incluyó a los *locus* HLA-DRB1 y HLA-DQB1. En el grupo de pacientes se encontraron 25 haplotipos diferentes, en tanto que para el grupo control se determinaron 31. En la tabla 4 se muestran los 3 haplotipos que se encontraron incrementados de manera significativa en los pacientes con FPI. Los haplotipos inferidos fueron corroborados por medio de un estudio familiar que incluyó a 21 familias de sujetos con FPI incluidos en el estudio. Para esto, se examinaron en promedio a 4 familiares en línea directa (ascendente o descendente), a quienes se les tipificó los alelos del HLA de clase II.

El haplotipo HLA DRB1*0407-DQB1*0302 se encontró con una frecuencia superior al doble en el grupo de pacientes con FPI con relación al grupo de controles ($p < 0.0057$, OR = 2.49, IC = 1.28-4.95). Este haplotipo ha sido descrito previamente en poblaciones amerindias (194-196). Asimismo, el haplotipo HLA DRB1*0101-DQB1*0501 se encontró con una frecuencia haplotípica casi cuatro veces mayor en el grupo de pacientes en comparación con el grupo control ($p < 0.01$, OR = 3.66, IC = 1.31-11.69). Finalmente, el

haplotipo HLA DRB1*1402-DQB1*0301 mostró una frecuencia haplotípica casi seis veces mayor en los pacientes comparados con controles ($p < 0.00005$, OR = 5.48, IC = 2.22-15.36).

Con el objeto de comprobar el origen étnico y la contribución racial de los haplotipos encontrados, se realizó el análisis molecular del *locus* HLA-B de la clase I. Como se muestra en la tabla 5, los alelos HLA-B*35, -B*15 y -B*52 se encontraron significativamente incrementados en los pacientes con FPI.

Los resultados de los haplotipos HLA B-DRB1-DQB1 se muestran en la tabla 6. Se puede observar que el haplotipo de clase II -DRB1*0101-DQB1*0501, se encontró asociado principalmente al alelo de clase I HLA-B*15, construyéndose de esta manera el haplotipo HLA B*15-DRB1*0101-DQB1*0501 ($p = 0.011$, OR = 10.72, IC = 1.43-459.63). El haplotipo -DRB1*1402-DQB1*0301, se encontró asociado al alelo HLA-B*52, originándose así el haplotipo HLA B*52-DRB1*1402-DQB1*0301 ($p = 0.024$, OR = 4.42, IC = 1.21-24.15). Finalmente el haplotipo HLA DRB1*0407-DQB1*0302 se encontró mayoritariamente asociado al alelo HLA-B*35 dando origen al haplotipo extendido HLA B*35-DRB1*0407-DQB1*0302 ($p = 0.005$, OR = 4.73, IC = 1.53-19.53); HLA-B*35 ha sido descrito como un alelo propio de poblaciones Hispánico-Americanas.

Influencia de los LBA sobre la tasa de crecimiento de las células epiteliales alveolares

Con el objeto de examinar si los lavados bronquioalveolares obtenidos de pacientes con FPI con diferentes haplotipos ejercían algún efecto sobre células epiteliales pulmonares, se analizó su tasa de crecimiento a 48 horas (figura 7). En general, los LBA de individuos normales indujeron un incremento moderado en la tasa de crecimiento de las células epiteliales. Por el contrario, los sobrenadantes de los LBA de pacientes que son portadores del haplotipo HLA B*35-DRB1*0407-DQB1*0302, produjeron una disminución significativa en la tasa de crecimiento de células epiteliales alveolares pulmonares ($32 \pm 5\%$ con respecto a la basal; $p < 0.01$), sugiriendo que estos sobrenadantes provocan muerte celular.

La comparación por prueba de Dunnett's entre de los LBA de pacientes con FPI con diferentes haplotipos y controles mostró que el haplotipo HLA B*15-DRB1*0101-DQB1*0501 también causa un moderado pero significativo decremento en la tasa de crecimiento celular epitelial ($p < 0.05$).

Efecto del LBA de pacientes con FPI sobre la apoptosis de células epiteliales alveolares

La posible inducción de muerte celular programada por los sobrenadantes de los LBA de pacientes con distintos haplotipos HLA se examinó por citometría de flujo, utilizando el ensayo APO-BRDU. Se observó un incremento significativo en el porcentaje de apoptosis en las células epiteliales estimuladas con LBA de los pacientes con el haplotipo HLA B*35-DRB1*0407-DQB1*0302 ($23.7\pm 6.9\%$ vs. $3.1\pm 0.7\%$ de los controles y $6.5\pm 0.6\%$ y $7.6\pm 1.2\%$ de los otros dos haplotipos; $p < 0.01$). Un ejemplo de las diferencias observadas en gráficas de puntos obtenidas en el citómetro de flujo se ilustra en la figura 8.

Con el fin de corroborar el efecto pro-apoptótico de este haplotipo, se realizó un análisis adicional evaluando la capacidad de los sobrenadantes de LBA de pacientes con FPI y controles para inducir la activación de caspasa-3 en células epiteliales. Consistente con los resultados de la citometría de flujo, se encontró que las células epiteliales alveolares tratadas con LBA de pacientes con FPI portadores del haplotipo HLA B*35-DRB1*0407-DQB1*0302 mostraron un incremento significativo en la actividad de caspasa-3 (351.7 ± 16.5 contra 264 ± 24 de los controles; $p < 0.05$; figura 9).

Influencia de los diferentes haplotipos sobre el comportamiento clínico de la enfermedad

No se encontraron diferencias en las pruebas de función respiratoria, lesiones tomográficas de tórax, perfil celular en el LBA o hábito tabáquico entre los pacientes con FPI con relación a los distintos haplotipos de HLA.

Un hallazgo interesante fue que el 32% de los pacientes con el haplotipo HLA B*35-DRB1*0407-DQB1*0302 exhibieron un curso acelerado de la enfermedad comparado con solo el 11.7% de los pacientes con otros haplotipos. (Prueba exacta de Fisher = 0.033). Este hallazgo es importante porque recientemente hemos encontrado que ciertos pacientes con FPI pueden desarrollar una forma acelerada de la enfermedad (progresores rápidos). Estos enfermos se caracterizan por consultar pocos meses después del inicio de los síntomas con daño pulmonar grave y habitualmente fallecen en los primeros dos años después del diagnóstico (197).

Tabla 1

Variable	FPI (n=75)	Valores normales
Edad	63.0 ± 9.5	
Género (masculino/femenino)	49/26	
Duración de los síntomas antes del diagnóstico*	29.6 ± 23.4	
Fumador:		
Nunca	36	
Previamente	33	
Actualmente	6	
Hipocratismo (Sí/No)	59/75	No
CVF %	66 ± 23	90-100
CVF/FEV1 %	91.6 ± 10.3	90-100
PaO2 mmHg	49 ± 10	67 ± 3**
LBA		
Macrófagos %	81.6 ± 11.6	85 ± 5
Linfocitos %	14.0 ± 11.0	10 ± 5
Neutrófilos %	4.3 ± 3.5	0
Eosinófilos %	1.0 ± 2.0	0

Tabla 1. Características basales y hallazgos en LBA de pacientes con FPI. Se presentan los datos demográficos, porcentaje de tabaquismo entre pacientes, pruebas de función pulmonar, así como el porcentaje de células inflamatorias en LBA. En la columna de extrema derecha se presentan los valores normales.

*Meses.

**Valores normales a la altura de la ciudad de México.

CVF: Capacidad vital forzada. FEV1: Flujo de volumen expiratorio en un segundo. LBA: Lavado bronquioalveolar.

Tabla 2

HLA-DRB1	Pacientes (n=75) (alelos =150)		Grupo control (n=95) (alelos =190)		pC	OR	IC (95%)
	n	fg	n	fg			
0407	32	0.2133	19	0.105	0.0059	2.44	1.27-4.78
1402	26	0.1733	8	0.043	0.00013	4.77	2.01-12.55
0101	17	0.1133	7	0.037	0.0117	3.34	1.27-9.78
0701	16	0.106	21	0.117	NS	0.96	0.45-2.02
0802	13	0.086	31	0.179	0.0543	0.49	0.22-1.00
1602	8	0.053	3	0.015	NS	3.51	0.82-20.84
1101	7	0.046	11	0.059	NS	0.80	0.26-2.32
1302	7	0.046	4	0.021	NS	2.28	0.56-10.79
0301	5	0.033	9	0.048	NS	0.69	0.18-2.37
1301	4	0.026	4	0.021	NS	1.27	0.23-6.96
1503	4	0.026	3	0.015	NS	1.71	0.28-11.82
1501	3	0.020	9	0.048	NS	0.41	0.07-1.69
1201	3	0.020	1	0.005	NS	3.86	0.30-203.54
1407	1	0.006	7	0.037	NS	0.18	0.00-1.40
1104	1	0.006	3	0.015	NS	0.42	0.01-5.28
Otros	3	< 0.020	50	< 0.015	---	---	---

n: Tamaño de la muestra. fg: Frecuencia génica. pC: Valor de p con corrección de Yates. OR: Odds ratio. IC: Intervalos de confianza del 95%. NS: No significativo.

Tabla 2. Frecuencias génicas de HLA-DRB1 en pacientes con FPI y grupo control. Se encontró un aumento significativo en la frecuencia génica de los alelos 0407, 1402 y 0101 en los pacientes con FPI con respecto al grupo control. El alelo 0802 mostró una tendencia al aumento en el grupo control, pero sin diferencia estadística significativa.

Tabla 3

HLA-DQB1	Pacientes (n=75) (alelos =150)		Grupo control (n=95) (alelos =190)		p ^c	OR	IC (95%)
	n	fg	n	fg			
0301	40	0.266	27	0.153	0.0063	2.20	1.23-3.95
0501	17	0.113	10	0.054	NS	2.30	0.96-5.80
0302	32	0.213	38	0.225	NS	1.08	0.62-1.90
0201	21	0.133	30	0.172	NS	0.87	0.45-1.65
0402	13	0.093	27	0.153	NS	0.57	0.26-1.20
0602	8	0.053	15	0.082	NS	0.66	0.23-1.71
0502	8	0.053	5	0.026	NS	2.08	0.59-8.26
0604	6	0.040	3	0.015	NS	2.60	0.54-16.28
0603	2	0.013	3	0.015	NS	0.84	0.07-7.46
0503	1	0.006	8	0.043	NS	0.15	0.00-1.17
Otros	2	0.013	24	0.135	---	---	---

n: Tamaño de la muestra. fg: Frecuencia génica. pC: Valor de p con corrección de Yates. OR: Odds ratio. IC: Intervalos de confianza del 95%. NS: No significativo.

Tabla 3. Frecuencias génicas de HLA-DQB1 en pacientes con FPI y grupo control. El alelo HLA-DQB1*0301 se encontró incrementado en el grupo de pacientes con FPI en relación con los controles.

Tabla 4

Haplotipo DRB1-DQB1	Pacientes (n=75) (haplotipos=150)		Grupo control (n=95) (haplotipos=190)		p ^c	OR	IC (95%)
	n	fh	n	fh			
0407-0302	31	0.234	18	0.099	0.0035	2.49	1.28-4.88
1402-0301	26	0.191	7	0.037	0.00002	5.48	2.18-14.35
0101-0501	16	0.113	6	0.032	0.0052	3.66	1.30-10.78
0701-0201	16	0.113	19	0.105	NS	1.07	0.50-2.29
0802-0402	13	0.090	25	0.141	NS	0.63	0.29-1.33
1101-0301	8	0.054	10	0.054	NS	1.01	0.35-2.87
1302-0604	6	0.040	3	0.015	NS	2.60	0.57-13.34
0301-0201	5	0.033	6	0.032	NS	1.06	0.27-4.01
1602-0502	5	0.033	2	0.010	NS	3.24	0.55-24.28
1501-0602	3	0.020	9	0.048	NS	0.41	0.09-1.69
1201-0301	3	0.020	1	0.005	NS	3.86	0.35-97.2
1301-0502	3	0.020	1	0.005	NS	3.86	0.35-97.2
1503-0602	3	0.020	1	0.005	NS	3.86	0.35-97.2
1407-0503	1	0.006	7	0.037	NS	0.18	0.01-1.44
Otros	11	< 0.076	75	< 0.025	---	---	---

n: Tamaño de la muestra. fh: Frecuencia haplotípica. OR: Odds ratio. IC: Intervalos de confianza del 95%. NS: No significativo.

Tabla 4. Frecuencias haplotípicas de HLA DRB1- DQB1 en pacientes con FPI y grupo control. Fueron 3 los haplotipos DRB1-DQB1 que se encontraron incrementados significativamente en pacientes con FPI (en negritas en la tabla), en comparación con el grupo control.

Tabla 5

HLA-B	Pacientes (n = 75) (alelos = 150)		Grupo control (n = 57) (alelos = 114)		p ^c	OR	IC (95%)
	n	fg	n	fg			
	35	47	0.356	15			
15	29	0.233	6	0.053	0.001	4.31	1.63-12.07
40	18	0.120	13	0.111	NS	1.1	0.47-2.42
52	17	0.120	4	0.035	0.035	3.52	1.07-12.76
53	8	0.054	4	0.044	NS	1.24	0.34-4.69
14	7	0.047	3	0.026	NS	1.85	0.4-9.55
39	7	0.040	14	0.131	NS	0.27	0.08-0.082
7	5	0.034	3	0.026	NS	1.29	0.25-7.15
8	3	0.020	11	0.096	NS	0.17	0.04-0.073
44	2	0.013	11	0.096	NS	0.11	0.02-0.59
51	2	0.013	10	0.087	NS	1.38	0.53-3.60
41	1	0.006	1	0.008	NS	0.76	0.02-28.39
18	1	0.006	5	0.044	NS	0.14	0.01-1.30
Otros	3	0.006	14	< 0.008	NS	0.76	0.02-28.39

n: tamaño de la muestra. fg: frecuencia génica. p^c: Valor de p con corrección de Yates. OR: Odds ratio. IC: Intervalos de confianza del 95%. NS: No significativo.

Tabla 5. Frecuencias génicas de HLA-B en pacientes con FPI y grupo control. Los alelos B*35, B*15 y B*52, se encontraron aumentados en el grupo de pacientes, con relación al grupo control.

Tabla 6

Haplotype HLA <i>B-DRB1-DQB1</i>	Pacientes (n = 75) (haplotipos = 150)		Grupo control (n = 57) (haplotipos = 114)		p ^c	OR	IC (95%)
	n	fh	n	fh			
	35-0407-0302	22	0.146	4			
52-1402-0301	16	0.106	3	0.026	0.024	4.42	1.21-24.15
15-0101-0501	13	0.086	1	0.008	0.011	10.72	1.43-459.63

fh: Frecuencia haplotípica. p^c: Valor de p con corrección de Yates. OR: Odds ratio. IC: Intervalos de confianza del 95%. NS: No significativo.

Tabla 6. Frecuencias haplotípicas de HLA B-DRB1- DQB1 en pacientes con FPI y grupo control. Se presentan de manera condensada los 3 haplotipos de los locus HLA B-DRB1-DQB1, que resultaron incrementados en los pacientes con FPI.

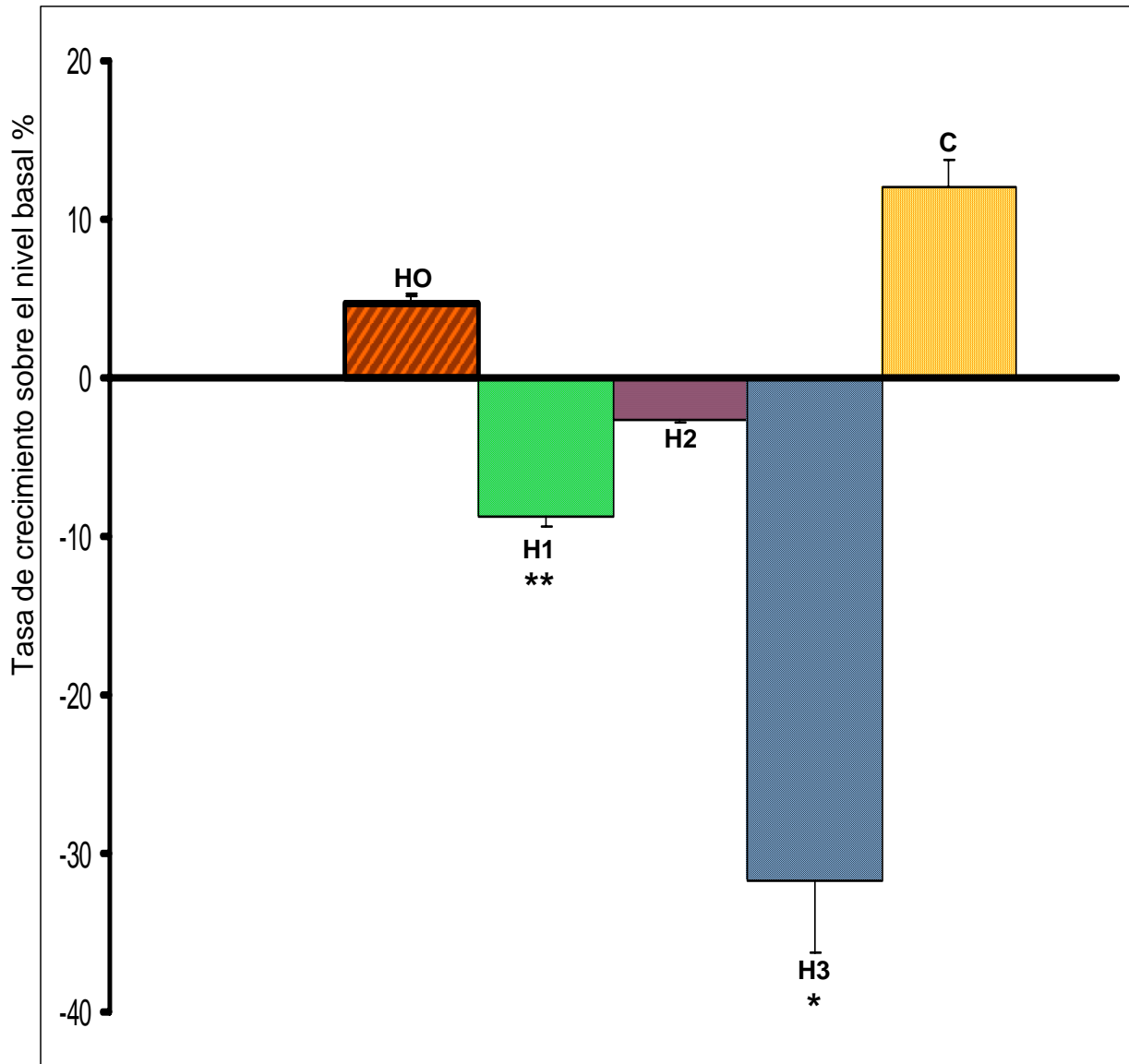


Figura 7. Efecto del sobrenadante de LBA de pacientes con FPI con diferentes haplotipos HLA y controles sobre la tasa de crecimiento de células epiteliales A549.

H0: Sobrenadante de LBA de pacientes de FPI sin ninguno de los tres haplotipos incrementados. H1: Sobrenadante de LBA de pacientes con haplotipo HLA B*15-DRB1*0101-DQB1*0501. H2: Sobrenadante de LBA de pacientes con haplotipo HLA B*52-DRB1*1402-DQB1*0301. H3: Sobrenadante de LBA de pacientes con haplotipo HLA B*35-DRB1*0407-DQB1*0302. C: Individuos control. Cada barra representa la media \pm desviación estándar de 7 a 8 sujetos y los experimentos fueron realizados por triplicado. * $p < 0.01$ muestra una diferencia significativa comparada con el resto de los grupos. ** $p < 0.05$ comparada con controles.

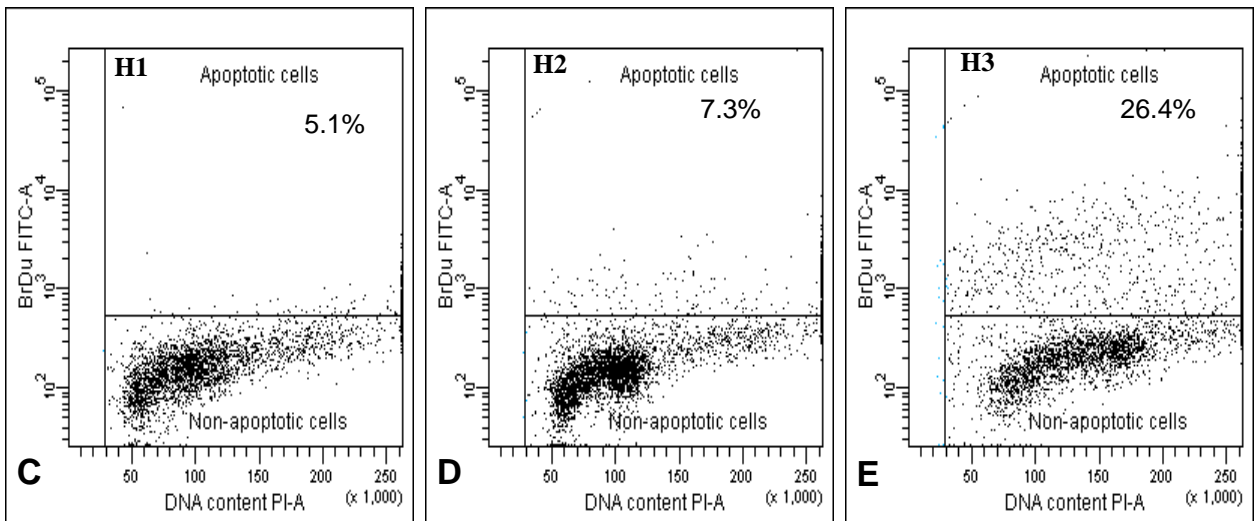
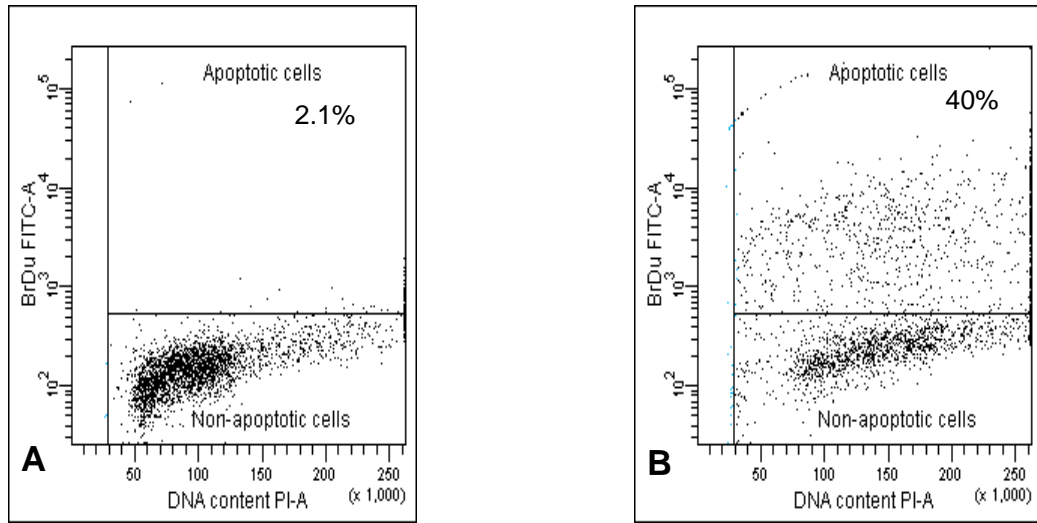


Figura 8. Detección de DNA fragmentado por citometría de flujo en células epiteliales estimuladas con sobrenadante de LBA de pacientes con FPI y controles.

Panel A: Porcentaje de células apoptóticas de sobrenadante de LBA de un individuo control. Panel B: Control positivo de células estimuladas con cisplatino. Panel C: Efecto del sobrenadante de LBA de pacientes con haplotipo HLA B*15-DRB1*0101-DQB1*0501 (H1). Panel D: Efecto del sobrenadante de LBA de pacientes con haplotipo HLA B*52-DRB1*1402-DQB1*0301 (H2). Panel E: Efecto del sobrenadante de LBA de pacientes con haplotipo HLA B*35-DRB1*0407-DQB1*0302 (H3). En cada caso se presenta un experimento típico. Las citometrías fueron realizadas en 4 controles y 7 a 8 pacientes de los diferentes haplotipos.

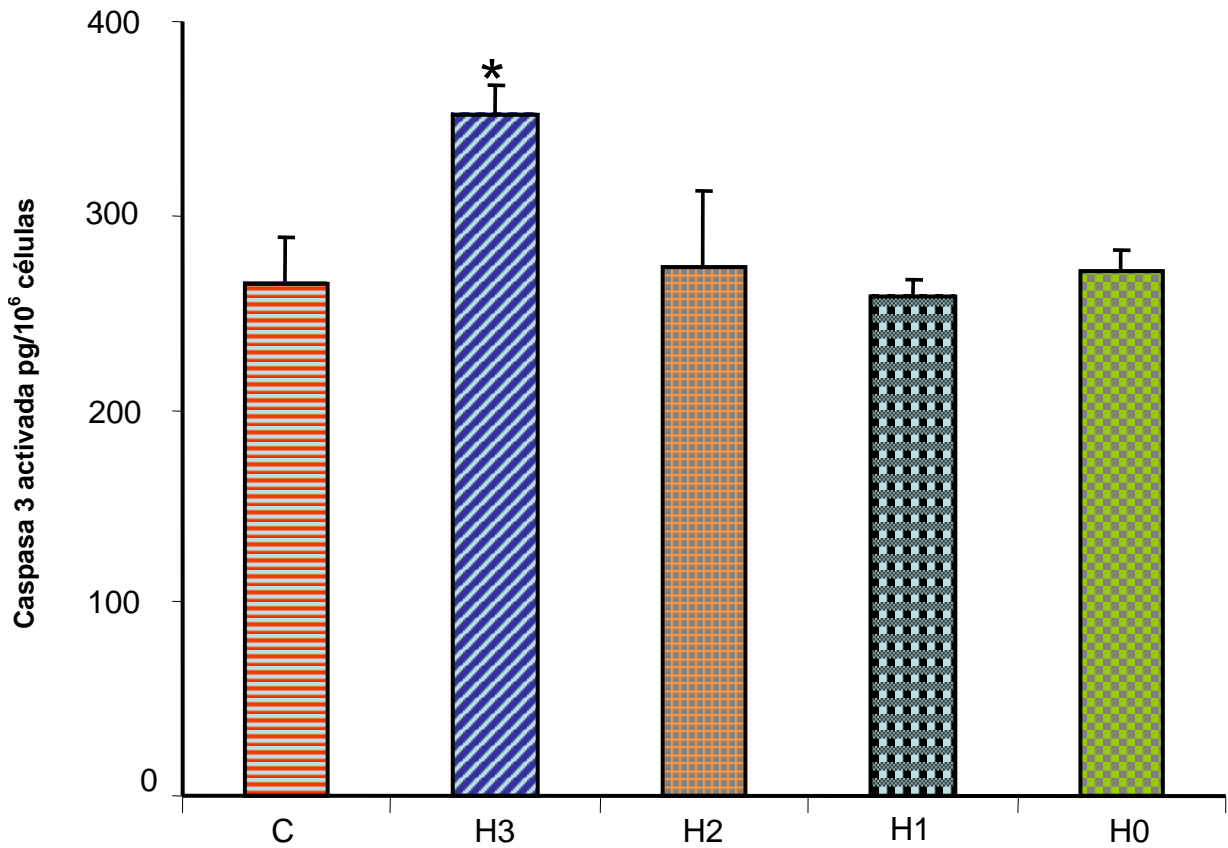


Figura 9. Efecto del sobrenadante de LBA de pacientes con FPI y controles en la activación de caspasa 3.

H0: Sobrenadante de LBA de pacientes de FPI sin ninguno de los 3 haplotipos incrementados. H1: Sobrenadante de LBA de pacientes con haplotipo HLA B*15-DRB1*0101-DQB1*0501. H2: Sobrenadante de LBA de pacientes con haplotipo HLA B*52-DRB1*1402-DQB1*0301. H3: Sobrenadante de LBA de pacientes con haplotipo HLA B*35-DRB1*0407-DQB1*0302. C: Individuos control. Cada barra representa la media \pm desviación estándar (DS), de 7 a 8 sujetos, y los experimentos fueron realizados por duplicado. * $p < 0.05$ muestra una diferencia significativa comparada con el resto de los grupos.

DISCUSIÓN

La FPI es una enfermedad progresiva y letal, con una media de supervivencia de 2 a 3 años después de establecido el diagnóstico. Aunque la secuencia de sus mecanismos patogénicos se desconoce, se ha sugerido que la enfermedad comienza con lesiones focales del epitelio alveolar cuya activación provoca la migración, proliferación y activación de fibroblastos y su cambio de fenotipo a miofibroblastos. Estos se agrupan en focos subepiteliales y son los responsables de la secreción de diferentes moléculas de matriz extracelular, en especial colágenas fibrilares, con la consecuente destrucción de la arquitectura pulmonar. La importancia de las células epiteliales en la patogenia de la FPI es apoyada por el único modelo de este padecimiento confirmado en animales. En un estudio desarrollado en gatos que desarrollaron una enfermedad muy similar a la FPI humana se encontraron numerosas alteraciones en el epitelio alveolar y se demostró que los neumocitos tipo II presentaban alteraciones ultraestructurales muy parecidas a las reportadas en la FPI familiar (198).

Polimorfismos genéticos en fibrosis pulmonar idiopática

En relación a su patogenia, la FPI se considera una “enfermedad compleja” donde cierta susceptibilidad genética, probablemente asociada a varios genes que actúan en concierto o independientemente, en conjunto con factores ambientales determina el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, los posibles genes responsables no se conocen.

La mayoría de los estudios recientes se ha enfocado al análisis de polimorfismos de citocinas o factores de crecimiento. Así, se han explorado los polimorfismos de genes tan variados como la fibronectina, la interleucina-1 y el antagonista de su receptor, la interleucina-6 y la interleucina-12, del TNF y algunos de sus receptores, el interferón- γ , el TGF- β 1, el receptor del complemento C1, y algunas proteínas del surfactante pulmonar (135-139, 199-201). Sin embargo, las asociaciones reportadas a la fecha han sido débiles o inexistentes.

Recientemente hemos encontrado que algunos polimorfismos de los genes de las proteínas A y B del surfactante se encuentran con mayor frecuencia en los pacientes con FPI, sugiriendo que estos polimorfismos, pueden ser parte del grupo de genes de susceptibilidad o genes modificadores en FPI (134). Este ha sido un hallazgo

interesante dado que mutaciones de otra proteína del surfactante, la SP-C han sido asociadas al desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática familiar (202, 203).

Complejo principal de histocompatibilidad y fibrosis pulmonar idiopática

Dentro de este marco, es importante destacar que los estudios enfocados al complejo principal de histocompatibilidad, son escasos y fueron realizados hace mas de 20 años con técnicas serológicas, que actualmente han sido superadas por métodos moleculares que definen con precisión cada alelo. Además, es importante destacar que es altamente probable que en muchos pacientes de esos estudios el diagnóstico de FPI no se haya realizado correctamente ya que la concepción de esta enfermedad ha cambiado radicalmente en la última década y la forma de hacer su diagnóstico alcanzó consenso recién en el año 2000 (140-143).

En el presente estudio examinamos la posible contribución de los *loci* HLA-DRB1 y -DQB1 de la clase II, así como del *locus* HLA-B, de la clase I, en la susceptibilidad a desarrollar FPI. Para este propósito se evaluaron 75 pacientes y 95 controles étnicamente comparables utilizando la técnica de iniciadores secuencia específica (PCR-SSP). Nuestros resultados mostraron que 3 haplotipos se encuentran significativamente incrementados en los pacientes con FPI, sugiriendo que el MHC puede estar involucrado, al menos parcialmente, en la susceptibilidad genética a desarrollar esta enfermedad.

Dos de estos haplotipos, HLA B*52-DRB1*1402-DQB1*0301 y HLA B*35-DRB1*0407-DQB1*0302 han sido identificados en poblaciones amerindias; de hecho, este último haplotipo lo comparten todas las poblaciones autóctonas del continente americano, desde Mesoamérica (lo que es hoy México y el sur de Estados Unidos) hasta la Patagonia y es a su vez el más común en las poblaciones mestizas latinoamericanas (194, 195, 196).

El elevado polimorfismo detectado en mestizos Mexicanos, es al menos en parte, debido a la mezcla con genes caucásicos, producto de la colonización y migraciones posteriores. Sin embargo, en el caso de HLA-DR4, el alelo HLA-DRB1*0407 es el mas común en poblaciones autóctonas; es interesante señalar que se ha reportado la existencia de cierta restricción en la cantidad de alelos de HLA-DR4 en estas poblaciones por razones que no han podido ser elucidadas del todo (204-206). Varios mecanismos pueden ser considerados, entre ellos el efecto fundador y la endogamia.

También es posible que la homogeneidad de alelos haya ocurrido como resultado de una amplia pérdida poblacional debido a enfermedades (posiblemente a causa de epidemias) o a un medio ambiente adverso. Esto podría estar asociado con la existencia de ciertos alelos que pueden conferir alguna ventaja selectiva; por ejemplo, la molécula HLA-DRB1*0407 no porta una secuencia de cinco aminoácidos, que si portan otros alelos DR4, que confieren susceptibilidad a artritis reumatoide (204, 207, 208).

En contraste, los alelos DRB1*0404 y *0411, también presentes en poblaciones mexicanas autóctonas, aunque en menor frecuencia que DRB1*0407, sí portan la denominada “secuencia compartida” sugiriendo que distintos alelos de HLA-DR4 pueden influir como factores de riesgo asociados con ciertas enfermedades. HLA-DR4 es un factor de riesgo positivo para diferentes enfermedades (204, 207). El conocimiento de la distribución de alelos de HLA-DR4 en mexicanos puede constituirse como una herramienta útil en la detección de posibles genes de susceptibilidad a enfermedades (204).

Los alelos DRB1*0403, *0406 y *0407, portan al ácido Glutámico en la posición 74 de la molécula DRB1 y muestran solo pequeñas diferencias de nucleótidos entre ellas; sin embargo, todos estos alelos DR4 portan el mismo haplotipo de clase II DQA1*0301/DQB1*0302 (209).

Haplotipos HLA y mecanismos de daño en fibrosis pulmonar idiopática

El o los mecanismos por los cuales los haplotipos encontrados en este estudio pueden favorecer el desarrollo de FPI necesitan ser elucidados. En otras enfermedades, primordialmente aquellas de origen autoinmune, se ha sugerido que ciertos haplotipos extendidos predisponen a una alteración en la regulación inmune mediada por linfocitos T, y de esta manera la susceptibilidad asociada a ellos se relaciona con una falla en proveer protección eficiente como se ha sugerido, por ejemplo, en artritis reumatoide (210).

Por otro lado, también se ha descrito una asociación entre algunos alelos HLA con enfermedades fibrótico-epiteliales, que no tienen un fondo inflamatorio o autoinmune; tal es el caso de la glomeruloesclerosis focal y segmentaria idiopática. De manera interesante, esta enfermedad fibrótica que se caracteriza por una disfunción de los podocitos (células epiteliales glomerulares viscerales) seguida de cicatrización glomerular segmentaria y síndrome nefrótico, ha sido asociada también a HLA-DR4

(211, 212). En este caso, el efecto puede estar relacionado con otros genes vecinos de esta región polimórfica, que se caracteriza por un elevado desequilibrio de enlace. Esto mismo se puede postular en relación al efecto de los haplotipos encontrados en nuestro estudio y la susceptibilidad a desarrollar FPI, esto es, que esté relacionada con otros genes que estén cercanos en esta región con alto desequilibrio de unión.

Haplotipos HLA y apoptosis del epitelio alveolar en la patogenia de la fibrosis pulmonar idiopática

Recientemente se ha propuesto que un proceso fundamental en el desarrollo de la FPI es la lesión y activación de las células del epitelio alveolar la que es seguida por migración/proliferación de fibroblastos, acumulación exagerada de matriz extracelular y una aberrante remodelación tisular (116, 117).

En este contexto, varios estudios sugieren que la apoptosis de las células del epitelio alveolar desempeña un papel crítico en la patogenia de esta enfermedad (213-216). Es importante señalar que éste es un proceso patológico que parece ocurrir en etapas muy iniciales de la enfermedad. Así por ejemplo, con técnicas de marcaje de DNA fragmentado *in situ* y microscopía electrónica se ha encontrado la presencia de numerosas células apoptóticas en alvéolos prácticamente normales o que presentan mínimas áreas de lesión en pulmones con FPI, sugiriendo que la muerte epitelial programada es un evento temprano en la evolución de la enfermedad (214).

Sin embargo, los mecanismos involucrados en la apoptosis epitelial en FPI no se conocen con precisión. Varios eventos pueden estar implicados, incluyendo la vía de señalización de Fas que se encuentra sobre-expresada en células del epitelio alveolar en FPI, y la secreción de angiotensinógeno por fibroblastos el cual convertido en angiotensina provoca apoptosis epitelial (215, 216).

Estudios recientes, sugieren que las moléculas clase II del sistema HLA, además de participar en la presentación de antígenos, pueden activar redes de señalización intracelular que frecuentemente llevan a la muerte celular programada, en especial de linfocitos B (217). Se ha propuesto que la activación de CD95, recluta la molécula FADD (*Fas-associated death domain protein*), la cual inicia los mecanismos de activación de la procaspasa 8 (218). Otros estudios, sin embargo, han sugerido que la apoptosis mediada por HLA-DR, no involucra activación de caspasas (217).

Sin embargo, una posible relación entre determinados haplotipos HLA y apoptosis epitelial no se había descrito previamente. Es importante señalar que la expresión de moléculas de HLA de clase II es regulada de manera activa a través de varios estímulos celulares y se ha demostrado que células del epitelio alveolar de pulmones con FPI expresan moléculas de HLA clase II (219). Aún más, hallazgos experimentales han documentado que los antígenos de HLA clase II se encuentran expresados en etapas tempranas en los neumocitos tipo II y antes de que se observe infiltración celular inflamatoria (220).

En este contexto, nuestros resultados sugieren que algunos haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad, en el caso de nuestro estudio el HLA B*35-DRB1*0407-DQB1*0302, pueden asociarse con un fenotipo que se caracteriza por el aumento local de señales que favorecen la muerte celular programada de células del epitelio alveolar. Así pudimos demostrar que los lavados bronquioalveolares (que reflejan lo que está ocurriendo en el parénquima pulmonar) de pacientes con este haplotipo provocan un aumento significativo de apoptosis en células epiteliales pulmonares expuestas *in vitro* determinado tanto por citometría de flujo (DNA fragmentado marcado con BrdU) como por activación de la caspasa 3.

Genes vecinos al MHC están relacionados con apoptosis

Algunos de los genes que codifican para proteínas involucradas en el proceso de apoptosis se encuentran localizados en el brazo corto del cromosoma 6, relativamente cerca de la región de HLA (221).

Entre estos se incluyen a CDKN1A (*cyclin dependent kinase inhibitor 1A*), BAK1 (*BCL2-antagonist/killer 1*), DAXX (*death domain-associated protein*), IER3 (*immediate early gene 3*), SOX4 (*sex determining region Y-box 4*), LTA [la cual pertenece a la clase IV del HLA, (3)], HMGA1 (*high mobility group AT-hook 1*), y la proteína asociada a presenilina. Con respecto a esta última se ha reportado que ratones homocigotos deficientes a presenilina 2 desarrollan espontáneamente con la edad un considerable engrosamiento de las paredes alveolares por fibrosis. De manera importante, en conjunto con el desarrollo de fibrosis los autores encontraron numerosas células epiteliales pulmonares en proceso de apoptosis (222).

Otro de los genes relacionados con apoptosis es BAT3 (*HLA-B associated transcript 3*), el cual tiene un sitio regular para la activación de la caspasa 3. Existe evidencia de que

la caspasa 3 activada actúa sobre BAT3 para liberar un fragmento C-terminal denominado CTF-131, el cual a su vez induce apoptosis (223).

Sin embargo, actualmente se desconoce si estos u otros genes relacionados a apoptosis son regulados en asociación con determinados haplotipos HLA.

Complejo principal de histocompatibilidad y comportamiento clínico de la FPI

Es importante enfatizar que en algunos casos un determinado polimorfismo no se asocia con el desarrollo de la enfermedad, sino con el fenotipo clínico (136, 138). Por ejemplo, recientemente se observó que los polimorfismos en el codón 10 y 25 del gen del factor de crecimiento transformante beta-1 no se encuentran con mayor frecuencia en los enfermos con FPI en comparación con controles, pero se asocian con una peor evolución clínica (136).

En este contexto, nuestros resultados sugieren que el haplotipo HLA B*35-DRB1*0407-DQB1*0302 se asocia con una rápida progresión de la enfermedad, y de hecho, el 32% de los pacientes consultó con disnea grave e hipoxemia importante aún cuando fueron diagnosticados pocos meses después del inicio de los síntomas. Por el contrario, los pacientes con la forma de evolución habitual o “clásica” consultan en promedio de 1 a 2 años después del inicio de los síntomas que son en general lentamente progresivos. Esta heterogeneidad clínica ha sido recientemente descrita (197), y nuestros resultados sugieren que una susceptibilidad genética asociada al sistema HLA puede ser parcialmente responsable.

En resumen, la susceptibilidad genética en la FPI debe visualizarse a través de un modelo que involucre la participación de varios genes incluyendo aquellos del sistema HLA. Nuestros hallazgos sugieren que varios haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad pueden estar involucrados en la susceptibilidad genética a desarrollar esta enfermedad, y uno de ellos, el HLA B*35-DRB1*0407-DQB1*0302 de origen amerindio, se presenta en pacientes con un fenotipo clínico más agresivo, que se caracteriza por inducción de apoptosis de células epiteliales pulmonares *in vitro*, y por una presentación acelerada de síntomas respiratorios.

BIBLIOGRAFÍA

1. Klein J (1986) Natural History of the Major histocompatibility Complex. New York: Wiley & Sons Inc. pp: 775
2. Rhodes DA, Trowsdale J (1999) Genetics and molecular genetics of the MHC. *Rev Immunogenet.* 1(1):21-31. PMID: 11256569.
3. Beck S, Trowsdale J (2000). The human major histocompatibility complex: lessons from the DNA sequence. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 1:117-37. PMID: 11701627.
4. Gorer PA (1936) The genetic and antigenic basis of the tumor transplantation. *J. Path. Bact.* 44, 691.
5. Golub ES (1981) The cellular basis on the immune response. Ed. Sinnaver Associates Inc., Sunderland Mass.
6. Gorer PA, Lyman S, Snell GD (1948) Studies on the genetic and antigenetics basis of the tumor transplantation. Linkage between a histocompatibility gene and "fused" in mice. *Proc. Roy. Soc.* 135, 499-505.
7. Palutke M (1980) Transplantation Immunology. In Sonnenwirth AC Ed. Jarett L. Clinical laboratory methods and diagnosis. The C. U. Mosby Co.
8. Dausset J (1958) Iso-leuco-anticorps. *Act Haematol.* 156-158. PMID: 13582558.
9. Rodey GE (1976) History and nomenclature of the HLA system. In Dawson RB (Ed.). HLA typing: A technical workshop. American association of blood banks. San Francisco CA, USA.
10. Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T (1994) A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Jul 5;91(14):6259-63. PMID: 8022771.
11. Campbell RD and Trowsdale J (1993) Map of the human MHC. *Immunology Today.* 14:349-352. PMID: 8363724.
12. Stephens R, Horton R, Humphray S, Rowen L, Trowsdale J, Beck S (1999) Gene organization, sequence variation and isochore structure at the centromeric boundary of the human MHC. *J. Mol. Biol.* 291: 789-799. PMID: 10452889.
13. Mandelboim O, Pazmany L, Davis DM, Vales-Gomez M, Reyburn HT, Rybalov B, Strominger JL (1997) Multiple receptors for HLA-G on human natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94:14666-14670. PMID: 9405670.

14. Hughes AL, Ten Elshof AE and Chorney MJ (1999) A new taxonomy of mammalian MHC class I molecules. *Immunology Today*. 20 (1):22-25.
15. Bodmer GJ, Marsh SGE, Bodmer WF, Ehrlich HA, Parham P, Sasazuki T, Strominger JL, Terasaki PI (1999) Nomenclature for factors of HLA system, 1998. *Tissue Antigens* 53:407-446. PMID: 10321590.
16. Gruen JR and Weissman SM (1997) Evolving views of the Major Histocompatibility Complex. *Blood* 90:4252-4265. PMID: 9373235.
17. Gruen JR and Weissman SM (2001) Human MHC class III and IV genes and disease associations. *Front Biosci*. Aug 1;6:D960-72. PMID: 11487469.
18. David-Watine B, Israel A, Kourilsky P (1990) The regulation and expression of MHC class I genes. *Immunol Today*. Aug;11(8):286-92. PMID: 1698378.
19. Glimcher LH, Kara CJ (1992) Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription. *Annu Rev Immunol*. 10:13-49. PMID: 1590984.
20. Mach B (1995) MHC class II regulation--lessons from a disease. *N Engl J Med*. Jan 12;332(2):120-2. PMID: 7990888.
21. Chang CH, Fontes JD, Peterlin M, Flavell RA (1994) Class II transactivator (CIITA) is sufficient for the inducible expression of major histocompatibility complex class II genes. *J Exp Med*. Oct 1;180(4):1367-74. PMID: 7931070.
22. Mach B, Steimle V, Martinez-Soria E, Reith W (1996) Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu Rev Immunol*. 14:301-31. PMID: 8717517
23. Mach B (1999) Perspectives: immunology. Regulating the regulator. *Science*. Aug 27; 285 (5432): 1367. PMID: 10490413.
24. Klein J, Sato A (2000) The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*. Sep 7;343(10):702-9. PMID: 10974135.
25. Carosella ED, Dausset J, Kirszenbaum M (1996) HLA-G revisited. *Immunol Today*. Sep;17(9):407-9. PMID: 8554556.
26. Carosella ED, Rouas-Freiss N, Paul P, Dausset J (1999) HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. *Immunol Today*. Feb;20(2):60-2. PMID: 10098322.
27. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*. Oct 8-14;329(6139):506-12. PMID: 3309677.

28. Bjorkman PJ, Parham P (1990) Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem.* 59:253-88. PMID: 2115762.
29. Guo HC, Madden DR, Silver ML, Jardetzky TS, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC (1993) Comparison of the P2 specificity pocket in three human histocompatibility antigens: HLA-A*6801, HLA-A*0201, and HLA-B*2705. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 1;90(17):8053-7. PMID: 8367462.
30. Sun J, Leahy DJ, Kavathas PB (1995) Interaction between CD8 and major histocompatibility complex (MHC) class I mediated by multiple contact surfaces that include the alpha 2 and alpha 3 domains of MHC class I. *J Exp Med.* Nov 1;182(5):1275-80. PMID: 7595198.
31. Sugita M, Brenner MB (1994) An unstable beta 2-microglobulin: major histocompatibility complex class I heavy chain intermediate dissociates from calnexin and then is stabilized by binding peptide. *J Exp Med.* Dec 1;180(6):2163-71. PMID: 7964491.
32. Vigna JL, Smith KD, Lutz CT (1996) Invariant chain association with MHC class I: preference for HLA class I/beta 2-microglobulin heterodimers, specificity, and influence of the MHC peptide-binding groove. *J Immunol.* Nov 15;157(10):4503-10. PMID: 8906828.
33. Springer TA, Kaufman JF, Terhorst C, Strominger JL (1977) Purification and structural characterization of human HLA-linked B-cell antigens. *Nature.* Jul 21;268(5617):213-8. PMID: 301990.
34. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1993) Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature.* Jul 1;364(6432):33-9. PMID: 8316295.
35. Silver ML, Guo HC, Strominger JL, Wiley DC (1992) Atomic structure of a human MHC molecule presenting an influenza virus peptide. *Nature.* Nov 26;360(6402):367-9. PMID: 1448154.
36. Roucard C, Garban F, Mooney NA, Charron DJ, Ericson ML (1996) Conformation of human leukocyte antigen class II molecules. Evidence for superdimers and empty molecules on human antigen presenting cells. *J Biol Chem.* Jun 14;271(24):13993-4000. PMID: 8662817.

37. Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1996) Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1 suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 23;93(2):734-8. PMID: 8570625.
38. Madden DR (1995) The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol*. 13:587-622. PMID: 7612235.
39. Rammensee HG, Friede T, Stevanović S (1995) MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*. 41(4):178-228. PMID: 7890324.
40. Choo SY (1991) Immunogenetics of the HLA system. *Yonsei Med J*. Mar;32(1):1-8. PMID: 1908609.
41. Hunt DF, Henderson RA, Shabanowitz J, Sakaguchi K, Michel H, Sevilir N, Cox AL, Appella E, Engelhard VH (1992) Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science*. Mar 6;255(5049):1261-3. PMID: 1546328.
42. Falk K, Rotzschke O, Stevanović S, Jung G, Rammensee HG (1991) Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*. May 23;351(6324):290-6. PMID: 1709722.
43. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1994) Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*. Mar 17;368(6468):215-21. PMID: 8145819.
44. Ghosh P, Amaya M, Mellins E, Wiley DC (1995) The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature*. Nov 30;378(6556):457-62. PMID: 7477400.
45. Gorga JC (1992) Structural analysis of class II major histocompatibility complex proteins. *Crit Rev Immunol*. 11(5):305-35. PMID: 1379437
46. Brown JH, Jardetzky T, Saper MA, Samraoui B, Bjorkman PJ, Wiley DC (1988) A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature*. Apr 28;332(6167):845-50. PMID: 3258651.
47. Chicz RM, Lane WS, Robinson RA, Trucco M, Strominger JL, Gorga JC (1994) Self-peptides bound to the type I diabetes associated class II MHC molecules HLA-DQ1 and HLA-DQ8. *Int Immunol*. Nov;6(11):1639-49. PMID: 7865457.

48. Verreck FA, van de Poel A, Termijtelen A, Amons R, Drijfhout JW, Koning F (1994) Identification of an HLA-DQ2 peptide binding motif and HLA-DPw3-bound self-peptide by pool sequencing. *Eur J Immunol.* Feb;24(2):375-9. PMID: 8299686.
49. Johansen BH, Vartdal F, Eriksen JA, Thorsby E, Sollid LM (1996) Identification of a putative motif for binding of peptides to HLA-DQ2. *Int Immunol.* Feb;8(2):177-82. PMID: 8671602.
50. van de Wal Y, Kooy YM, Drijfhout JW, Amons R, Koning F (1996) Peptide binding characteristics of the celiac disease-associated DQ ($\alpha 1^*0501$, $\beta 1^*0201$) molecule. *Immunogenetics.* 44(4):246-53. PMID: 8753854.
51. Matsushita S, Nishi T, Oiso M, Yamaoka K, Yone K, Kanai T, Nishimura Y (1996) HLA-DQ-binding peptide motifs. 1. Comparative binding analysis of type II collagen-derived peptides to DR and DQ molecules of rheumatoid arthritis-susceptible and non-susceptible haplotypes. *Int Immunol.* May;8(5):757-64. PMID: 8671664.
52. Sidney J, Oseroff C, del Guercio MF, Southwood S, Krieger JI, Ishioka GY, Sakaguchi K, Appella E, Sette A (1994) Definition of a DQ3.1-specific binding motif. *J Immunol.* May 1;152(9):4516-25. PMID: 7512598.
53. Kwok WW, Domeier ME, Johnson ML, Nepom GT, Koelle DM (1996) HLA-DQB1 codon 57 is critical for peptide binding and recognition. *J Exp Med.* Mar 1;183(3):1253-8. PMID: 8642268.
54. Trowsdale J, Powis SH (1992) The MHC: relationship between linkage and function. *Curr Opin Genet Dev.* Jun;2(3):492-7. PMID: 1504627.
55. Cresswell P (1994) Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol.* 12:259-93. PMID: 8011283.
56. Milner CM, Campbell RD (1992) Genes, genes and more genes in the human major histocompatibility complex. *Bioassays.* Aug;14(8):565-71. PMID: 1365911.
57. Xie T, Rowen L, Aguado B, Ahearn ME, Madan A, Qin S, Campbell RD, Hood L (2003) Analysis of the gene-dense major histocompatibility complex class III region and its comparison to mouse. *Genome Res.* Dec;13(12):2621-36. PMID: 14656967.
58. Ribas G, Neville MJ, Campbell RD (2001) Single-nucleotide polymorphism detection by denaturing high-performance liquid chromatography and direct sequencing in genes in the MHC class III region encoding novel cell surface molecules. *Immunogenetics.* Jul;53(5):369-81. PMID: 11486274.

59. Aguado B, Campbell RD (1998) Characterization of a human lysophosphatidic acid acyltransferase that is encoded by a gene located in the class III region of the human major histocompatibility complex. *J Biol Chem.* Feb 13;273(7):4096-105. PMID: 9461603.
60. Albertella MR, Campbell RD (1994) Characterization of a novel gene in the human major histocompatibility complex that encodes a potential new member of the I kappa B family of proteins. *Hum Mol Genet.* May;3(5):793-9. PMID: 8081366.
61. Falfán R (2002) Factor de necrosis tumoral: Actividad biológica en neumopatías intersticiales. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex Enero-marzo*;15(1):48-53
62. Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LB, Duff GW (1993) An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med.* Feb 1;177(2):557-60. PMID: 8426126.
63. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW (1997) Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 1;94(7):3195-9. PMID: 9096369.
64. Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, Kollias G (1996) Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med.* Oct 1;184(4):1397-411. PMID: 8879212.
65. Mackay F, Majeau GR, Hochman PS, Browning JL (1996) Lymphotoxin beta receptor triggering induces activation of the nuclear factor kappaB transcription factor in some cell types. *J Biol Chem.* Oct 4;271(40):24934-8. PMID: 8798772.
66. Holzinger I, de Baey A, Messer G, Kick G, Zwierzina H, Weiss EH (1995) Cloning and genomic characterization of LST1: a new gene in the human TNF region. *Immunogenetics.* 42(5):315 PMID: 7590964.
67. Utans U, Quist WC, McManus BM, Wilson JE, Arceci RJ, Wallace AF, Russell ME (1996) Allograft inflammatory factor-1. A cytokine-responsive macrophage molecule expressed in transplanted human hearts. *Transplantation.* May 15;61(9):1387-92. PMID: 8629302.

68. Widner WR, Wickner RB (1993) Evidence that the SKI antiviral system of *Saccharomyces cerevisiae* acts by blocking expression of viral mRNA. *Mol Cell Biol.* Jul;13(7):4331-41. PMID: 8321235.
69. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T (1996) Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 29;93(22):12445-50. PMID: 8901601.
70. Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, Lush MJ, Povey S, Talbot CC Jr, Wright MW, Wain HM, Trowsdale J, Ziegler A, Beck S (2004) Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet.* Dec;5(12):889-99. PMID: 15573121.
71. Malissen B (1999) Dancing the immunological two-step. *Science.* Jul 9;285(5425):207-8. PMID: 10428718.
72. Parham P (1996) Pictures of MHC restriction. *Nature.* Nov 14;384(6605):109-10. PMID: 8906779.
73. Zinkernagel RM, Doherty PC (1997) The discovery of MHC restriction. *Immunol Today.* Jan;18(1):14-7. PMID: 9018968.
74. Bontrop RE (2000) The evolution of the Major Histocompatibility Complex: Insights from phylogeny. In: Academic press editors. *HLA in health and disease.* 163-169.
75. Kaufman J (2000) The generation and selection of major histocompatibility complex polymorphisms. In: Academic press editors. *HLA in health and disease.* 171-178.
76. Beck S, Abdulla S, Alderton RP, Glynn RJ, Gut IG, Hosking LK, Jackson A, Kelly A, Newell WR, Sanseau P, Radley E, Thorpe KL, Trowsdale J (1996) Evolutionary dynamics of non-coding sequences within the class II region of the human MHC. *J Mol Biol.* Jan 12;255(1):1-13. PMID: 8568858.
77. Parham P, Adams EJ, Arnett KL (1995) The origins of HLA-A, B, C polymorphism. *Immunol Rev.* Feb;143:141-80. PMID: 7558075.
78. Hughes AL, Hughes MK (1995) Natural selection on the peptide-binding regions of major histocompatibility complex molecules. *Immunogenetics.* 42(4):233-43. PMID: 7672817.

79. Robinson J, Waller MJ, Parham P, de Groot N, Bontrop R, Kennedy LJ, Stoehr P, Marsh SG (2003) IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res.* Jan 1;31(1):311-4. PMID: 12520010.
80. <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG>
81. Moreno J (1996) Organización de los genes del MHC en humanos y ratones. En: Editorial Limusa, Noriega editores. *Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad.* 29-33, 94-100.
82. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Geraghty DE, Hansen JA, Hurley CK, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Trowsdale J (2005) Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens.* Apr;65(4):301-69. PMID: 15787720.
83. Trowsdale J, Parham P (2004) Mini-review: defense strategies and immunity-related genes. *Eur J Immunol.* Jan;34(1):7-17. PMID: 14971025.
84. Ahmad T, Neville M, Marshall SE, Armuzzi A, Mulcahy-Hawes K, Crawshaw J, Sato H, Ling KL, Barnardo M, Goldthorpe S, Walton R, Bunce M, Jewell DP, Welsh KI (2003) Haplotype-specific linkage disequilibrium patterns define the genetic topography of the human MHC. *Hum Mol Genet.* Mar 15;12(6):647-56. PMID: 12620970.
85. Kauppi L, Sajantila A, Jeffreys AJ (2003) Recombination hotspots rather than population history dominate linkage disequilibrium in the MHC class II region. *Hum Mol Genet.* Jan 1;12(1):33-40. PMID: 12490530.
86. Djilali-Saiah I, Benini V, Daniel S, Assan R, Bach JF, Caillat-Zucman S (1996) Linkage disequilibrium between HLA class II (DR, DQ, DP) and antigen processing (LMP, TAP, DM) genes of the major histocompatibility complex. *Tissue Antigens.* Aug;48(2):87-92. PMID: 8883297.
87. Sanchez-Mazas A, Djoulah S, Busson M, Le Monnier de Gouville I, Poirier JC, Dehay C, Charron D, Excoffier L, Schneider S, Langaney A, Dausset J, Hors J (2000) A linkage disequilibrium map of the MHC region based on the analysis of 14 *loci* haplotypes in 50 French families. *Eur J Hum Genet.* Jan;8(1):33-41. PMID: 10713885.

88. Vihinen M, Arredondo-Vega FX, Casanova JL, Etzioni A, Giliani S, Hammarstrom L, Hershfield MS, Heyworth PG, Hsu AP, Lahdesmaki A, Lappalainen I, Notarangelo LD, Puck JM, Reith W, Roos D, Schumacher RF, Schwarz K, Vezzoni P, Villa A, Valiaho J, Smith CI (2001) Primary immunodeficiency mutation databases. *Adv Genet.* 43:103-88. PMID: 11037300.
89. Dupuis S, Doffinger R, Picard C, Fieschi C, Altare F, Jouanguy E, Abel L, Casanova JL (2000) Human interferon-gamma-mediated immunity is a genetically controlled continuous trait that determines the outcome of mycobacterial invasion. *Immunol Rev.* Dec;178:129-37. PMID: 11213797.
90. Klein J, O'Huigin C (1994) MHC polymorphism and parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Nov 29;346(1317):351-7 PMID: 7708829.
91. Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL, Bettinotti MP, Marincola FM, Martino L, Hallahan CW, Selig SM, Schwartz D, Sullivan J, Connors M (2000) HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 14;97(6):2709-14. PMID: 10694578.
92. Hill AV, Elvin J, Willis AC, Aidoo M, Allsopp CE, Gotch FM, Gao XM, Takiguchi M, Greenwood BM, Townsend AR (1992) Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature.* Dec 3;360(6403):434-9. PMID: 1280333.
93. Hill AV. (1998b) The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol.* 16:593-617. PMID: 9597143.
94. Price P, Witt C, Allcock R, Sayer D, Garlepp M, Kok CC, French M, Mallal S, Christiansen F (1999) The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunol Rev.* Feb;167:257-74. PMID: 10319267.
95. Novik KL, Nimmrich I, Genc B, Maier S, Piepenbrock C, Olek A, Beck S (2002) Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena. *Curr Issues Mol Biol.* Oct;4(4):111-28. PMID: 12432963.
96. Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman

- RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet.* Aug;13(4):399-408. PMID: 8696333.
97. Pal DK, Evgrafov OV, Tabares P, Zhang F, Durner M, Greenberg DA (2003) BRD2 (RING3) is a probable major susceptibility gene for common juvenile myoclonic epilepsy. *Am J Hum Genet.* Aug;73(2):261-70. PMID: 12830434.
98. Siebold C, Hansen BE, Wyer JR, Harlos K, Esnouf RE, Svejgaard A, Bell JI, Strominger JL, Jones EY, Fugger L (2004) Crystal structure of HLA-DQB1*0602 that protects against type 1 diabetes and confers strong susceptibility to narcolepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 17;101(7) PMID: 14769912.
99. Hulsmeyer M, Fiorillo MT, Bettosini F, Sorrentino R, Saenger W, Ziegler A, Uchanska-Ziegler B (2004) Dual, HLA-B27 subtype-dependent conformation of a self-peptide. *J Exp Med.* Jan 19;199(2):271-81. PMID: 14734527.
100. Williams TM (2001) Human leukocyte antigen gene polymorphism and the histocompatibility laboratory. *J Mol Diagn.* Aug;3(3):98-104. PMID: 11486048.
101. Bowness P (2002) HLA B27 in health and disease: a double-edged sword?. *Rheumatology (Oxford).* Aug;41(8):857-68. PMID: 12154202.
102. Oldstone MB (1998) Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J.* Oct;12(13):1255-65. PMID: 9761770.
103. Khan MA (2002) Update on spondyloarthropathies. *Ann Intern Med.* Jun 18;136(12):896-907. PMID: 12069564.
104. Oldstone MB, Tishon A, Dutko FJ, Kennedy SI, Holland JJ, Lampert PW (1980) Does the major histocompatibility complex serve as a specific receptor for Semliki Forest virus? *J Virol.* Apr;34(1):256-65. PMID: 7373708.
105. Donohoue PA, Guethlein L, Collins MM, Van Dop C, Migeon CJ, Bias WB, Schmeckpeper BJ (1995) The HLA-A3, Cw6, B47, DR7 extended haplotypes in salt losing 21-hydroxylase deficiency and in the Old Order Amish: identical class I antigens and class II alleles with at least two crossover sites in the class III region. *Tissue Antigens.* Sep;46(3 (Pt 1)):163-72. PMID: 8525475.
106. Hill AV (1998a) Host genetics of infectious diseases: old and new approaches converge. *Emerg Infect Dis.* Oct-Dec;4(4):695-7. PMID: 9866752.
107. Vyse TJ and Morley BJ (2000) The analysis of genetic susceptibility. In: Academic press editors. *HLA in health and disease.* 107-128

108. Falfán-Valencia R (2004) MHC: Polimorfismos genéticos en autoinmunidad. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* Abril-junio;17(2):126-134
109. Selman M (2000) Clasificación actual de las neumonías intersticiales idiopáticas. *Arch Bronconeumol*. Nov;36(10):543-4. PMID: 11149195.
110. Swigris JJ, Kuschner WG, Kelsey JL, Gould MK (2005) Idiopathic pulmonary fibrosis: challenges and opportunities for the clinician and investigator. *Chest* Jan;127(1):275-83. PMID: 15653995.
111. Perez A, Rogers RM, Dauber JH (2003) The prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 29(3 Suppl):S19-26. PMID: 14503549.
112. Mannino DM, Etzel RA, Parrish RG (1996) Pulmonary fibrosis deaths in the United States, 1979-1991. An analysis of multiple-cause mortality data. *Am J Respir Crit Care Med* 153:1548-1552. PMID: 8630600.
113. Baumgartner KB, Samet JM, Stidley CA, Colby TV, Waldron JA (1997) Cigarette smoking: a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 155:242-248. PMID: 9001319.
114. Selman M (2001) Idiopathic pulmonary fibrosis challenges for the future. *Chest*. Jul;120(1):8-10. PMID: 11451806.
115. Selman M, Thannickal VJ, Pardo A, Zisman DA, Martinez FJ, Lynch JP (2004) Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs*. 2004; 64:405-430. PMID: 14969575.
116. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001;134:136-151. PMID: 11177318.
117. Pardo A, Selman M (2002) Molecular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Front Biosci*. Aug 1;7:d1743-61. PMID: 12133818.
118. Selman M, Pardo A (2002) Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res*. 3(1):3. PMID: 11806838.
119. Pardo A, Selman M (2002) Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights in its pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. Dec;34(12):1534-8. PMID: 12379275.
120. Raghu G, Hert R (1993) Interstitial lung diseases: genetic predisposition and inherited interstitial lung diseases. *Sem Respir Dis* 14:323.
121. du Bois RM (2002). The genetic predisposition to interstitial lung disease: functional relevance. *Chest*. 121:14S-20S. PMID: 11893655.

122. Tisdale JE, Follin SL, Ordelova A, Webb CR (1995) Risk factors for the development of specific noncardiovascular adverse effects associated with amiodorane. *J Clin Pharmacol* 35:351-356. PMID: 7650222.
123. Haston CK, Amos CI, King TM, Travis EL (1996) Inheritance of susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the mouse. *Cancer Res* 56:2596-601. PMID: 8653703.
124. Haston CK, Travis EL (1997) Murine susceptibility to radiation-induced pulmonary fibrosis is influenced by a genetic factor implicated in susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Cancer Res* 57:5286-5291. PMID: 9393751.
125. Haston CK, Zhou X, Gumbiner-Russo L, Irani R, Dejournett R, Gu X, Weil M, Amos CI, Travis EL (2002) Universal and radiation-specific *loci* influence murine susceptibility to radiation-induced pulmonary fibrosis. *Cancer Res.* 62:3782-3788. PMID: 12097289.
126. Warshamana GS, Pociask DA, Sime P, Schwartz DA, Brody AR (2002) Susceptibility to asbestos-induced and transforming growth factor-beta1-induced fibroproliferative lung disease in two strains of mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 27:705-713. PMID: 12444030.
127. Kolb M, Bonniaud P, Galt T, Sime PJ, Kelly MM, Margetts PJ, Gauldie J (2002) Differences in the fibrogenic response after transfer of active transforming growth factor-beta1 gene to lungs of "fibrosis-prone" and "fibrosis-resistant" mouse strains. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 27:141-150. PMID: 12151305.
128. Hodgson U, Laitinen T, Tukiainen P (2002). Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis: evidence of founder effect among multiplex families in Finland. *Thorax* 57:338-342. PMID: 11923553.
129. Marshall RP, Puddicombe A, Cookson WO, Laurent GJ (2000) Adult familial cryptogenic fibrosing alveolitis in the United Kingdom. *Thorax* 55:143-146. PMID: 10639533.
130. Javaheri S, Lederer DH, Pella JA, Mark GJ, Levine BW (1980) Idiopathic pulmonary fibrosis in monozygotic twins. The importance of genetic predisposition. *Chest* 78:591-594. PMID: 7191366.
131. Solliday NH, Williams JA, Gaensler EA, Coutu RE, Carrington CB (1973) Familial chronic interstitial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 108:193. PMID: 4198347.

132. Uchiyama B, Mori Y, Sakai T (1995) Unexpectedly high incidence of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) among siblings of patients with IPF in Japan. *Am J Respir Crit Care Med* 151:A689.
133. Musk AW, Zilko PJ, Manners P, Kay PH, Kamboh MI (1986) Genetic studies in familial fibrosing alveolitis. Possible linkage with immunoglobulin allotypes (GM). *Chest* 89:206. PMID: 3484694.
134. Selman M, Lin HM, Montano M, Jenkins AL, Estrada A, Lin Z, Wang G, Di Angelo SL, Guo X, Umstead TM, Lang CM, Pardo A, Phelps DS, Floros J (2003) Surfactant protein A and B genetic variants predispose to idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Genet.* Nov;113(6):542-50. PMID: 13680361.
135. Zorzetto M, Ferrarotti I, Trisolini R, Agli LL, Scabini R, Novo M, De Silvestri A, Patelli M, Martinetti M, Cuccia M, Poletti V, Pozzi E, Luisetti M (2003) Complement receptor 1 gene polymorphisms are associated with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* Aug 1;168(3):330-4. PMID: 12773320.
136. Xaubet A, Marin-Arguedas A, Lario S, Ancochea J, Morell F, Ruiz-Manzano J, Rodriguez-Becerra E, Rodriguez-Arias JM, Inigo P, Sanz S, Campistol JM, Mullol J, Picado C (2003) Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168:431-435. PMID: 12746254.
137. Hutyrova B, Pantelidis P, Drabek J, Zurkova M, Kolek V, Lenhart K, Welsh KI, du Bois RM, Petrek M (2002) Interleukin-1 gene cluster polymorphisms in sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* Jan 15;165(2):148-51. PMID: 11790645.
138. Pantelidis P, Fanning GC, Wells AU, Welsh KI, du Bois RM (2001) Analysis of tumor necrosis factor-alpha, lymphotoxin-alpha, tumor necrosis factor receptor II, and interleukin-6 polymorphisms in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 163:1432-1436. PMID: 11371414.
139. Whyte M, Hubbard R, Meliconi R, Whidborne M, Eaton V, Bingle C, Timms J, Duff G, Facchini A, Pacilli A, Fabbri M, Hall I, Britton J, Johnston I, Di Giovine F (2000) Increased risk of fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms. *Am J Respir Crit Care Med.* Aug;162(2 Pt 1):755-8. PMID: 10934117.

140. Libby DM, Gibofsky A, Fotino M, Waters SJ, Smith JP (1983) Immunogenetic and clinical findings in idiopathic pulmonary fibrosis. Association with the B-cell alloantigen HLA-DR2. *Am Rev Respir Dis.* May;127(5):618-22. PMID: 6405666.
141. Varpela E, Tiilikainen A, Varpela M, Tukiainen P (1979) High prevalence of HLA-B15 and HLA-Dw6 in patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Tissue Antigens.* Jul;14(1):68-71. PMID: 91222.
142. Fulmer JD, Sposovska MS, von Gal ER, Crystal RG, Mittal KK (1978) Distribution of HLA antigens in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* Jul;118(1):141-7. PMID: 677553.
143. Turton CW, Morris LM, Lawler SD, Turner-Warwick M (1978) HLA in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet.* Mar 4;1(8062):507-8. PMID: 76058.
144. Chiou SK, White E (1998) Inhibition of ICE-like proteases inhibits apoptosis and increases virus production during adenovirus infection. *Virology.* Apr 25;244(1):108-18. PMID: 9581784
145. Blankenberg FG, Tait J, Ohtsuki K, Strauss HW (2000) Apoptosis: the importance of nuclear medicine. *Nucl Med Commun.* Mar;21(3):241-50. PMID: 10823326
146. Kim KS. (2002) Multifunctional role of Fas-associated death domain protein in apoptosis. *J Biochem Mol Biol.* Jan 31;35(1):1-6. PMID: 16248963
147. Van Parijs L, Abbas AK (1996) Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. *Curr Opin Immunol.* 1996 Jun;8(3):355-61. PMID: 8793992
148. Cho SG, Choi EJ (2002) Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. *J Biochem Mol Biol.* Jan 31;35(1):24-7. PMID: 16248966
149. Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science.* Aug 28;281(5381):1312-6. PMID: 9721091
150. Tesfaigzi Y (2006) Roles of apoptosis in airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* May;34(5):537-47. Epub 2006 Jan 26. PMID: 16439804
151. Xie W, Jiang P, Miao L, Zhao Y, Zhimin Z, Qing L, Zhu WG, Wu M (2006) Novel link between E2F1 and Smac/DIABLO: proapoptotic Smac/DIABLO is transcriptionally upregulated by E2F1. *Nucleic Acids Res.* Apr 14;34(7):2046-55. PMID: 16617145
152. Saraste A, Pulkki K (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* Feb;45(3):528-37. PMID: 10728374

153. Nakano R (1997) Apoptosis: gene-directed cell death. An overview. *Horm Res.* 48 Suppl 3:2-4. PMID: 9267809
154. Barrera ML, Drago ME, Pérez J, Zamora AC, Gómez F, Sainz T, Mendoza-Pérez F (2004) Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Ins Nal Enf Resp Mex* 17 (1):42-55
155. Orfao A, Ciudad J, López A, López-Berges MC, Vidriales B, Macedo A, et al (1993) La citometría de flujo en el diagnóstico clínico. Servicio General de Citometría. Universidad de Salamanca.
156. Goding JS (1976) Conjugation of antibodies with fluorochromes modifications to the standard methods. *J Immunol Meths* 13:215-223.
157. Shapiro HM (2003) *Practical Flow Cytometry*. 4th ed. New Jersey: Wiley-Liss, Hoboken.
158. Kohler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* Aug 7;256(5517):495-7. PMID: 1172191
159. Longobardi GA (1992) *Flow Cytometry. First Principles*. New Cork: Willey-Liss.
160. Asbury CL, Esposito R, Farmer C, van den Engh G (1996) Fluorescent spectra of DNA dyes measured in a flow cytometry. *Cytometry* 24:234-242. PMID: 8800556
161. McCloskey TW, Oyaizu N, Coronese M, Pahwa S (1994) Use of a Flow Cytometric Assay to Quantitate Apoptosis in Human Lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 71:14-18. PMID: 8137555
162. Rotaeche A, Costabel D (1997) Bronchoalveolar lavage in diagnostic cytology. *Compendium on Diagnostic Cytology*. 8th ed. Chicago IL: Tutorials of Cytology.
163. Wallaert B (1991) Value of bronchoalveolar lavage in the diagnosis and management of diffuse interstitial fibrosing lung diseases. *Rev Prat* 41:1267-1270. PMID: 2068518
164. Walters EH, Ward C, Li X (1996) Bronchoalveolar lavage in asthma research. *Respirology* 1:233-245. PMID: 9441112
165. Gruchala J, Górski P (1995) Use of bronchoalveolar lavage for diagnosis of respiratory diseases. *Med Pr* 46:173-178. PMID: 7637637
166. Luisetti M, Meloni F, Ballabio P, Leo G (1993) Role of bronchial and bronchoalveolar lavage in chronic obstructive lung diseases. *Monaldi Arch Chest Dis* 48:54-57. PMID: 8472065

167. Strausz J (1992) Bronchoalveolar lavage: Clinical routine examination or research method?. *Orv Hetil* 133:471-2,477-8. PMID: 1542511
168. Drent M, Costabel U (1998) Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of difusse interstitial lung disease. *Ned Tijdschr Geneesk* 142:2661-2665. PMID: 10065220
169. Wahlström J, Berlin M, Sköld CM, Wigzell H, Eklund A, Grunewald J (1999) Phenotipic analysis of lymphocytes and monocytes/macrophages in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary sarcoidosis. *Thorax* 54:339-346. PMID: 10092696
170. Hoser G, Kawiak J, Domagala-Kulawik J, Kopinski P, Droszcz W (1999) Flow cytometric evaluation of lymphocyte subpopulations in BALF of healthy smokers and nonsmokers. *Folia Histochem Cytobiol* 37:25-30. PMID: 10091947
171. Wahlstrom J, Berlin M, Lundgren R, Olerup O, Wigzell H, Eklund A, et al (1997) Lung and blood T-cell receptor repertoire in extrinsic allergic alveolitis. *Eur Respir J* 10:772-779. PMID: 9150312
172. Amiel JL (1967) Study of the leukocyte phenotypes in Hodgkin's disease. In: *Histocompatibility testing 1967*. (Ed. Curtoni, Mattiuz and Tosi) pp. 77-81. Munksgaard, Copenhagen.
173. Tiwari JL y Terasaski PI (1985) *HLA and disease associations*. Springer Verlag Berlin.
174. Barret JH, Thomson W and Ollier W (1997) HLA and disease association: Statistical considerations. In: *Histocompatibility testing 1997*. (Ed. Curtoni, Mattiuz and Tosi) pp. 439-452.
175. Meiser B, Dunn S (2000) Psychological impact of genetic testing for Huntington's disease: an update of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. Nov;69(5):574-8. PMID: 11032605
176. MacGregor A, Ollier W, Thomson W, Jawaheer D, Silman A (1995) HLA-DRB1*0401/0404 genotype and rheumatoid arthritis: increased association in men, young age at onset, and disease severity. *J Rheumatol*. Jun;22(6):1032-6. PMID: 7674226
177. Gorodezky C (2001) Métodos para el análisis del complejo HLA. En: *Bibliografía de XVI curso teórico práctico de genética molecular*. (Ed. Fundación comparte vida A. C.) pp. 5-9. México.

178. Spiegel MR (1991) Estadística. 2ª. Edición (Ed. Mc Graw Hill) pp. 268-270. México.
179. Johnson R (1999) Estadística elemental. (Grupo editorial Iberoamérica) pp.331, 332, 403-405. México.
180. Matthews JN, Altman DG (1996) Statistics notes. Interaction 2: Compare effect sizes not P values. *BMJ*. Sep 28;313(7060):808. PMID: 8842080
181. Altman DG, Bland JM (1996) Presentation of numerical data. *BMJ*. 1996 Mar 2;312(7030):572. PMID: 8595293
182. Altman DG, Deeks JJ, Sackett DL (1998) Odds ratios should be avoided when events are common. *BMJ*. Nov 7;317(7168):1318. PMID: 9804732
183. Bland JM, Altman DG (2000) Statistics notes. The odds ratio. *BMJ*. May 27;320(7247):1468. PMID: 10827061
184. Bland JM, Altman DG (1996) The use of transformation when comparing two means. *BMJ*. 1996 May 4;312(7039):1153. PMID: 8620137
185. Bland JM, Altman DG (1996) Transformations, means, and confidence intervals. *BMJ*. Apr 27;312(7038):1079. PMID: 8616417
186. Bland JM, Altman DG (1996) Statistics notes. Logarithms. *BMJ*. Mar 16;312(7032):700. Review PMID: 8597743
187. American Thoracic Society (2000) Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med*. Feb;161(2 Pt 1):646-64. PMID: 10673212.
188. Katzenstein AL, Myers JL (1998) Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med*. Apr;157(4 Pt 1):1301-15. PMID: 9563754.
189. Robinson J, Malik A, Parham P, Bodmer JG, Marsh SG (2000) IMGT/HLA database--a sequence database for the human major histocompatibility complex. *Tissue Antigens*. Mar;55(3):280-7. PMID: 10777106
190. Olerup O, Aldener A, Fogdell A (1993) HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens*. Mar;41(3):119-34. PMID: 8316943.
191. Zetterquist H, Bengtsson M, Backstrom G, Egle-Jansson I, Ekdahl AM, Grunnet N, Gustafsson I, Knutsen I, Kuhle A, Rydberg L, Spurkland A, Steffensen R,

- Storgards M, Szojmer E, Soderholm G, Thuresson B, Turesson H, Olerup O (1997) Report from the HLA class II typing by PCR-SSP Multicentre Study. *Eur J Immunogenet.* Jun;24(3):191-9. PMID: 9226125.
192. Pardo A, Barrios R, Gaxiola M, Segura-Valdez L, Carrillo G, Estrada A, Mejia M, Selman M (2000) Increase of lung neutrophils in hypersensitivity pneumonitis is associated with lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* May;161(5):1698-704. PMID: 10806177.
193. Vazquez de Lara L, Becerril C, Montano M, Ramos C, Maldonado V, Melendez J, Phelps DS, Pardo A, Selman M (2000) Surfactant components modulate fibroblast apoptosis and type I collagen and collagenase-1 expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Nov;279(5):L950-7. PMID: 11053032.
194. Alaez C, Vazquez-Garcia MN, Gorodezky C (2001) DQA1 and DQB1 promoter diversity and linkage disequilibrium with class II haplotypes in Mexican Mestizo population. *Genes Immun.* Jun;2(4):216-21. PMID: 11477477.
195. Alaez C, Infante E, Pujol J, Duran C, Navarro JL, Gorodezky C (2002) Molecular analysis of HLA-DRB1, DQA1, DQB1, DQ promoter polymorphism and extended class I/class II haplotypes in the Seri Indians from Northwest Mexico. *Tissue Antigens.* May;59(5):388-96. PMID: 12144622.
196. Vargas-Alarcon G, Hernandez-Pacheco G, Zuniga J, Rodriguez-Perez JM, Perez-Hernandez N, Rangel C, Villarreal-Garza C, Martinez-Laso J, Granados J, Arnaiz-Villena A (2003) Distribution of HLA-B alleles in Mexican Amerindian populations. *Immunogenetics.* Feb;54(11):756-60. PMID: 12618907.
197. Selman M, Estrada A, Mejía M, Gaxiola M, Suárez T, Alonso D, Navarro C, Pardo A, Carrillo G (2005) Accelerated idiopathic pulmonary fibrosis represents a distinct subtype of IPF. *Proc Am Thorac Soc* 2:A243.
198. Williams K, Malarkey D, Cohn L, Patrick D, Dye J, Toews G (2004) Identification of spontaneous feline idiopathic pulmonary fibrosis: morphology and ultrastructural evidence for a type II pneumocyte defect. *Chest* 25:2278-22. PMID: 15189952.
199. Avila JJ, Lympany PA, Pantelidis P, Welsh KI, Black CM, du Bois RM (1999) Fibronectin gene polymorphisms associated with fibrosing alveolitis in systemic sclerosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Jan;20(1):106-12. PMID: 9870923.

200. Latsi P, Pantelidis P, Vassilakis D, Sato H, Welsh KI, du Bois RM (2003) Analysis of IL-12 p40 subunit gene and IFN-gamma G5644A polymorphisms in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Respir Res.* 4(1):6. PMID: 12914676.
201. Hodgson U, Tukiainen P, Laitinen T (2005) The polymorphism C5507G of complement receptor 1 does not explain idiopathic pulmonary fibrosis among the Finns. *Respir Med.* Mar;99(3):265-7. PMID: 15733500.
202. Grutters JC, du Bois RM (2005) Genetics of fibrosing lung diseases. *Eur Respir J.* 25:915-927. PMID: 15863652.
203. Chibbar R, Shih F, Baga M, Torlakovic E, Ramlall K, Skomro R, Cockcroft DW, Lemire EG (2004) Nonspecific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia with mutation in surfactant protein C in familial pulmonary fibrosis. *Mod Pathol* 17:973-980. PMID: 15133475.
204. Vargas-Alarcon G, Gamboa R, Zuniga J, Hernandez-Pacheco G, Ramos-Kuri M, Castillo E, Gomez-Casado E, Martinez-Laso J, Arnaiz-Villena A, Granados J (2000) HLA-DR4 allele frequencies on Indian and Mestizo population from Mexico. *Hum Immunol.* Mar;61(3):341-4. PMID: 10689126.
205. Cerna M, Falco M, Friedman H, Raimondi E, Maccagno A, Fernandez-Vina M, Stastny P (1993) Differences in HLA class II alleles of isolated South American Indian populations from Brazil and Argentina. *Hum Immunol.* Aug;37(4):213-20. PMID: 8300406.
206. De Leo C, Castelan N, Lopez M, Gonzalez N, Weckmann AL, Melin-Aldana H, Vargas-Alarcon G, Bordes J, Alarcon-Segovia D, Granados J, Ramirez E, Lisker R (1997) HLA class I and class II alleles and haplotypes in Mexican mestizos established from serological typing of 50 families. *Hum Biol.* Dec;69(6):809-18. PMID: 9353976.
207. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ (1987) The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* Nov;30(11):1205-13. PMID: 2446635.
208. Gregersen PK, Moriuchi T, Karr RW, Obata F, Moriuchi J, Maccari J, Goldberg D, Winchester RJ, Silver J. (1986) Polymorphism of HLA-DR beta chains in DR4, -7, and -9 haplotypes: implications for the mechanisms of allelic variation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec;83(23):9149-53. PMID: 3466180.

209. Uchigata Y, Hirata Y, Omori Y, Iwamoto Y, Tokunaga K (2000) Worldwide differences in the incidence of insulin autoimmune syndrome (Hirata disease) with respect to the evolution of HLA-DR4 alleles. *Hum Immunol.* Feb;61(2):154-7. PMID: 10717808.
210. Zanelli E, Breedveld FC, de Vries RR (2000) HLA association with autoimmune disease: a failure to protect? *Rheumatology (Oxford).* Oct;39(10):1060-6. PMID: 11035123.
211. Glicklich D, Haskell L, Senitzer D, Weiss RA (1988) Possible genetic predisposition to idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis.* Jul;12(1):26-30. PMID: 3260448.
212. Gerbase-DeLima M, Pereira-Santos A, Sesso R, Temin J, Aragao ES, Ajzen H (1998) Idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HLA antigens. *Braz J Med Biol Res.* Mar;31(3):387-9. PMID: 9698788.
213. Uhal BD, Joshi I, Hughes WF, Ramos C, Pardo A, Selman M (1998) Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am J Physiol.* Dec;275(6 Pt 1):L1192-9. PMID: 9843857.
214. Barbas-Filho JV, Ferreira MA, Sesso A, Kairalla RA, Carvalho CR, Capelozzi VL (2001) Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IFP)/usual interstitial pneumonia (UIP). *J Clin Pathol.* Feb;54(2):132-8. PMID: 11215282.
215. Maeyama T, Kuwano K, Kawasaki M, Kunitake R, Hagimoto N, Matsuba T, Yoshimi M, Inoshima I, Yoshida K, Hara N (2001) Upregulation of Fas-signalling molecules in lung epithelial cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* Feb;17(2):180-9. PMID: 11334117.
216. Wang R, Ramos C, Joshi I, Zagariya A, Pardo A, Selman M, Uhal BD (1999) Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *Am J Physiol* 277:L1158-1164. PMID: 10600886.
217. Drenou B, Blancheteau V, Burgess DH, Fauchet R, Charron DJ, Mooney NA (1999) A caspase-independent pathway of MHC class II antigen-mediated apoptosis of human B lymphocytes. *J Immunol.* Oct 15;163(8):4115-24. PMID: 10510346.
218. Blancheteau V, Charron D, Mooney N (2002) HLA class II signals sensitize B lymphocytes to apoptosis via Fas/CD95 by increasing FADD recruitment to activated Fas and activation of caspases. *Hum Immunol.* May;63(5):375-83. PMID: 11975981.

219. Kallenberg CG, Schilizzi BM, Beaumont F, De Leij L, Poppema S, The TH (1987) Expression of class II major histocompatibility complex antigens on alveolar epithelium in interstitial lung disease: relevance to pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol.* Jul;40(7):725-33. PMID: 3305583
220. Nakayama A, Nagura H, Yokoi T, Ito M, Asai J (1992) Immunocytochemical observation of paraquat-induced alveolitis with special reference to class II MHC antigens. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 61(6):389-96. PMID: 1349778.
221. Rebhan M, Chalifa-Caspi V, Prilusky J, Lancet D (1997) Gene-Cards: encyclopedia for genes, proteins and diseases. Weizmann Institute of Science. Bioinformatics Unit and Genome Center (Rehovot, Israel), World Wide Web URL: <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards>, última actualización: Enero 11 2005.
222. Herreman A, Hartmann D, Annaert W, Saftig P, Craessaerts K, Serneels L, Umans L, Schrijvers V, Checler F, Vanderstichele H, Baekelandt V, Dressel R, Cupers P, Huylebroeck D, Zwijsen A, Van Leuven F, De Strooper B (1999) Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 12;96(21):11872-7. PMID: 10518543.
223. Wu YH, Shih SF, Lin JY (2004) Ricin triggers apoptotic morphological changes through caspase-3 cleavage of BAT3. *J Biol Chem.* Apr 30;279(18):19264-75. PMID: 14960581.

Anexo 2. Tablas de interpretación de bandeos para HLA-DRB1



BIO-SYNTHESIS
INCORPORATED

- R.L

Kit Lot No. _____

Fastype™ DR "Low Resolution" Typing Sheet

Exp. Date _____

Positive Band (Default Size) Second Positive Band (Lower Band Size) Weak Amplification Partial Amplification Primer Sequence Unknown (See Specificity Table for details)

Serology Equivalents	Class II DRB Alleles Amplified	Primer Mix Number																										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
DR1	*010101-010203, *0104-0111	+																										
DRB103	*0103		+																									
DR15 (2)	*150101-1515			+																								
DR18 (2)	*180101-1808				+																							
DR17 (3)	*030101-030102, *0304, *0305, *0307, *0309, *0311- *0312, *0314-0316, *0318-0325, *0326					+																						
DR18 (3)	*030201-0303						+																					
	*0305, *0317, *0325, *0327							+																				
	*0309								+																			
DR4	*040101-0414, *0416-0480								+																			
	*0415									+																		
DR11	*110101-110105, *1103-1112, *1114, *1115, *1119, *1120, *1123, *1124, *1127-1129, *1131-1133, *1137, *1138, *1145, *1149, *1151									+																		
	*1102-110402, *1105, *1116, *1118, *1121, *1125, *1126, *1128, *1140, *1141, *1143, *1144, *1146- *1148, *1150										+																	
	*1105, *1108, *1125, *1130, *1153											+																
	*1107												+															
	*1113, *1134, *1136, *1142													+														
	*1117, *1152														+													
	*1122															+												
	DR12	*120101-120302, *1205-1209																										
	DR13	*130101-1303, *1310-1316, *1319, *1321-1324, *1327, *1328, *1330-1342, *1346-1355, *1357- *1359, *1361-1364																										
		*1309, *1320, *1325, *1329, *1344, *1356																										
*1317																												
*1318																												
*1325, *1345																												
DR14	*140101, *140102, *1404, *140701, *140702, *1426, *1428, *1435, *1438, *1439																											
	*1402, *1406, *1409, *1413, *1417, *1428, *1430, *1447																											
	*140301, *140302, *1412																											
	*140501, *1408, *1443, *1444, *1445																											
	*140502, *1414, *1423, *1436, *1442																											
	*1410																											
	*1411																											
	*1415																											
	*1416, *1422																											
	*1418																											
	*1419-1421, *1424, *1441																											
	*1425																											
	*1427																											
*1431-1432																												
*1433																												
*1440																												
*1446, *1448																												
DR7	*070101-0703																											
DR8	*080101-080102, *080302, *0814, *0816, *0817, *0823, *0827																											
	*080201-080203, *0807, *0808, *0811, *0813, *0815, *0819																											
	*080401-080404, *0828																											
	*0815, *0818																											
	*0805, *0810, *0812, *0822																											
	*0809, *0821																											
DR9	DRB1*090102-0903																											
DR10	DRB1*100101-100102																											
DR51	DRB1*010101-0112, *0202-0205																											
	DRB1*0113																											
DR52	DRB1*010101-0111, *0201-0203, *0205-0218, *030101-0302																											
	DRB1*0204, *0219, *0303																											
	DRB1*0218																											
DR53	DRB1*010101, *0106																											
	DRB1*0102-0105, *0107																											
	DRB1*0201N, *0301N																											
C.C	DRB1/DRB1 DNA & Carry-over Contamination																											

Reference:
Nomenclatures are according to HLA alleles listed in the JUL 2004 IMGT/HLA database Alignment (Marsh et al., "HLA Class I and II Sequence Alignments JUL 2004 Update")
<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/data.html>

Revised1104

FOR RESEARCH USE ONLY

Anexo 4. Glosario de términos

Alelo: Forma alternativa de un gen situado en un locus particular en un par de cromosomas homólogos. Se segrega durante la meiosis donde el hijo recibe uno de cada par de alelos de cada progenitor.

Amplificación: 1. Replicación de un banco genómico en masa; 2. Generación de múltiples copias de un gen.

Anticodón: Triplete de nucleótidos en el RNA_t que se asocia durante el proceso de traducción por complementariedad de bases con el codón en el RNA_m.

Antiparalelo: Situación de las moléculas que están en paralelo pero que apuntan en direcciones opuestas (las cadenas de la doble hélice del DNA, están en sentido antiparalelo).

Apareamiento de bases: En la doble hélice del DNA la Adenina se aparea con Timina y Guanina con Citosina; en el RNA la Adenina se aparea siempre con el Uracilo. La especificidad del apareamiento de bases es fundamental para la replicación del DNA y en la traducción del RNA_m durante la síntesis proteica.

Autosomas: Cromosomas no sexuales. La especie humana tiene 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales.

Cariotipo: Serie de Cromosomas en un individuo. El término se emplea a menudo para designar la microfotografía de los cromosomas dispuestos según una clasificación estándar.

Caso índice: Es el primer paciente que se identifica en una familia donde puede haber más afectados. En inglés se utiliza el término "*Proband*".

Cebador: Pequeña cadena de nucleótidos a partir del cual, la DNA polimerasa inicia la síntesis de una molécula nueva de DNA. También es denominado "*primer*", término utilizado en inglés.

Centimorgan: Unidad de longitud física en el mapa de un cromosoma, que equivale a una frecuencia de 1% de la recombinación entre genes ligados, también ha sido denominada unidad de mapeo y es simbolizada como Cm.

Centrómero: Pequeña masa de cromatina situada en el interior de un cromosoma y a la que se unen las dos cromátides. El centrómero ocupa una porción característica en todo cromosoma. Es la última parte del cromosoma que se divide y por medio de la cual se fija al huso. Divide al brazo corto del largo en el cromosoma.

Codón: Grupo de tres nucleótidos sucesivos en el DNA o el RNA, que codifica para un aminoácido específico.

Codominancia: La co-expresión de dos determinantes dominantes. En los grupos AB0, A y B son dominantes sobre el 0, pero codominantes entre sí.

Cromosoma: Estructura intranuclear que retiene colorante y contiene el material genético. El núcleo es un organelo en el que se hallan los cromosomas.

Cromosoma sexual: Cada uno de los cromosomas responsables del sexo. (En los seres humanos: XX para la mujer; XY para el varón.)

Cromosoma X, ligado al: Los genes situados en el cromosoma X o los caracteres dominados por éstos, decimos que se hallan ligados al cromosoma X.

Degeneración del código genético: Término empleado para indicar que más de un codón puede codificar el mismo aminoácido.

Desequilibrio de enlace o de ligamiento: La asociación de alelos resultante del ligamiento cercano entre loci distintos. Los alelos segregan juntos en un mismo haplotipo dependiendo de la distancia existente entre ellos.

DNA: (Ácido Desoxirribonucleico) Ácido nucleico de los cromosomas; contiene codificada la información genética de la célula.

DNA complementario: (DNA_c) Molécula de DNA de una sola cadena sintetizada utilizando como molde una molécula de RNA_m y la acción de la transcriptasa inversa.

DNA polimerasa: Enzima que tiene la capacidad de sintetizar una cadena nueva de DNA complementaria a otra ya existente a partir de una pequeña cadena de nucleótidos unidos al molde por complementariedad de las bases. Hay diferentes enzimas con capacidad DNA polimerasa, algunas de ellas están relacionadas con la síntesis de DNA, otras se relacionan con su reparación.

Dominante: Se dice de un rasgo cuando la manifestación del alelo del gen que lo determina se refleja en el fenotipo. Un alelo que se manifiesta de igual manera en el homocigoto y en el heterocigoto. Se usa en la genética humana para señalar las unidades genéticas que se manifiestan en el heterocigoto.

Entrecruzamiento: Intercambio de material genético entre los miembros de un par cromosómico.

Epitopo: Determinante antigénico de estructura conocida. Es la parte del antígeno que se une al parátopo.

Exón: Porción de DNA que codifica RNA_m maduro. La región codificadora de un gen.

Fenotipo: 1. Lo que parece existir en cierto locus, es decir lo que se expresa. Lo que realmente existe es la combinación de dos genotipos, (uno heredado de cada progenitor). 2. Naturaleza física, bioquímica y fisiológica de un individuo, determinada tanto por su genotipo como por el ambiente en el cual se desarrolla.

Frecuencia génica: Define las porciones alélicas en un locus, en una población determinada.

Gen: Unidad de DNA que codifica un cierto producto, usualmente una proteína.

Gen estructural: Gen que determina la estructura primaria (la secuencia de aminoácidos) de un polipéptido.

Gen regulador: Gen cuyo producto participa en la regulación de otro gen; por ejemplo un gen represor.

Genoma: Todo el material genético contenido en los cromosomas de un organismo particular.

Genotipo: 1. La contribución genética a la descendencia. 2. Constitución genética (genoma) o más precisamente los alelos presentes en los loci.

Haplotipo: 1. Combinación de alelos de loci estrechamente unidos, usualmente con alguna afinidad funcional. 2. Contribución genética de uno de los padres a la descendencia de un grupo de loci muy ligados entre sí. Ejemplo: los loci HLA.

Heterocigoto: Individuo que tiene dos alelos diferentes en un determinado locus de un par de cromosomas homólogos.

Homocigoto: Individuo que posee los dos alelos idénticos en un determinado locus de un par de cromosomas homólogos.

Intrón: Porción del gen que se transcribe pero que no aparece en el RNA_m maduro, pues se elimina durante el procesamiento del mismo.

Loci: Plural de locus.

Locus: Localización exacta del gen en un cromosoma. Los alelos ocupan siempre la misma posición o locus en el cromosoma.

Meiosis: Tipo de división celular que ocurre en las gónadas en la que a partir de células diploides se forman los gametos que contienen un número haploide de cromosomas. Existen dos divisiones meióticas (I y II). La reducción del número de cromosomas ocurre durante la meiosis I. Al final de la meiosis hay 4 células cada una de las cuales tiene la mitad del número de cromosomas de la célula original.

Mitosis: División de las células somáticas de la que resulta la formación de dos células hijas, cada una de las cuales posee el mismo complemento de cromosomas que la célula madre.

Mutación: Cambio permanente y hereditario del material genético. Definida comúnmente como el cambio en un solo gen (mutación en un punto), aún cuando el término se emplea también para designar un cambio en el número o en la disposición de los cromosomas.

Mutación silenciosa: Mutación de codón que no altera la secuencia de aminoácidos.

Nucleótido: Monómero constituido por una base, un azúcar (pentosa) y un grupo fosfato. Una molécula de ácido nucleico está formada por gran número de éstos nucleótidos unidos por medio de enlaces azúcar-fosfato.

Parátopo: Sección de regiones hipervariables en el anticuerpo que están en contacto con el antígeno.

PCR: Siglas de reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polymerase chain reaction*). Método *in vitro* que permite conseguir múltiples copias de una secuencia determinada de DNA.

Polimorfismo: Presencia de dos o más genotipos alternativos en una población, determinados por factores genéticos y que presentan frecuencias demasiado elevadas para poder ser mantenidos en la población por mutación.

Promotor: Secuencia de DNA a la cual se une la RNA polimerasa para iniciar la transcripción.

Pseudogen: Secuencia similar a un gen pero que no funciona como tal; aparentemente no contribuye al fenotipo y podría ser vestigio de un gen antes funcional.

Recesivo: Se dice que un gen es recesivo si solo se expresa cuando está en su forma homocigótica.

RNA: Ácido Ribonucleico.

Telómero: Unidad terminal en un cromosoma.

Tipo silvestre: Término empleado en genética experimental para indicar el alelo normal (generalmente expresado como +) o el homocigoto normal (+/+).