

Frecuencia del HLA-B*27: algunas consideraciones sobre su uso como herramienta diagnóstica

Frecuency of HLA-B*27: some reflexions aboutit use as a diagnostic tool

Suchiquil Rangel Velázquez, Nadezhda González García, Maicel E Monzón Pérez, Alexander Ortega Carballosa, Gissel García Menéndez

Hospital Clínico Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras". La Habana, Cuba.

RESUMEN

La detección por métodos moleculares del alelo HLA-B*27 se ha convertido en los últimos años en Cuba, en una herramienta que apoya el diagnóstico de enfermedades conocidas, de manera general, como espondiloartropatías (SpA). Con el objetivo de determinar el porcentaje de positividad del alelo en individuos con sospecha clínica de SpA y uveítis, se estudiaron muestras de ADN pertenecientes a 236 pacientes caracterizados en género, edad y color de la piel. Para la genotipificación se utilizó el PCR en tiempo real con el estuche comercial LightMix HLA-B*27 SimpleProbe (TIBMOLBIOL). El 42,7 % de los casos fueron mayores de 40 años, con un promedio de edad de 39 años y una relación de masculino-femenino de 0,84; sin embargo, los pacientes que debutan con enfermedades relacionadas con el HLA-B*27 deberían ser fundamentalmente varones entre la segunda y tercera década de vida. De las muestras estudiadas solamente 51 (21,6 %) resultaron positivas para el alelo en cuestión. Sin embargo, según el tipo de enfermedad, la frecuencia del gen debería encontrarse entre el 36,0 % y el 90,0 %. Solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones por géneros. El 18,0 % de las indicaciones no contaban con impresión diagnóstica y estos casos presentaron la positividad más baja. Los presentes resultados evidencian que las solicitudes de HLA-B*27 que se generan en el sistema de salud cubano no siguen criterios uniformes de sospecha clínica de las SpA y uveítis; y que en las peticiones de exámenes no se incluyen los datos necesarios que permitan una correcta interpretación de esta prueba inmunogenética.

Palabras clave: HLA-B*27; PCR en tiempo real; espondiloartritis; espondilitis anquilosante, uveítis.

ABSTRACT

The detection by molecular methods of the HLA-B*27 allele has become in recent years in Cuba in a tool that supports the diagnosis of some diseases generally known as spondyloarthropathies (SpA). In order to determine the percentage of the gene positivity in individuals with clinical suspicion of SpA and uveitis, we studied 236 DNA samples characterized in gender, age and skin color, of patients with HLA-B*27 indication. The genotyping was performed by Real Time - PCR with the LightMix HLA-B*27 SimpleProbe kit (TIBMOLBIOL). The 42.7 % of the cases were older than 40 years, with a mean of 39 years old and a male - female ratio of 0.84; however, patients debuting with HLA-B*27-related diseases should be predominantly males between the second and third decade of life. Our results showed that 188 (78.4 %) were negative and only 51 (21.6 %) were positive however, according to the type of pathology, the frequency of this gene should be between 36.0 % and 90.0 %. The statistical differences were only associate to gender but not in the groups of different skin color and presumptive diagnosis. The 18.0 % of the laboratory test request forms had no diagnostic impression and these cases had the lowest positivity rates. The present results show that the requests for HLA-B*27 generated in the Cuban health system do not follow uniform criteria of clinical suspicion of SpA and uveitis; and that request forms do not include the necessary data to allow a correct interpretation of this immunogenetic test.

Keywords: HLA-B*27; real time PCR; spondyloarthritis; ankylosing spondylitis; uveitis.

INTRODUCCIÓN

La asociación del antígeno HLA-B*27 con las espondiloartropatías (SpA) y las uveítis se conoce desde hace más de cuatro décadas, aunque su implicación en la patogenia permanece aún sin dilucidar a nivel molecular y su presencia o ausencia no definen el diagnóstico.¹⁻³

El gen que codifica este antígeno presenta diferencias entre las poblaciones del mundo y no todas sus variantes alélicas se asocian de igual manera al desarrollo de las mencionadas enfermedades, lo cual sugiere que su polimorfismo podría modular la susceptibilidad de padecerlas.²⁻⁴

La detección del HLA-B*27 por métodos de biología molecular se ha convertido en los últimos años en Cuba en una herramienta diagnóstica de gran interés,^{5,6} que apoya el estudio inicial de las uveítis, especialmente de la uveítis anterior aguda, y de las SpA, como la espondilitis anquilosante (EA), la artritis reactiva, la espondiloartropatía juvenil, la espondiloartritis enteropática, la espondiloartritis psoriásica y las espondiloartropatías indiferenciadas.^{7,8}

La presente investigación se realizó con el objetivo de determinar el porcentaje de positividad del gen HLA-B*27 entre los pacientes cubanos a los que se indicó la genotipificación por sospecha clínica de SpA y uveítis, y brindar así elementos que permitan una mejor aplicación de este marcador molecular.

MÉTODOS

Se realizó un estudio desde enero hasta septiembre de 2016 que incluyó los 236 pacientes con indicación de HLA-B*27 recibidos en este período en el laboratorio de genética molecular del Hospital Clínico Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras", procedentes de centros de atención secundaria y terciaria del sistema nacional de salud cubano. Se emplearon los datos clínicos y variables demográficas recogidas en la indicación médica.

El ADN genómico se obtuvo a partir de sangre venosa periférica empleando EDTA como anticoagulante. Se utilizó el estuche comercial de extracción de *ADN High PureTemplatePreparation Kit (Roche Diagnostics GMBH, Germany)*. La concentración y pureza de las muestras de ADN se determinaron con un espectrofotómetro de microvolúmenes *NanoDrop™ One (ThermoScientific, EE. UU.)*. Se consideraron válidas solo aquellas que superaron los 2ng/μL y que presentaron con una relación 260/280 nm entre 1,8 y 2,0.

La genotipificación del HLA-B*27 se realizó en un equipo de PCR en tiempo real *LightCycler 96 (Roche diagnostic)*, con el estuche comercial basado en sondas de hibridación *LightMix HLA-B*27 SimpleProbe (TIB MOLBIOL, Alemania)*.

Los resultados se analizaron con el lenguaje R mediante *RStudio* versión 1.0.143 y el paquete *compare Groups* versión 3.2.4. Se realizó una distribución de frecuencias según el diagnóstico presuntivo y para las comparaciones entre grupos se utilizó ANOVA y Odd Ratio según correspondiera. En todos los casos se trabajó con un nivel de confiabilidad del 95 %.

RESULTADOS

Entre las 236 indicaciones de HLA-B*27 por sospechas de SpA y uveítis se encontraron 108 pacientes del sexo masculino y 128 del femenino, con una relación de hombre-mujer de 0,84. Las edades estuvieron comprendidas entre los 13 y los 86, con promedio de 39 y 42,7 % de mayores de 40 años. Se pudo determinar el color de la piel en 138 casos, de ellos 112 blancos y 26 no blancos.

El porcentaje de positividad global para el HLA-B*27 fue del 21,6 %. Las mujeres presentaron el gen en el 12,5 % y los hombres en el 32,4 %; se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos (Odd Ratio: 3,32, con intervalo de confianza: 1,74-6,61). Por su parte, la positividad según color de la piel fue del 20,5 % en los pacientes blancos y del 15,4 % en los no blancos, sin que existieran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Odd Ratio: 0,72 con intervalo de confianza: 0,19-2,15).

De los 51 ensayos positivos, 32 correspondieron a pacientes con sospecha de SpA, 3 de uveítis y 16 sin impresión diagnóstica en la indicación del examen. El mayor porcentaje de positividad correspondió a los pacientes en los que se sospechó SpA, (24,6 %). En los casos presuntivos de uveítis este porcentaje fue de 18,8 % y en los que no se precisó la impresión diagnóstica en la indicación, del 17,8 %. No existieron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de los HLA-B*27 positivos entre los grupos de pacientes con diferentes diagnósticos presuntivos (Fig.).

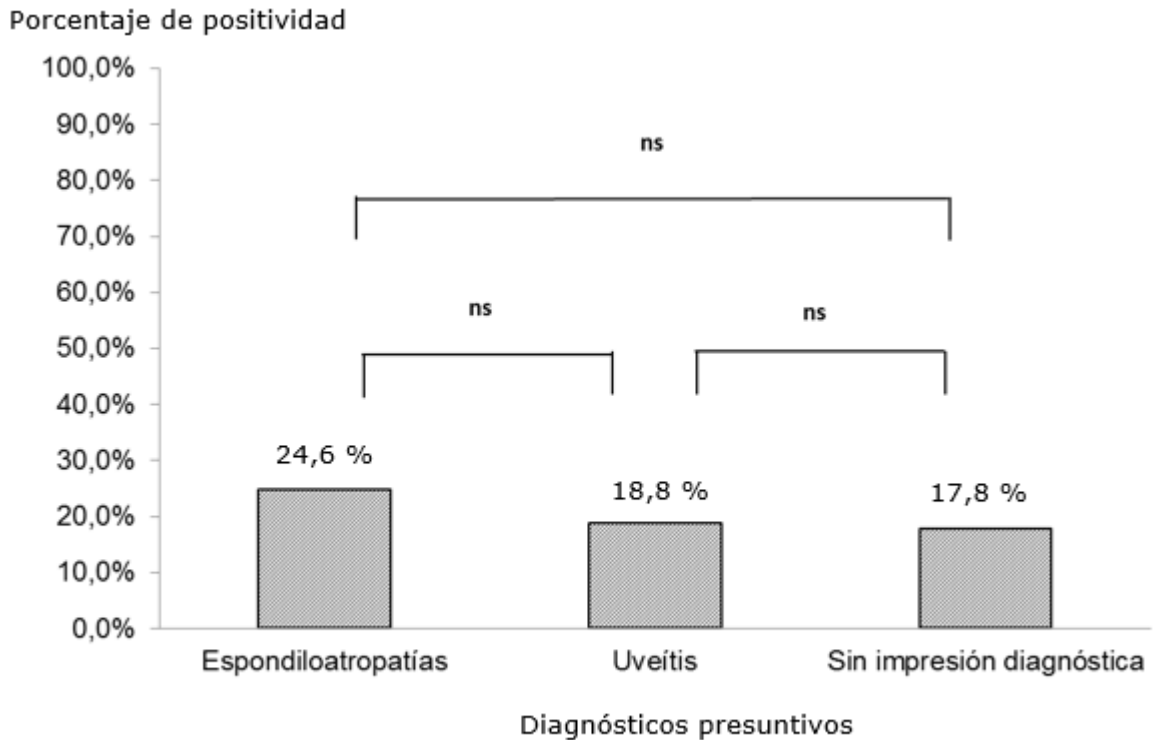


Fig. Porcentaje de positividad del alelo HLA-B*27 según diagnóstico presuntivo.

DISCUSIÓN

El volumen de indicaciones de HLA-B*27 que se procesaron en el período de estudio, reflejó la demanda que tiene este marcador inmunogenético para el diagnóstico de las SpA y las uveítis en el sistema de nacional salud. Esto contrasta con los primeros estudios en Cuba sobre el HLA-B*27 que datan de finales del pasado siglo y en que se emplearon técnicas serológicas que solían ser muy laboriosas.^{9,10}

Posteriormente, con la introducción del PCR-SSP, (del inglés *polimerase chain reaction specific sequence primers*), la identificación del gen se hizo más expedita;⁵ sin embargo, en la presente investigación se empleó, por primera vez en el país, la detección de del HLA-B*27 por la técnica de PCR en tiempo real, que además de ser más específica y sensible, permitió analizar un mayor número de muestras en un corto período de tiempo.¹¹

La relación entre hombres y mujeres que se encontró, fue inversa a la que se describe tanto para las SpA, como para las uveítis, teniendo en cuenta que estas enfermedades son de hasta 4 veces más frecuentes en el sexo masculino.^{1,4,12-14} Estos resultados pueden deberse que se indicó la prueba a mujeres con sintomatología inespecífica y que no cumplían con los criterios clínicos.

Sin embargo, los porcentajes de positividad encontrados demostraron que el gen HLA-B*27 aparece con más frecuencia en los hombres con sospecha clínica de SpA y de uveítis, y que existen diferencias estadísticamente significativas con las mujeres; lo cual concuerda con los estudios previos sobre la prevalencia de estas enfermedades.^{1,4,12-14}

El hallazgo de que el promedio de edad de los pacientes en estudio fue casi 11 años superior al que se establece para el inicio de los síntomas de las SpA;^{8,12,14} pudiera explicarse por el hecho de que generalmente transcurre casi una década antes de que se detecten los signos patognomónicos en las radiografías. Por ejemplo, el diagnóstico radiológico de la espondilitis anquilosante suele hacerse de 8 a 11 años luego del inicio de los síntomas.^{15,16}

Sin embargo, debido a la citada baja sensibilidad de la radiografía, el HLA-B*27 cobra importancia en el diagnóstico temprano,⁸ por lo que en el presente estudio debió predominar una población joven. El elevado porcentaje de mayores de 40 años que se encontró, entonces podría deberse a que se le indicó la prueba a casos que no cumplían con los criterios clínicos.

El hecho de que no se encontraran diferencias estadísticamente significativas en la positividad del gen entre los grupos de pacientes blancos y no blancos, aun cuando se ha demostrado que su frecuencia es mayor en poblaciones caucásicas que en las de origen africano;^{4, 12} coincide con estudios en población cubana tanto del HLA como de otros *loci*, en los que se ha demostrado que los habitantes de la mayor de las Antillas no tienen genes que los definan según su color de la piel.^{17,18}

Las variantes alélicas para el HLA-B*27 aparecen entre el 0,8 y el 1,6 % en la población cubana,^{18,19} lo cual contrasta con el 21,6 % de muestras positivas del presente estudio. Sin embargo, teniendo en cuenta que se trató de casos con sospecha clínica de enfermedades relacionadas con este marcador inmunogenético, debería esperarse una frecuencia aún mayor.^{12,14}

El porcentaje de positividad más elevado que se encontró fue de 24,5 % en el grupo general de las SpA, que es inferior incluso al 35,0 % de la espondiloartritis enteropática, de los más bajos entre las diferentes enfermedades que se asocian con este gen.^{12,14,20}

Aunque no existieron diferencias estadísticamente significativas en los pacientes distribuidos por diagnósticos presuntivos, el análisis por enfermedades del presente estudio estuvo limitado, porque incluyó 18 % de individuos sin impresión diagnóstica. Estos casos presentaron el porcentaje de positividad más bajo, lo cual pudo estar relacionado con que se indicó la prueba de forma incorrecta ante sospechas de enfermedades sin relación comprobada con el HLA.

Teniendo en cuenta estos resultados y dado que la asociación entre la presencia del HLA-B*27 y el padecimiento de SpA es mayor en individuos con familiares de primer grado diagnosticados,^{14,21,22} se evidencia la necesidad de implementar en los laboratorios un modelo de petición de examen que incluya todos los datos requeridos en cada paciente, para ganar en seguridad e interpretación de los estudios genéticos.

Los resultados del presente trabajo evidencian que las solicitudes de HLA-B*27 que se generan en el sistema de salud cubano no siguen criterios uniformes de sospecha clínica de las SpA y uveítis; y que en las peticiones de exámenes no se incluyen los datos necesarios que permitan una correcta interpretación de esta prueba inmunogenética.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lin H, Gong YZ. Association of HLA-B27 with ankylosing spondylitis and clinical features of the HLA-B27-associated ankylosing spondylitis: a meta-analysis. *Rheumatol Int.*; 2017.

2. Mahmoudi M, Aslani S, Nicknam MH, Karami J, Jamshidi AR. New insights toward the pathogenesis of ankylosing spondylitis; genetic variations and epigenetic modifications. *Mod Rheumatol*. 2017;27(2):198-209.
3. Chen B, Li J, He C, Li D, Tong W, Zou Y, et al. Role of HLA-B27 in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Mol Med Rep*. 2017;15(4):1943-51.
4. Yang T, Duan Z, Wu S, Liu S, Zeng Z, Li G, et al. Association of HLA-B27 genetic polymorphisms with ankylosing spondylitis susceptibility worldwide: a meta-analysis. *Mod Rheumatol*. 2014;24(1):150-61.
5. Torres S, Borges S, Artiles A. HLA-B27 and clinical features of acute anterior uveitis in Cuba. *Ocul Immunol Inflamm*. 2013;21(2):119-23.
6. Solís Cartas U, Morejón Gómez JA, de Armas Hernández A. Espondilitis anquilosante y enfermedad de Von Recklinhausen. Una asociación infrecuente. *Rev Cubana Reumatol*. 2014;16:240-4.
7. Paramarta JE, Baeten D. Spondyloarthritis: from unifying concepts to improved treatment. *Rheumatology*. 2014;53(9):1547-59.
8. Akgul O, Ozgocmen S. Classification criteria for spondyloarthropathies. *World J Orthop*. 2011;2(12):107-15.
9. González Cortiñas M, Faurés Vergara L, Rodríguez Viera R, Gómez Arbesú J. HLA B27 y las espondilartropatías seronegativas. *Rev Cubana Med*. 1997;36:24-8.
10. Morera Barrios LM, Verdura González TE, Martínez Legón Z, Ricardo Lorenzo R. Asociación de antígenos HLA y enfermedades oftalmológicas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* [Internet]. 2001;17:7-18 pp. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892001000100001&nrm=iso.
11. Tiemann C, Vogel A, Dufaux B, Zimmer M, Krone JR, Hagedorn HJ. Rapid DNA typing of HLA-B27 allele by real-time PCR using lightcycler technology. *Clin Lab*. 2001;47(3-4):131-4.
12. Kopplin LJ, Mount G, Suhler EB. Review for Disease of the Year: Epidemiology of HLA-B27 Associated Ocular Disorders. *Ocul Immunol Inflamm*. 2016:1-6.
13. Xiong J, Chen J, Tu J, Ye W, Zhang Z, Liu Q, et al. Association of HLA-B27 status and gender with sacroiliitis in patients with ankylosing spondylitis. *Pak J Med Sci*. 2014;30(1):22-7.
14. Sun L, Wu R, Xue Q, Wang F, Lu P. Risk factors of uveitis in ankylosing spondylitis: An observational study. *Medicine*. 2016;95(28):e4233.
15. Bandinelli F, Salvadorini G, Delle Sedie A, Riente L, Bombardieri S, Matucci-Cerinic M. Impact of gender, work, and clinical presentation on diagnostic delay in Italian patients with primary ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol*. 2016;35(2):473-8.
16. Grubisic F, Jajic Z, Alegic-Karin A, Boric I, Jajic I. Advanced Clinical and Radiological Features of Ankylosing Spondylitis: Relation to Gender, Onset of First Symptoms and Disease Duration. *Coll Antropol*. 2015;39(4):927-34.

17. Marcheco Teruel B, Parra E, Fuentes Smith E, Salas A, Buttenschøn H, Demontis D, et al. Cuba: Exploring the History of Admixture and the Genetic Basis of Pigmentation Using Autosomal and Uniparental Markers. *PLOS Genetics*. 2014;10(7).
18. Ferrer A, Nazábala M, Companioni O. HLA class I polymorphism in the Cuban population. *Hum Immunol*. 2007;68:918-27.
19. Paradoa ML, Middleton D, Acosta A, Sarmiento ME, Leyva J. Genes HLA en una muestra de la población cubana. *Vaccimonitor*. 2000;9(3):1-5.
20. Naranjo LAG, Londoño JD, Valle RR. Diagnóstico temprano de las espondiloartropatías. *Rev Colombiana Reumatol*. 2005;12(3):241-62.
21. Turina MC, de Winter JJ, Paramarta JE, Gamala M, Yeremenko N, Nabibux MN, et al. Clinical and Imaging Signs of Spondyloarthritis in First-Degree Relatives of HLA-B27-Positive Ankylosing Spondylitis Patients: The Pre-Spondyloarthritis (Pre-SpA) Cohort Study. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(10):2444-55.
22. Pelaez-Ballestas I, Romero-Mendoza M, Burgos-Vargas R. If three of my brothers have ankylosing spondylitis, why does the doctor say it is not necessarily hereditary? The meaning of risk in multiplex case families with ankylosing spondylitis. *Chronic Illn*. 2016;12(1):58-70.

Recibido: 14 de agosto de 2017.

Aprobado: 9 de octubre de 2017.

Dra. Gissel García Menéndez. Hospital Clínico Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras", La Habana, Cuba.

Correo electrónico: gisselgarcia@infomed.sld.cu