

11231  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

7  
Lej

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES  
RESPIRATORIAS

SUSCEPTIBILIDAD GENETICA ASOCIADA  
AL COMPLEJO PRINCIPAL DE  
HISTOCOMPATIBILIDAD EN NEUMONITIS  
POR HIPERSENSIBILIDAD

TESIS  
PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE  
ESPECIALIDAD EN NEUMOLOGIA

PRESENTA

DR. GABRIEL SALAZAR GONZALEZ

ASESOR: DR. MOISES SELMAN LAMA

MEXICO, D. F.

MARZO DE 1999

TESIS CON  
FALLA DE OR. EN

271484



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

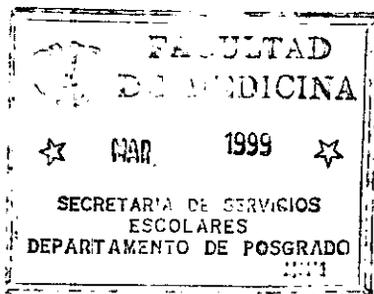
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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.

**SUSCEPTIBILIDAD GENETICA ASOCIADA AL  
COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN  
NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD**

**TESIS PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE  
ESPECIALIDAD EN NEUMOLOGIA**



Alumno: Dr. Gabriel Salazar

Tutor: Dr. Moisés Selman

Cotutor: QFB Angel Camarena

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Selman", with a long horizontal line extending to the right towards the INER stamp.



## AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su gran apoyo para la realización de mis estudios.

A mis profesores por haber compartido conmigo sus conocimientos y experiencias.

A mis compañeros por todo el apoyo que me brindaron en los momentos más difíciles y de duda.

A Dios por haberme iluminado y guiado durante todo el camino recorrido hasta ahora y que me sigue guiando.

### AGRADECIMIENTO ESPECIAL

Dr. Moisés Selman Lama (Asesor de mi tesis)

Dr. Terán (Colaborador)

Angel Camarena (Colaborador)

## **Introducción**

La neumonitis por hipersensibilidad (NH) es una enfermedad inflamatoria difusa del parénquima pulmonar provocada por la inhalación repetida de partículas orgánicas y que afecta a bronquiolos, alveolos y espacio intersticial (1, 2).

Clínicamente, la enfermedad se puede presentar de dos maneras: 1) como un episodio agudo en el cual síntomas respiratorios y sistémicos se presentan abruptamente 6-8 horas después de la exposición y pueden persistir durante varios días; en esta forma, los síntomas son frecuentemente confundidos con neumonía viral o bacteriana y 2) en una forma insidiosa subaguda o crónica que resulta en neumonitis intersticial que puede progresar hacia la fibrosis; esta forma de presentación es caracterizada disnea de esfuerzo progresiva, tos, malestar general, debilidad y pérdida de peso. Las anomalías en la función pulmonar varían desde defectos de la difusión de los gases a grados variables de disfunción predominantemente restrictiva; ocasionalmente, alteraciones obstructivas con cambios similares a los de enfisema pulmonar pueden observarse en pacientes con enfermedad crónica.

## **Agentes etiológicos**

Existe una gran variedad de partículas orgánicas capaces de originar neumonitis por hipersensibilidad. La mayoría de los agentes etiológicos conocidos a la fecha son derivados de exposiciones ocupacionales como por ejemplo en granjas, cosecha de azúcar, trabajos con granos de cereal o productos de la madera y durante el empacamiento de hongos. La enfermedad puede resultar también de la exposición a una calefacción central o unidades de humidificación contaminadas, o puede estar relacionado a aficiones tales como la cría de pichones, exposición que es muy frecuente en nuestro país.

Como ya se mencionó, en México la forma más común de NH es la inducida por la inhalación de proteínas aviarias, en especial de palomas y pichones (1, 2), aunque la enfermedad puede presentarse por exposición a pericos, jilgueros y canarios. De manera muy ocasional se ha asociado a proteínas de pollos, patos, guajolotes y búhos (6-8). Aunque no se sabe cuál es el principal componente antigénico de las aves algunos estudios han sugerido que las inmunoglobulinas aviarias podrían ser las principales proteínas sensibilizadoras. En el caso de las palomas por ejemplo, se ha sugerido que la IgA aviaria podría ser el antígeno predominante contra el que reacciona el ser humano (9). Así, se ha sugerido que la pelusilla que cubre las plumas, la cual está compuesta de partículas muy finas de queratina cubiertas con IgA podría ser el principal componente antigénico de las aves (10). En un estudio reciente realizado en el INER en donde se evaluó la respuesta inmune celular a diferentes fracciones antigénicas de palomas se demostró que la fracción antigénica dominante es una proteína de aproximadamente 220 kDa de peso molecular, la cual reacciona con un anticuerpo IgA (11).

En la actualidad, una amplia variedad de antígenos distintos a los mencionados son reconocidos como capaces de inducir neumonitis por hipersensibilidad. Entre estos están esporas de varias especies de hongos, bacterias, productos de insectos etc. Proteínas de origen bovino o porcino, pueden servir también como fuentes importantes de antígenos en trabajadores de laboratorio o en individuos que usan tales productos para propósitos terapéuticos. Por otra parte, existe evidencia de que la enfermedad puede ocurrir en trabajadores expuestos a reactivos químicos simples como isocianatos y anhídridos. Tales compuestos químicos inhalados en la forma de vapores y aerosoles pueden también inducir asma y rinitis.

Finalmente, se ha encontrado que esta enfermedad se puede producir con la inhalación de *trichosporum cutaneum*, que ha sido consignada por colegas japoneses como neumonitis por hipersensibilidad del verano (12).

## Patogénesis

Los mecanismos por los cuales la inhalación de partículas orgánicas resulta en neumonitis por hipersensibilidad no se conocen con precisión, pero el desarrollo de la enfermedad depende probablemente de una compleja interrelación entre factores relacionados al huésped y ambientales. Entre los factores ambientales se ha sugerido que la exposición a un segundo agente agresor (partícula, virus) puede favorecer la reacción inmunopatológica en contra del antígeno (13). Entre los factores asociados al huésped, se ha demostrado que el embarazo y puerperio influyen de manera importante en el desarrollo de la NH, probablemente por trastornos relacionados con la regulación de la respuesta inmune (14).

Por otro lado, el hecho de que sólo una pequeña parte de la población expuesta a estos antígenos desarrolla la enfermedad, sugiere fuertemente que una predisposición genética puede desempeñar un papel importante en la patogénesis de la NH, lo cual es la base de este trabajo de investigación.

Algunos estudios han sugerido que la susceptibilidad genética está estrechamente relacionada a antígenos HLA codificados por el complejo principal de histocompatibilidad. En un estudio realizado en nuestro instituto se encontró que los pacientes con neumonitis por hipersensibilidad inducida por antígeno aviario presentan un aumento significativo del fenotipo HLA-DR7, asociación que origina un riesgo relativo cercano a cinco (15).

Algunos factores asociados al agente inhalado también son importantes en la enfermedad. Por ejemplo, Denis y colaboradores han demostrado que los antígenos de *M. faeni* estimulan directamente la secreción de algunos factores de crecimiento y citocinas, como el factor de crecimiento transformante beta y el factor de necrosis tumoral alfa por parte de los macrófagos alveolares (16). Estas observaciones pueden explicar algunas de las propiedades adyuvantes de los antígenos provenientes de los actinomicetos. Estos antígenos, así como los

antígenos aviares pueden activar directamente la vía alterna del complemento, lo que trae como consecuencia aumento de la permeabilidad vascular y migración de leucocitos polimorfonucleares al pulmón.

Por otro lado, algunos materiales orgánicos inhalados contienen endotoxinas componentes capaces de liberar histamina, e incluso algunos con actividad enzimática. Las consecuencias inflamatorias de estos elementos pudieran ser importantes factores en la patogénesis de la NH.

El daño pulmonar se produce finalmente por una reacción inmunopatológica mediada por complejos inmunes en el caso de las formas agudas, y por una hiperreactividad de la respuesta inmune celular en las formas subaguda/crónica (17).

Recientes observaciones sugieren que los complejos inmunes pueden estimular la secreción de citocinas proinflamatorias incluyendo a la IL-1 y al FNT $\alpha$  e inducir la formación de granulomas pulmonares (18). Además, los complejos inmunes pueden activar a los macrófagos alveolares y ser un prerrequisito para el desarrollo de las lesiones pulmonares mediadas por células T. Sin embargo, la mayoría de las evidencias a la fecha apoyan el concepto de que la enfermedad en sus formas subaguda y crónica está mediada principalmente por linfocitos T (1, 2, 18-22). Así por ejemplo, agentes o procedimientos capaces de inhibir la reacción de hipersensibilidad mediada por células T tales como los corticoides, ciclosporina, timentomía neonatal, suero antimacrófago, y antisuero específico contra ciertas citocinas proinflamatorias disminuyen marcadamente o previenen el desarrollo de neumonitis por hipersensibilidad en modelos animales (18, 23-25). Además, los hallazgos histopatológicos y de los lavados bronquioalveolares son fuertemente sugestivos de hipersensibilidad mediada por células. Los pacientes exhiben un incremento en el número de linfocitos T y presentan algunos de los fenómenos asociados con inmunidad mediada por células, tales como proliferación de linfocitos y producción de linfocinas cuando

sus células mononucleares son estimuladas *in vitro* con el agente etiológico (26-28).

La respuesta inmunopatológica probablemente es precedida por trastornos en eventos inmunoreguladores. Keller y colaboradores (29) han demostrado que los pacientes con NH inducida por proteínas aviarias muestran una disminución de sus células T supresoras ya sea inducidas por suero de pichones o espontáneas, mientras que los contactos asintomáticos presentan una muy buena respuesta supresora.

### **Características clínicas**

La NH se puede presentar en 3 formas: aguda, subaguda y crónica, las que probablemente son determinadas por la intensidad y frecuencia de exposición a los agentes etiológicos (1, 2). La exposición intermitente, intensa y de corta duración puede causar una presentación aguda, generalmente reversible. Exposición de larga duración con menores concentraciones del antígeno puede llevar a una enfermedad subaguda o crónica.

En la forma aguda, la enfermedad generalmente ocurre siguiendo a una intensa exposición al antígeno. Típicamente el paciente se queja de escalofríos, fiebre, disnea, y malestar general, lo que ocurre 4 a 6 horas después de la exposición. Los síntomas ceden gradualmente entre 18 a 24 hrs. El examen físico de tórax puede ser negativo o revelar estertores crepitantes en ambos campos pulmonares. A causa de similar presentación, la forma aguda puede confundirse con una neumonía atípica o viral. Si no se hace el diagnóstico correcto, el paciente continúa expuesto a la fuente de antígenos, con exacerbaciones repetidas de la enfermedad. En la forma subaguda, el inicio es más insidioso con la presencia de disnea de esfuerzo progresiva, tos, producción de escasa expectoración, malestar general, anorexia, fatiga y pérdida de peso. Estertores crepitantes y subcrepitantes difusos constituyen el principal hallazgo físico. La

forma crónica puede resultar en daño pulmonar irreversible con insuficiencia respiratoria crónica y cor pulmonale.

Un signo relativamente frecuente en las formas subagudas y especialmente crónicas, es el hipocratismo digital. En un estudio realizado por Sansores y asociados (30) se observó la presencia de hipocratismo digital en el 51% de 82 pacientes con neumonitis por hipersensibilidad inducida por antígeno aviario. De manera interesante, el 35% de los pacientes con hipocratismo se deterioró durante su evolución, en comparación con solo un 13% de aquellos sin hipocratismo, lo que sugiere que este signo puede predecir la progresión hacia la fibrosis.

### **Hallazgos radiológicos**

Las anomalías radiológicas varían de acuerdo a las diferentes formas de la enfermedad. En la forma aguda la radiografía puede incluso ser normal, o mostrar una imagen en vidrio despolido o de consolidación en los espacios alveolares. En la forma subaguda la radiografía puede revelar imágenes similares o un patrón nodular fino o reticulonodular. Las formas crónicas se caracterizan por un patrón reticulonodular de predominio reticular y cuando progresan se aprecian áreas quísticas, visibles en el intersticio engrosado y que se describe como pulmón en panal (18, 31).

La tomografía axial computada (TAC) de alta resolución muestra imágenes similares a las descritas en la radiografía, pero es mucho más sensible y específica, y permite un análisis más preciso del patrón, extensión y distribución de las imágenes patológicas, y correlaciona mejor con diferentes parámetros clínicos y funcionales (32-34). Los principales hallazgos tomográficos incluyen un aumento difuso de la densidad del parénquima pulmonar (opacificación tipo vidrio despolido), nódulos pequeños y pobremente definidos, y en las etapas crónicas, opacidades reticulares que pueden progresar hacia la panalización.

La resonancia magnética nuclear (RMN) aunque de menor valor clínico que la TAC para el estudio del parénquima pulmonar, puede ser útil en la detección de infiltrados pulmonares que disminuyen los espacios aéreos. Muller y cols (35) evaluaron las imágenes obtenidas en 25 pacientes con diferentes neumatías intersticiales crónicas, incluyendo 4 con NH, y encontraron que las áreas de opacificación de los espacios aéreos alveolares observados por esta técnica se correlacionaban apropiadamente con áreas de alveolitis activa o infiltrado inflamatorio que ocupaba los espacios aéreos de acuerdo al estudio morfológico. Este hallazgo sugiere que la RMN podría ser útil en el estudio y seguimiento de este tipo de opacidades.

La gammagrafía con galio-67 ha sido usada para evaluar la presencia y extensión de la inflamación en numerosos enfermedades pulmonares intersticiales difusas agudas y crónicas. En el caso de la neumonitis por hipersensibilidad se ha sugerido que la acumulación anormal de galio 67 que demuestra inflamación activa, puede correlacionar con el pronóstico ya que pacientes con alta captación pulmonar de este radioisótopo posteriormente se deterioran (36).

## **Función Pulmonar**

La mecánica respiratoria se caracteriza por una disminución de los volúmenes pulmonares, particularmente la capacidad vital forzada, lo que puede observarse tanto en la forma aguda como en la subaguda/crónica. Asimismo, los pacientes presentan una disminución de la distensibilidad pulmonar (1,2, 37).

En relación al intercambio gaseoso la anormalidad funcional más sensible y temprana está representada por la reducción de la capacidad de difusión de monóxido de carbono la cuál puede ser un buen predictor de la desaturación del oxígeno arterial durante el ejercicio. En este contexto, los pacientes muestran un deterioro en la transferencia alveolocapilar de gases con alteraciones en la relación ventilación/perfusión, con hipoxemia en reposo que habitualmente empeora con el ejercicio, y un incremento en el gradiente alveolo-

arterial de oxígeno (18), La presión arterial de CO<sub>2</sub> puede encontrarse normal o puede existir una ligera hipocapnia. A medida de que la enfermedad progresa hacia la fibrosis, las pruebas funcionales muestran un patrón de predominio restrictivo, con volúmenes pulmonares y capacidad de difusión disminuidas, pero puede haber un elemento adicional de obstrucción de vías aéreas, en especial de las periféricas.

## **Lavado Bronquioalveolar**

El análisis del lavado bronquioalveolar es importante en la evaluación de pacientes con desordenes inflamatorios del tracto respiratorio inferior. En el pulmón normal, la mayoría de las células inflamatorias recuperadas en el líquido del lavado son macrófagos. Típicamente, en no fumadores normales, los macrófagos representan cerca del 85% de las células; un pequeño porcentaje (10-15%) son linfocitos y los leucocitos polimorfonucleares pueden ser 0-1%.

El lavado bronquioalveolar de los pacientes con neumonitis por hipersensibilidad contiene un incremento en el número total de células inflamatorias, con elevación significativa en el porcentaje de linfocitos T, principalmente células CD8<sup>+</sup> (19, 21). Un aumento en la subpoblación CD4<sup>+</sup> (cooperadora) se ha asociado con la NH que progresa a fibrosis (20). El número absoluto de macrófagos puede estar normal o incluso elevado pero en proporción a las otras células inflamatorias se encuentra significativamente disminuido; los macrófagos se encuentran generalmente activados y exhiben alta densidad de expresión de los alelos del sistema HLA DQ y DP (38). Finalmente, un aumento en el porcentaje de neutrófilos se puede observar en algunos pacientes con formas crónicas de esta enfermedad y puede ser indicador de mal pronóstico (39). Desde el punto de vista molecular, el líquido del LBA muestra una elevación de IgG, IgM e IgA, así como de complejos inmunes, leucotrieno C4 y beta 2 microglobulina (18).

## **Histopatología**

Independientemente del agente etiológico, la neumonitis por hipersensibilidad se caracteriza por presentar cambios morfológicos similares, que dependen de la intensidad de la exposición a antígenos y del estadio de la enfermedad al momento de la biopsia (40, 41). En los estadios tempranos de la enfermedad, las lesiones inflamatorias involucran a bronquiolos respiratorios y vasos adyacentes así como a las estructuras alveolares, a menudo con destrucción de sus paredes; asimismo, se observa inflamación intersticial e intraalveolar con predominio de macrófagos en el alvéolo y de linfocitos en el intersticio con una inversión de la relación CD4+/CD8+ (27). Una característica importante es la presencia de granulomas pobremente definidos y poco compactos. Las vías aéreas periféricas pueden estar comprometidas por bronquiolitis obliterante con masas polipoides de tejido inflamatorio y fibrótico ocupando gran parte de la luz de las vías aéreas, o por bronquiolitis constrictiva como ha sido reportado en un estudio reciente realizado en nuestro instituto (42).

## **Diagnóstico.**

Las bases del diagnóstico de la Neumonitis por Hipersensibilidad son cinco:

- 1) Historia de exposición a una fuente antigénica conocida de producir NH con relación causa-efecto.
- 2) Presencia de anticuerpos precipitantes específicos en suero o lavado bronquioalveolar.
- 3) Cuadro clínico compatible con una neumopatía intersticial difusa.
- 4) Lavado bronquioalveolar con linfocitosis superior al 40%.
- 5) Biopsia pulmonar con alteraciones morfológicas compatibles con la enfermedad, y sin datos histopatológicos sugestivos de otra neumopatía intersticial difusa.

## **Tratamiento.**

La base del tratamiento depende fundamentalmente del reconocimiento y eliminación de la situación particular de exposición al agente etiológico. La eliminación del antígeno del ambiente del paciente no solamente ayudará al control de la enfermedad sino también prevendrá la posible sensibilización de otros individuos expuestos.

Cuando el antígeno es de origen laboral se sugiere cambiar al paciente de su ambiente de trabajo. Cuando el paciente no tiene otras alternativas razonables que continuar trabajando a pesar de la exposición el uso de mascarilla facial puede ayudar a disminuir la cantidad de antígeno inhalado.

## **Drogoterapia.**

En general, los episodios agudos remiten espontáneamente si el paciente es removido de la fuente de exposición, o si esta es eliminada. Cuando el ataque agudo es más severo requieren tratamiento con corticosteroides en dosis equivalentes a prednisona, 60 mg/día, más oxígeno, reposo y otros cuidados de rutina. La dosis de prednisona debe ser continuada hasta que haya mejoría clínica significativa y las pruebas de función pulmonar retornen a lo normal. Esto puede requerir 2 a 3 semanas con reducción posterior.

Por otro lado, pocos estudios han evaluado los efectos a largo plazo del tratamiento con corticosteroides en neumonitis por hipersensibilidad crónica, pero en esos casos, la terapia debe continuar por lo menos durante un año a dosis de mantenimiento. En caso de un rebrote inflamatorio debe volver a aumentarse la prednisona hasta que se observe remisión clínica y funcional, y entonces se vuelve a disminuir.

Un estudio realizado en nuestro instituto demostró que los esteroides inhalados presentan una acción anti-inflamatoria similar a la de los orales pero con una disminución significativa de sus efectos colaterales (23). Por otro lado en

nuestro país se recomienda el uso de HAIN como profilaxis debido a la alta prevalencia de tuberculosis.

En cuánto a los medicamentos que modifiquen el metabolismo de la colágena solo se ha visto efectividad ocasional con la colchicina, y algunos resultados alentadores se han obtenido con el uso de ciclosporina e inhibidores de la actividad de la lipooxigenasa en NH experimental (24, 25).

## **Complejo principal de histocompatibilidad**

El complejo principal de histocompatibilidad (CPH) está constituido por un grupo de genes, codificados en el brazo corto del cromosoma 6, altamente polimórficos y cuyos productos son expresados en la superficie de una variedad de células (43). Este sistema fue descubierto en los años 40s, durante los primeros estudios de transplante de tejidos. Algunos de estos genes se relacionan con los mecanismos de defensa específicos por lo que fueron llamados genes de respuesta inmune (Ir). Se demostró inicialmente que los genes Ir controlan la activación de los linfocitos T cooperadores y posteriormente se determinó que los linfocitos T no reconocen a los antígenos en forma libre o soluble sino a fracciones antigénicas que están covalentemente unidos a productos de genes CPH. Hay dos diferentes clases de productos de CPH que se denominan de clase I y II, y las células T reconocen a los antígenos cuando están unidos a una de estas moléculas específicas, ya sea de clase I o II (44).

La importancia fisiológica de la especificidad de los linfocitos T con relación al CPH se basa en las siguientes consideraciones:

- 1) Los patrones de asociación de antígenos con moléculas CPH clase I o II determinan los tipos de células T que son estimuladas por diferentes formas de antígenos.
- 2) La respuesta inmune a diferentes antígenos es determinada por la presencia o ausencia de moléculas CPH que pueden unir o presentar fragmentos de tales proteínas a las células T.

3) Sobre la base de la información del CPH, las células T maduras en cualquier individuo reconocen y responden a antígenos extraños pero no responden a sus propias proteínas.

Los fenotipos del CPH se han estudiado tradicionalmente en leucocitos. Los primeros genes definidos por formas puramente serológicas fueron llamados HLA-A, HLA-B, y HLA-C. Posteriormente, se identificaron los de una región adyacente, llamada HLA-D, cuyo primer producto genético fue llamado "relacionado a HLA-D" o HLA-DR. Otros dos genes de esta región fueron subsecuentemente llamados HLA-DQ y DP.

### ***Estructura de las moléculas del CPH***

Las moléculas de clase I están formadas por dos cadenas polipeptídicas: una cadena alfa de aproximadamente 44 kilodaltones en humanos, y una cadena beta de alrededor 40 kilodaltones. Cada cadena alfa está orientada hacia el exterior de la célula en alrededor de tres cuartos del polipéptido completo, incluyendo los grupos oligosacárido y aminoterminal. Un corto segmento hidrofóbico se encuentra en la membrana celular y los 30 aminoácidos terminales residuales son localizados en el citoplasma (45).

La cadena beta interactúa de manera no covalente con la porción extracelular de la cadena alfa y no tiene unión directa a la célula. Basado en la secuencia de aminoácidos las moléculas clase I se pueden dividir en 4 regiones separadas: una región aminoterminal extracelular unida a un péptido, una región extracelular similar a inmunoglobulina, una región transmembranal, y una región citoplasmática.

Por otro lado, las moléculas clase II están compuestas de dos cadenas polipeptídicas no covalentemente asociadas. La cadena alfa (32 a 34 kDa) es ligeramente más grande que la cadena beta (29 A 32 kDa) como resultado de una glicosilación más extensa. En las moléculas clase II, ambas cadenas polipeptídicas tienen una región carboxiterminal y aminoterminal, y más de dos tercios de cada cadena está localizado en el espacio extracelular. Las dos cadenas

de moléculas clase II están codificadas por diferentes clases de genes, y con pocas excepciones, ambas cadenas son polimórficas. La estructura tridimensional de las moléculas clase II no ha sido resuelta por cristalografía de rayos X. Sin embargo, las secuencias de aminoácidos de algunas de estas moléculas son conocidas y revelan ciertas similitudes con las moléculas clase I. Recientes estudios espectroscópicos han indicado también una similitud en la estructura.

En las moléculas de clase I, la asociación de la cadena alfa con la beta 2 microglobulina ocurre intracelularmente, probablemente dentro del retículo endoplásmico. Estudios en células B humanas han sido particularmente informativas acerca de la importancia de beta 2 microglobulina para expresión de la molécula CPH clase I. En el caso de las moléculas clase II, las cadenas alfa y beta deben también ser sintetizadas coordinadamente y presumiblemente se asocian dentro del retículo endoplásmico.

La expresión de las moléculas del CPH está rigurosamente controlada y presenta cuatro características importantes (46):

- 1) La expresión constitutiva de las moléculas clase I es distinta de la de las moléculas clase II. En general las moléculas clase I están presentes virtualmente en todas las células nucleadas, mientras que las moléculas clase II son normalmente expresadas solo en linfocitos B, macrófagos activados, células dendríticas, células endoteliales y otros pocos tipos de células.
- 2) La frecuencia de transcripción es la determinante mayor de la expresión de la molécula CPH en la superficie celular.
- 3) La transcripción y expresión de los diferentes genes y moléculas clase I y II son reguladas coordinadamente. Asimismo, en algunas células la síntesis de la beta 2 microglobulina es regulada en coordinación con la expresión de las correspondientes cadenas clase I alfa, mientras que la cadena gama es regulada con cadenas alfa y beta de clase II.
- 4) Las citocinas pueden modular la frecuencia de transcripción constitutiva de genes clase I y II en una amplia variedad de tipos celulares. Este es un

importante mecanismo de amplificación de la respuesta inmune mediada por células T, ya que la mayoría de las citocinas que incrementan la expresión del CPH son secretadas por células T y las moléculas CPH son componentes de los ligandos que las células T reconocen y a los cuales responden. En casi todos los tipos de células examinadas el interferón gama incrementa el nivel de expresión de las moléculas clase I. Otras citocinas (interferón alfa y beta, factor de necrosis tumoral alfa y la linfotoxina) pueden también aumentar la expresión de las moléculas clase I. Los efectos de las citocinas ocurren a nivel de la transcripción de los genes y probablemente resultan de factores de transcripción que se unen a secuencias de DNA regulador en genes clase I.

## **Hipótesis:**

La presencia de determinados fenotipos de los genes clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad incrementa la susceptibilidad al desarrollo de la Neumonitis por Hipersensibilidad.

## **Objetivos:**

- 1) Determinar mediante técnicas de biología molecular los alelos y subalelos de los genes de clase II del CPH en pacientes mestizos mexicanos con Neumonitis por Hipersensibilidad inducida por antígeno aviario.
- 2) Identificar si existen diferencias en los fenotipos de los genes de clase II del CPH entre sujetos enfermos con Neumonitis por Hipersensibilidad, familiares expuestos pero sanos y la población general.

## **Pacientes y Métodos.**

### ***Población en estudio***

Se estudiaron a tres diferentes grupos de sujetos étnicamente comparables, esto es, mestizos mexicanos con 3 generaciones previas en México: 1) 26 pacientes con NH inducida por antígeno aviario, 2) 20 individuos expuestos al antígeno pero sin enfermedad pulmonar y 3) 200 controles sanos.

El diagnóstico de HP se basó en los siguientes criterios: 1) exposición a aves con relación causa-efecto; 2) cuadro clínico y paraclínico compatible, esto es: a) disnea de esfuerzo progresiva, con mejoría parcial en ausencia del antígeno, b) estertores bronquioloalveolares bilaterales de predominio basal, c) imágenes reticulonodulares bilaterales con cierto grado vidrio despulido en la radiografía de tórax y tomografía axial computada, d) patrón funcional de predominio restrictivo en la mecánica respiratoria, e) hipoxemia en reposo que empeora con el ejercicio y f) más de 40% de linfocitos en el lavado bronquioalveolar; 3) anticuerpos circulantes específicos contra antígeno aviario, cuantificados por ELISA de acuerdo a una técnica desarrollada en nuestro laboratorio; 4) hallazgos histológicos compatibles con la enfermedad, con cultivos negativos para bacterias, micobacterias y hongos y con ausencia de cambios sugerentes de otro tipo de enfermedad intersticial difusa.

El grupo de expuestos pero sin enfermedad pulmonar estuvo compuesto por familiares en primer grado, con exposición a aves y anticuerpos específicos positivos, pero sin datos clínicos, radiológicos o funcionales sugestivos de anomalía respiratoria.

El grupo control consistió de individuos sanos no relacionados con los grupos anteriores.

## **Tipificación molecular de la subregión HLA II**

### ***Extracción y amplificación de DNA***

El DNA genómico de células obtenidas de sangre periférica se extrajo de acuerdo a técnicas convencionales. La amplificación del DNA, así como la identificación específica de los alelos HLA-DQ se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando la técnica de secuencia específica de cebadores (PCR-SSP; Bio-synthesis Inc; Dallas TX). La tipificación de HLA-DRB1 se llevó a cabo por "dot blot" reverso mediante el uso del kit Amplicor (Hoffman La Roche, Basel, Switzerland). La amplificación de DR1, DR2, DR4, alelos asociados a DRB1-DR52, DRB3 y DRB5 se hizo por PCR. Los cebadores utilizados para la amplificación fueron DRBAMP-B para la región 3' del exón 2 en todos los casos, y DRAMP-1, DRBAMP-2, DRBAMP-3, DRBAMP-4, DRBAMP-5, y DRBAMP-52 para la región 5' del exón 2 para cada grupo de amplificación específica. Estos fueron sintetizados en un sintetizador DNA-SM automatizado (Beckman, Palo Alto, CA).

### ***Hibridación tipo "dot blot".***

Cinco por ciento del DNA amplificado se desnaturalizó en 0.4 mol/l NaOH por 10 min, se neutralizó en 1 mol/l de acetato de amonio y se transfirió a una membrana Hybond-N (Amersham, Amersham Bucks, UK). Los filtros se pre-hibridaron a 42°C por 30 min en una solución que contenía 6X SSPE (30X SSPE: 4.5 mol/l NaCl, 0.3 mol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mmol/l EDTA, pH 7.4), 5X solución de Denhard (2% albúmina sérica de bovinos, 2% polivinilpirrolidona 40, 2% Ficoll 400), 0.1% lauril-sarcosina y 0.02% SDS. Posteriormente, se adicionaron las sondas de oligonucleótidos marcadas con digoxigenina di-deoxy-uridine-triphosphate (Dig-11-dd UTP) y se hibridaron las membranas a 42°C por 3 h. Los filtros se lavaron dos veces con 2X SSPE, (pH 8.0), 3 mol/l cloruro de tetrametilamonio, 2 mmol/l EDTA, 0.1% SDS a temperatura ambiente por 10 minutos y luego dos veces a 60°C por 10 minutos. Los "dots" se revelaron usando

el kit de detección "Dig Nucleic Acid Detection Kit" (Boehringer Mannheim Biochemical, Mannheim, Germany).

### ***Sondas de oligonucleótidos***

La información de las secuencias y especificidades para los oligonucleótidos de DRB1, DRB3, DRB5, DQA1, y DQB1 se obtuvo del 12 "International Histocompatibility Workshop" (París, Francia). La síntesis de oligonucleótidos se hizo usando la técnica de cyanoethyl phosphoramidite en un sintetizador de DNA automatizado (Beckman) siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **Análisis Estadístico:**

Después de que las frecuencias fenotípicas fueron determinadas para cada alelo en la población enferma y los controles, la significancia estadística fue analizada por la prueba de  $X^2$  con la corrección Yates. Así, para evitar la sobreestimación de la significancia de las diferencias de los datos, la P obtenida fue multiplicada por el número de alelos estudiados en cada locus (p corregida). El riesgo relativo (RR) se calculó como una medición de la fuerza de asociación de la enfermedad con un antígeno dado:  $RR = \frac{(p+)(c-)}{(p-)(c+)}$ , donde p= pacientes, c= controles, += antígeno positivo, y - = antígeno negativo.

## Resultados:

### *Análisis de la frecuencia de alelo por locus.*

El análisis de las frecuencias fenotípicas de los alelos del complejo principal de histocompatibilidad clase II se examinó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite la tipificación molecular de dichos alelos. A través de esta técnica se demostraron diferencias importantes tanto en el locus DR como en el DQ de la región D de este complejo.

Con relación a los alelos del locus DR, los pacientes que desarrollaron neumonitis por hipersensibilidad mostraron una elevada frecuencia de los alelos DRB1-0701 (perteneciente al HLA-DR7) y DR13.05 (perteneciente al HLA-DR6). Este incremento fue estadísticamente significativo en comparación con los dos grupos control formados por sujetos expuestos asintomáticos e individuos normales no relacionados.

Como se puede apreciar en la tabla 1, los enfermos con alveolitis alérgica presentaron una frecuencia fenotípica para el HLA-DRB1-0701 de 0.275, mientras que en los sujetos expuestos pero sin enfermedad este valor fue de 0.111 y en la población normal de 0.113 ( $p < 0.005$ ) con un riesgo relativo de 3.2 y 3.14 respectivamente.

En lo que respecta al HLA-DR13.05, este alelo se presentó en los pacientes con una frecuencia de 0.191, mientras que en la población general el valor fue de 0.010 ( $p < 0.001$ ) y no se observó en ninguno de los contactos asintomáticos.

De manera interesante, los enfermos con neumonitis por hipersensibilidad mostraron una disminución estadísticamente significativa en la frecuencia de los alelos HLA-DR18 (perteneciente al HLA-DR3) y del HLA-DQ0402, perteneciente al locus DQ.

**Tabla 1**

Tipificación molecular de los antígenos del CPH clase II

Alelos	Pacientes (n=26)	Expuestos asintomáticos (n=20)	Controles (n=200)	P
HLA-DRB1-0701	0.275	0.111	0.113	< 0.005
HLA-DR13.05	0.191	0.000	0.010	< 0.001
HLA-DR18	0.019	0.053	0.061	< 0.001
HLA-DQ-0402	0.038	0.111	0.185	< 0.001

## Discusión:

A pesar de múltiples estudios realizados tanto en la enfermedad humana como en modelos experimentales, la secuencia de los eventos patogénicos que lleva al desarrollo de neumonitis por hipersensibilidad no se conoce con precisión, y al menos dos preguntas no han podido ser contestadas: 1) porqué no todos los individuos expuestos a la inhalación de estas partículas orgánicas desarrollan la enfermedad? y 2) porqué algunos pacientes mejoran o curan mientras que otros progresan hacia la fibrosis, aún en ausencia del agente agresor?

Con el objeto de contestar éstas y otras interrogantes, hemos elaborado una hipótesis que pretende crear una propuesta integral acerca de la patogénesis de la neumonitis por hipersensibilidad (1, 2, 18).

De acuerdo a esta hipótesis, para que se desarrolle la inflamación pulmonar difusa secundaria a la exposición a partículas orgánicas, deben concurrir dos eventos de manera sincronizada: la inhalación del antígeno causal y la presencia de uno o más factores promotores. La apropiada convergencia temporal de ambos factores provoca la alveolitis. Posteriormente, en presencia de factores de regresión, la inflamación pulmonar se controla y resuelve, con la recuperación *ad integrum* de las estructuras alveolo-capilares. Por el contrario, si operan factores de progresión, la inflamación se autoperpetua y las alteraciones pulmonares evolucionan hacia la fibrosis, con la consecuente destrucción del parénquima pulmonar.

De acuerdo a esta hipótesis, aunque la inhalación del agente causal es esencial, no es suficiente para generar por sí sola el proceso patológico en ausencia de factor(es) promotor(es). Un posible factor promotor que podría explicar porque sólo una pequeña parte de la población expuesta a estos antígenos desarrolla el padecimiento, sería la presencia de una susceptibilidad genética y en este sentido, varios estudios, incluyendo uno realizado en nuestro laboratorio (15), han sugerido la existencia de una predisposición asociada al complejo

principal de histocompatibilidad (sistema HLA), aunque los resultados han sido contradictorios y poco concluyentes (47-50).

Es en este marco que se desarrolló este trabajo que apoya la hipótesis de la posible existencia de una susceptibilidad genética asociada a los genes de clase II del complejo principal de histocompatibilidad. Así, aunque la muestra estudiada debe incrementarse, nuestros resultados sugieren que en población mestiza mexicana la presencia de los alelos HLA-DRB1-0701 y HLA-DR13.05 predisponen al desarrollo de neumonitis por hipersensibilidad con un factor de riesgo superior a tres. Esto significa que un individuo expuesto a la inhalación de antígeno aviario y que tenga uno de estos alelos, tiene 3 veces más posibilidades de padecer la enfermedad.

Un hallazgo interesante fue el que los controles mostraron un incremento significativo de los alelos HLA-DR18 y HLA-DQ0402, lo que sugiere que estos podrían desempeñar un papel protector.

## Referencias:

- 1) Selman M, Chapela R, Raghu G. Hypersensitivity pneumonitis: Clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. *Sem. Respir. Med.* 1993; 14:353-364.
- 2) Selman M. Chapela R. Salas J. et al. Hypersensitivity pneumonitis: Clinical approach and an integral concept about its pathogenesis. A mexican point of view. In: Selman M. Barrios R. (eds). *Interstitial Pulmonary Diseases: selected topics*. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 1991;171-190.
- 3) Fink JN. Hypersensitivity pneumonitis. *Clin. Chest Med.* 1992; 13: 303-309.
- 4) Lacey J, Lacey ME. Spore concentrations in the air of farm builidings. *Trans. BR. Mycol. Soc.* 1964; 47:547-551.
- 5) Turner-Warwick M. Extrinsic allergic bronchiolo-alveolitis. Current topics in immunology. Series No. 10. *Inmunology of the lung*. London. Edward Arnold. 1978: 65.
- 6) Boyd G. Pulmonary function changes in pigeon fancier's lung. *Resp. Med.* 1990; 84:5-9.
- 7) Warren CPW. Hypersensitivity pneumonitis due exposure to budgerigars. *Chest* 1972; 62: 170-173.
- 8) Kokkarinen J. Tukiainen H. Seppa A. el al. Hypersensitivity pneumonitis due to native birds in a bird ringer. *Chest* 1994; 106:1269-1270.
- 9) .- Boyd, G. Clinical and immunological studies in pulmonary extrinsic allergic alveolitis. *Scot. Med. J.* 1978; 23:267-276.
- 10) Banham SW, McKenzie H., Mc Sharry C et al. Antibody against a pigeon bloom extract: a further antigen in pigeon breeder's lung. *Clin. allergy* 1982; 12:173-176.
- 11) Mendoza F., Melendro E., Baltazares M et al. Cellular immune response to fractionated avian antigens by peripheral blood mononuclear cells from patients with pigeon breeder's disease. *J. Lab. Clin. Med.* 1996; 10:149-154.

- 12) Ando M, Arima K, Yoneda R, et al. Japanese summer time hypersensitivity pneumonitis. Geographic distribution, home environment, and clinical characteristics of 621 cases. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1980; 18: 373-379.
- 13) Cornier Y, Israel-Assayag E, Fournier M, et al. Modulation of experimental hypersensitivity pneumonitis by Sendai virus. *J. Lab. Clin. Med.* 1993; 121:683-688.
- 14) Chapela R, Selman M, Salas J, et al. Influencia del embarazo y puerperio en el desarrollo de la alveolitis alérgica extrínseca. *Allergol. Immunopathol.* 1985; 13:305-309.
- 15) Selman M., Terán L., Mendoza A. et al. Increase of HLA DR7 in pigeon breeder's lung in a mexican population. *Clin. Inmunol. Immunopathol.* 1987; 44:63-70.
- 16) Denis, M., E. Ghadirian. Transforming growth factor- $\beta$  is generated in the course of hypersensitivity pneumonitis: contribution to collagen synthesis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1992; 7:156-160.
- 17) Salvaggio JE. Recent advances in pathogenesis of allergic alveolitis. *Clin. Exp. Allergy* 1990; 20: 137-141.
- 18) Selman M. Hypersensitivity Pneumonitis. In: *Interstitial Lung Disease*. Schwarz M, and King T, eds. B.C. Decker Inc., Hamilton Ontario, pp. 393-422, 1998.
- 19) Semenzato G, Agostini C, Zambello R et al. Lung T cells in hypersensitivity pneumonitis: phenotypic and functional analysis. *J. Immunol.* 1986; 137:1164-1169.
- 20) Murayama J, Yoshizawa Y. Ohtsuka M, Haegawa S. Lung fibrosis in hypersensitivity pneumonitis. Association with CD 4+ but not with CD8+ cell dominant alveolitis and insidious onset. *Chest* 1993; 104:38-43.
- 21) Leatherman JW, Michael AF, Schwartz BA, Hoidal JR. Lung T cells in hypersensitivity pneumonitis. *Ann. Intern. Med.* 1984; 100:390-396.

- 22) Selman M, González G, López JS, et al. Effect of lung T-lymphocytes on fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis and allergic extrinsic alveolitis. *Thorax* 1990; 45:451-455.
- 23) Ramírez A, Sansores R, Chapela R, Carrillo G, Selman M. Inhaled beclomethasone versus oral prednisone. A clinical trial in patients with hypersensitivity pneumonitis. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1995; 151: A605.
- 24) Kopp WC, Dierks SE, Butler JE, Upadrashta BS, Richerson HB. Cyclosporine immunomodulation in a rabbit model of chronic hypersensitivity pneumonitis. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1985; 132:1207-1211.
- 25) Kunbel SL, Chensue SW, Mouton C, Higashi GI. Role of lipooxygenase products in murine pulmonary granuloma formation. *J. Clin. Invest.* 1984; 74:514-519.
- 26) Semenzato G, Trentín L, Zambello R, et al. Different types of cytotoxic lymphocytes recovered from the lungs of patients with hypersensitivity pneumonitis. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1991; 144:855-891.
- 27) Barrios R, Selman M, Franco R et al. Subpopulations of T cells in lung biopsies from patients with pigeon breeder's disease. *Lung* 1987; 165:181-187.
- 28) Barquín N, Sansores R, Chapela R, Pérez-Tamayo R, Selman M. Immunoregulatory abnormalities in patients with pigeon breeder's disease. *Lung* 1990; 168:103-110.
- 29) Keller, R. H., N. J. Calvanico, and O. Stevens. Hypersensitivity pneumonitis in nonhuman primates. 1. Studies on the relationship of immunoregulation and disease activity. *J. Immunol.* 1982; 128:116-122.
- 30) Sansores R, Salas J, Chapela R, Barquín N, Selman M. Clubbing in hypersensitivity pneumonitis. Its prevalence and possible prognostic role. *Arch. Intern. Med.* 1990;150:1849-1851.
- 31) Cook PG, Wells IP, Mc Gavin CR. The distribution of pulmonary shadowing in farmers lung. *Clin. Radiol.* 1988; 39:21-25.

- 32) Hansell DM, Moskovic E. High resolution computed tomography in extrinsic allergic alveolitis. *Clin. Radiol.* 1991; 43:8-12.
- 33) Remy Jardin M, Remy J, Wallaert B, Muller NL. Subacute and chronic bird breeder hypersensitivity pneumonitis: Sequential evaluation with CT and correlation with lung function test and bronchioalveolar lavage. *Radiology* 1993; 189:111-116.
- 34) Nakata M, Kimoto T, Nakayama T et al. Diffuse peripheral lung disease: Evaluation by high resolution computed tomography. *Radiology* 1985; 157:181-187.
- 35) Muller NL, Mayo JR, Zwirewich CV. Value of MR imaging in the evaluation of chronic infiltrative lung diseases: comparison with CT. *Am. J. Roentgen.* 1992; 158:1205-109.
- 36) Vanderstappen M, Mornex JF, Lahneche B et al. Gallium-67 scanning in the staging of cryptogenic fibrosing alveolitis and hypersensitivity pneumonitis. *Eur. Resp. J.* 1988; 1: 517-522.
- 37) Sansores R, Pérez Padilla R, Paré P., Selman M. Exponential analysis of the lung pressure-volume curve in patients with chronic pigeon breeder's lung. *Chest* 1992; 101: 1352-1356.
- 38) Haslam PL, Parker DJ, Townsend PJ. Increased in HLA-DQ, DP, DR, and transferrin receptors on alveolar macrophages in sarcoidosis and allergic alveolitis compared with fibrosing alveolitis. *Chest* 1990; 97:651-655.
- 39) Haslam PL, Dewa A, Butchers P. et al. Mast cells, atypical lymphocytes, and neutrophils in bronchioalveolar lavage in extrinsic allergic alveolitis. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1987; 135:35-40.
- 40) Kawanami O, Basset F, Barrios R et al. Hypersensitivity pneumonitis in man. Light and electron microscopic study of 18 lung biopsies. *Am. J. Pathol.* 1983; 110:277-281.
- 41) Reyes CN, Wenzel FJ, Lawton BR, Emanuel DE. The pulmonary pathology of farmer's lung disease. *Chest* 1982; 81:142-147.

- 42) Pérez Padilla R, Gaxiola M, Salas J, Ramos C, Selman M. Bronchiolitis in chronic pigeon breeder's disease. Morphological evidence of a spectrum of small airway lesions in hypersensitivity pneumonitis induced by avian antigens. *Chest* 1996; 110:371-377.
- 43) Accolla RS, Adorini L, Sartoris S, et al. MHC: orchestrating the immune response. *Immunol Today* 1995; 16:8-11.
- 44) Tomlinson IP, Bodmer WF. The HLA system and the analysis of multifactorial disease. *Trends Genet.* 1995; 11:493-498.
- 45) Kamoun M, Loukia Z, Sloan S, et al. Induction of HLA class II molecules on human T cells: relationships to immunoregulation and the pathogenesis of AIDS. *DNA Cell. Biol.* 1992; 11:265-273.
- 46) Cresswell P. Antigen presentation. Getting peptides into MHC class II molecules. *Curr. Biol.* 1994; 4:541-543.
- 47) Ritner C, Sennekamp J, Mollenhauer E, et al. Pigeon breeder's lung association with HLA-DR 3. *Tiss. Antig.* 1983; 21:374-378.
- 48) Ando M, Hirayama K, Soda K et al. HLA Dqw3 in Japanese summer type hypersensitivity pneumonitis induced by trichosporum cutaneoum. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1989; 140:948-952.
- 49) Rodey G, Fink J, Koethe S, et al. A study of HLA-A, B, C, and DR specificities in pigeon breeder's disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1979;119: 755-759.
- 50) Flaherty D, Braun S, Marx J, et al. Serologically detectable HLA-A,B, and C loci antigens in farmer's lung disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1980; 122:437-441.