

Original

Análisis de los fenotipos de las moléculas HLA de clase I en pacientes con reacciones idiosincrásicas a antiinflamatorios no esteroideos

J. Quiralte, F. Sánchez¹, T. Carrillo, C. Blanco, R. Castillo, N. Ortega, P. Pérez-Aciego¹, M. J. Torres¹, F. Rodríguez de Castro²

Sección de Alergia, ¹Unidad de Inmunología y ²Sección de Neumología
Hospital Universitario Ntra. Sra. del Pino. Las Palmas de Gran Canaria

Antecedentes: Los estudios de asociación de determinados alelos del sistema principal de histocompatibilidad a las reacciones idiosincrásicas a fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) muestran resultados discordantes. *Objetivo:* Analizar los fenotipos de las moléculas HLA de clase I en pacientes con reacciones idiosincrásicas a AINEs. *Pacientes y métodos:* Noventa pacientes con reacciones idiosincrásicas a AINEs y 144 pacientes controles tolerantes (83 atópicos y 61 no atópicos) fueron seleccionados por medio de la provocación oral controlada con AINEs. El tipaje de los antígenos HLA-A, -B y -Cw se realizó por un ensayo de microlinfotoxicidad estándar. *Resultados:* La distribución de los fenotipos de las moléculas HLA-A y -B de la población global de pacientes con reacciones idiosincrásicas a AINEs con respecto a la población control no mostraron diferencias significativas. El fenotipo HLA-Cw7 estuvo significativamente elevado ($p < 0,01$) en la población de pacientes con reacciones anafilactoides inducidas por AINEs. Las frecuencias de los fenotipos HLA-Cw en pacientes con angioedema periorbitario aislado no difirieron significativamente de las exhibidas por los pacientes del grupo control. *Conclusiones:* El HLA-Cw7 es un marcador genético específicamente asociado a la población en pacientes con reacciones anafilactoides inducidas por AINEs. Posiblemente, la heterogeneidad clínica y genética de los distintos tipos de reacciones exprese la existencia de distintos mecanismos patogénicos en estos tipos de reacciones idiosincrásicas.

PALABRAS CLAVE: HLA / Antiinflamatorios no esteroideos / Reacción adversa.

Analysis of class I HLA molecule phenotypes in patients with hypersensitivity reactions to non-steroidal antiinflammatory drugs

Background: The association studies of various alleles of the major histocompatibility complex to hypersensitivity adverse reactions to non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) have yielded discordant results. *Aims:* to analyze the phenotypes of Class I HLA molecules in patients with hypersensitivity adverse reactions to NSAIDs). *Patients and Methods:* A group of 90 patients with hypersensitivity adverse reactions to NSAIDs and another one of 144 control patients who were NSAID-tolerant (83 atopic and 61 non-atopic patients) were selected through controlled oral NSAID challenge. HLA-A, -B and -Cw antigen typing was performed through a standard microlymphotoxicity test. *Results:* There were no significant differences between the adverse reaction and the control patient populations as regards the distribution of phenotypes of HLA-A and -B molecules. The HLA-Cw7 phenotype was significantly overrepresented ($p < 0.01$) in the patients with NSAID-induced anaphylactoid reactions. The frequencies of the HLA-Cw phenotypes in patients with isolated periorbital angioedema were not significantly different from those in the control group. *Conclusions:* HLA-Cw7 is a genetic marker which is specifically associated to the population with NSAID-induced anaphylactoid reactions. The clinical and genetic heterogeneity of the various types of reactions probably expresses the existence of diverse pathogenetic mechanisms in these forms of hypersensitivity adverse reactions.

KEY WORDS: HLA / Non-steroidal antiinflammatory drugs / Adverse reaction.

INTRODUCCION

El análisis de la asociación entre un marcador genético y una enfermedad determinada requiere, en primer lugar, una estricta definición y clasificación de sus diferentes fenotipos clínicos y biológicos¹. La enfermedad puede ser definida por la existencia de determinados síntomas o signos (como por ejemplo, las enfermedades psiquiátricas), por hallazgos histopatológicos específicos (las neoplasias), por una determinada anormalidad inmunológica (p. e., infección por virus de la inmunodeficiencia humana) o por la respuesta del órgano diana a uno o varios estímulos (enfermedades endocrinológicas o incluso, el asma bronquial).

Potencialmente, las reacciones idiosincrásicas a fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) pueden ser definidas fenotípicamente por, al menos, 3 de las características anteriormente enunciadas: la existencia de un patrón clínico definido (enfermedad concomitante asociada²⁻⁴), la asociación con una determinada anormalidad inmunológica (como por ejemplo, el rasgo atópico⁵) y la respuesta clínica durante la provocación oral controlada (POC)⁶⁻⁸.

Si la enfermedad (reacción idiosincrásica inducida por AINEs) estuviera asociada de forma estadísticamente significativa con un marcador determinado, esto podría sugerir que el locus (o loci) estudiados tienen una relación causal directa con el fenotipo o bien, que está en desequilibrio de unión con un locus adyacente que puede tener un papel etiológico.

El objetivo de este estudio es delimitar el papel del sistema principal de histocompatibilidad (HLA) en la génesis de este tipo de reacciones. Hasta el momento actual, solamente el tipaje de las moléculas HLA de clase I ha sido realizado, pero dada la relevancia de estos resultados se ha decidido, de forma preliminar, comunicar estos hallazgos.

PACIENTES Y METODOS

Pacientes

Se han incluido en el estudio sujetos con historia sugestiva de reacción idiosincrásica tras la

administración de AINEs: episodios de rinoconjuntivitis y/o asma bronquial, edema en piel y/o mucosas, lesiones cutáneas de cualquier morfología y reacción anafilactoide.

Los aspectos relacionados con la selección de pacientes, el estudio alergológico previo, la inclusión en protocolos específicos de provocación y la valoración de las respuestas clínicas durante la POC han sido descritas previamente de forma detallada^{6,7}.

Noventa pacientes presentaron una POC positiva con uno o varios AINEs. Cincuenta sujetos (55,5 %) presentaron exclusivamente angioedema periorbitario (AEP) aislado. Los 40 restantes se distribuyeron de la siguiente forma: 20 pacientes presentaron reacción anafilactoide (RA), 13 exhibieron diversos tipos de exantemas cutáneos y 7 pacientes presentaron asma bronquial.

La distribución de los pacientes, dependiendo de la existencia de enfermedad concomitante y del patrón de reactividad cruzada con otros AINEs, aparece resumida en la Tabla I. Los sujetos eran diagnosticados de enfermedad atópica si cumplían los siguientes criterios: 1) existencia de rinitis, conjuntivitis y/o asma bronquial; y 2) prick-test de 3 mm de diámetro o mayor que el control negativo a uno o más de los siguientes grupos de alérgenos: ácaros del polvo doméstico y de depósito, hongos, derivados dérmicos de mamíferos o pólenes (Laboratorios Ifidesa-Arístegui S. A. Bilbao).

El patrón de reactividad cruzada múltiple se definió por la existencia de, al menos, una reacción durante la POC con un AINE diferente y no estructuralmente relacionado al que indujo la reacción histórica previa. Los pacientes incluidos en el grupo de patrón selectivo experimentaban la reacción durante la POC únicamente con el fármaco involucrado en la reacción histórica, o bien, en el caso de pacientes con una RA previa, se documentaba la tolerancia al resto de AINEs no estructuralmente relacionados con el que indujo la reacción previa⁷.

Sujetos controles

Las poblaciones de control para el análisis de las frecuencias de las especificidades HLA-A, -B y -Cw, se constituyeron con sujetos étnicamente

Tabla I. Características clínicas de los pacientes y controles

Rasgo fenotípico	Pacientes				Controles	
	AEP	RA	CUT	R/AB		
Tipo	50	20	13	7		
Patrón	Múltiple	Selectivo				
	70	20				
Atopia	No atópicos	Atópicos			Atópicos	No atópicos
	21	69			83	61
	90				144	

AEP, angioedema periorbitario aislado; RA, reacción anafilactoide; CUT, rashes urticariales y no urticariales; R/AB, rinitis y/o asma bronquial.

homogéneos, pertenecientes a la misma área geográfica, la Isla de Gran Canaria. Se utilizó una población de 144 sujetos con una historia sugestiva de reacción idiosincrásica inducida por AINES que no fue objetivada durante la provocación oral controlada. Ochenta y tres sujetos eran atópicos y 61 no atópicos.

Extracción de muestra de sangre venosa

En los sujetos controles y en pacientes con reacciones idiosincrásicas a AINES, se procedió a obtener una muestra de sangre venosa periférica, utilizándose una parte para el análisis serológico de las moléculas de histocompatibilidad de clase I.

Tipaje de los antígenos HLA de clase I

El tipaje de los antígenos HLA-A, -B y Cw se realizó por un ensayo de microlinfotoxicidad estándar⁹. Las células mononucleares de sangre periférica, aisladas por centrifugación de un gradiente de Ficoll-Hypaque, se incubaron en placas multipocillo tipo Terasaki, 30 minutos a temperatura ambiente, con sueros que reconocen las distintas especificidades HLA de clase I. Posteriormente, se añadieron 6 µL de complemento de conejo (Behring-Werke AG, Marburg, Alemania) a cada pocillo y se dejó incubar durante un período de 60 minutos. Posteriormente se procedió a añadir 3 µL de eosina por pocillo y a los 3 minu-

Tabla II. Batería de especificidades HLA-A, -B y -Cw utilizadas

HLA-A	HLA-B	HLA-C
A1 ^a	B7 ^a	Cw1 ^c
A2 ^b	B8 st	Cw2 ^d
A3 ^a	B13 ^d	Cw3 ^a
A11 ^c	B14 ^d	Cw4 ^d
A23 ^a	B17 ^c	Cw5 ^a
A24 ^d	B18 ^c	Cw6 ^d
A25 ^d	B27 ^d	Cw7 ^b
A26 ^d	B35 ^a	Cw8 ^c
A28 ^c	B37 ^b	
A29 ^a	B38 ^d	
A30 ^c	B39 ^a	
A31 ^a	B41 ^c	
A32 ^a	B42 ^c	
A33 ^a	B44 ^d	
A34 ^a	B45 ^d	
	B47 ^a	
	B49 ^c	
	B50 ^c	
	B51 st	
	B52 ^b	
	B53 ^a	
	B54 ^c	
	B55 ^a	
	B56 ^d	
	B60 ^c	
	B61 st	
	B62 ^c	
	B63 st	
	B67 st	

^a Biotest, Alemania.

^b Fresenius, Alemania.

^c Pel-Freez, USA.

^d Behring-Werke AG, Alemania.

^e Trastype diagnost, USA.

st Antisuero de intercambio entre diferentes equipos de investigadores.

tos se fijaron las células con un 6 μ L de solución de formol al 37 %. La lectura de los resultados se realizó en un microscopio invertido de contraste de fase. Se valoró la muerte celular inducida por la acción del complemento sobre aquellas células que presentaban unión con el antisuero (células de color rojo). Las reacciones se cuantificaron utilizando la nomenclatura usada internacionalmente: 8 (80-100 % de linfocitos muertos (1m por pocillo), 6 (60-80 % de 1m por pocillo), 4 (40-60 % de 1m por pocillo) y 2 (20-40 % de 1m por pocillo), considerando positivos aquellos pocillos con lecturas iguales o superiores a 6. El grupo de antisueros empleados cubrían las especificidades descritas en la Tabla II.

Análisis estadístico

El test de Chi cuadrado fue el método utilizado para comparar las frecuencias de los fenotipos HLA entre los pacientes con reacciones idiosincrásicas a AINEs y los controles. Un valor p menor de 0,05, tras la corrección de Bonferoni¹⁰, se consideró como diferencia significativa entre grupos. La cuantificación de la magnitud de la asociación entre las frecuencias fenotípicas con los distintos tipos de reacciones a AINEs se realizó por el método de Woolf-Haldane^{11, 12}. El cálculo de los intervalos de confianza (95 %) del riesgo relativo se calcularon por el método de Miettinen.

Todos los grupos de pacientes fueron comparados con el grupo global de pacientes controles, excepto en el caso del grupo de pacientes atópicos y no atópicos con reacciones idiosincrásicas a AINEs, que fueron comparados con sus grupos controles respectivos. En el caso de los pacientes con angioedema periorbitario aislado, dada su asociación sistemática con alguna enfermedad atópica^{6, 7}, la comparación se realizó exclusivamente con el grupo de sujetos controles atópicos. Los cálculos estadísticos para todas estas pruebas fueron realizados por un ordenador personal Invest PC 486, con el programa de investigación bioestadística RSIG-MA®.

RESULTADOS

Análisis de los fenotipos en la población global de pacientes

1. *Existencia de enfermedad vs control.* La distribución de los fenotipos de las moléculas HLA-A y -B de la población global de pacientes con reacciones idiosincrásicas a AINEs y de los diferentes rasgos fenotípicos analizados (patrón de reactividad cruzada, atopia y respuesta clínica durante la POC) con respecto a la población control, no mostraron diferencias significativas. El fenotipo HLA-Cw7 estuvo significativamente ($p < 0,05$) elevado en los pacientes con reacciones idiosincrásicas a AINEs (véase Tabla III).

Tabla III. Frecuencias del fenotipo HLA-Cw7 en pacientes con reacciones a AINEs y controles

		Frecuencia de HLA-Cw7 (%)		χ^2	P _c	RR (IC 95 %)
		Pacientes	Control			
Población global		35,6	13,2	16,2	< 0,05	3,6 (1,9-6,7)
Reactividad cruzada	Múltiple	30,0	13,2	8,7	< 0,05	2,8 (1,5-5,5)
	Selectivo	55,0	13,2	19,2	< 0,05	8,0 (3,1-19,9)
Atopia	Sí	30,4	14,5	5,3	0,08	
	No	52,4	11,5	14,7	< 0,05	8,4 (2,8-24,8)
AEP		28,0	14,5	3,6	0,27	
RA		52,6	13,2	16,6	< 0,01	7,3 (2,8-18,9)

AEP, angioedema periorbitario aislado; RA, reacción anafilactoide; RR, riesgo relativo; χ^2 chi cuadrado; P_c, valor p corregido; IC, interno de confianza (95 %).

2. *Patrón de reactividad cruzada vs control.* El HLA-Cw7 estuvo presente en 21 pacientes con patrón múltiple ($p < 0,05$) y también en 11 sujetos con patrón selectivo ($p < 0,05$). El riesgo relativo asociado fue superior (8,0) en los pacientes con patrón selectivo con respecto a aquellos que mostraban un patrón múltiple (2,8).

3. *Rasgo atópico vs control.* La especificidad HLA-Cw7 en los pacientes atópicos con reacciones idiosincrásicas no estuvo incrementada con respecto al grupo control de pacientes atópicos. Por el contrario, el HLA-Cw7 es la única especificidad que muestra una asociación significativa ($p < 0,05$) con el grupo de pacientes no atópicos con reacciones idiosincrásicas.

Análisis de los fenotipos en los pacientes con AEP aislado y RA

Los fenotipos de las moléculas HLA-C de los pacientes con AEP aislado no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control. Por el contrario, el HLA-Cw7 es la única especificidad significativamente ($p < 0,01$) elevada en el grupo de pacientes con RA con respecto a los pacientes del grupo control.

DISCUSION

El análisis de las moléculas de clase I en la población global de pacientes con reacciones idiosincrásicas a AINEs no reveló diferencias significativas en los alelos HLA-A y -B estudiados, aunque existió una frecuencia significativamente ($p < 0,05$) mayor de la especificidad HLA-Cw7 con respecto a la población control con tolerancia a AINEs.

Los antígenos de clase I han sido sistemáticamente estudiados en otras series de pacientes con asma bronquial inducido por AINEs^{13, 14}, no habiéndose demostrado ninguna asociación significativa. Por su parte, el HLA-Cw7 ha sido asociado, entre otras patologías, a la hepatitis crónica activa de etiología no vírica¹⁵ y a la respuesta favorable a la inmunoterapia con interleucina-2 en pacientes con melanoma metastásico¹⁶.

Recientemente, se ha descrito que la atopia se asocia de forma significativa a las reacciones adversas de tipo respiratorio y anafilactoide inducidas por AINEs⁵. Es más, se han descrito varias asociaciones de marcadores HLA de clase II con el asma bronquial inducido por AINEs, pero exclusivamente en un contexto atópico¹⁷. Al analizar nuestra población global por este rasgo fenotípico, los resultados son parcialmente discordantes con estas observaciones previas. Primero, nuestro grupo de pacientes está compuesto mayoritariamente por pacientes con reacciones de tipo no respiratorio. Segundo, aunque la prevalencia global de atopia en nuestra población de pacientes es superior^{6, 7} a la observada en la población general de las Islas Canarias¹⁸, sólo son los grupos de pacientes con angioedema periorbitario aislado y con manifestaciones respiratorias en donde aparece patente esta asociación^{6, 7}. Tercero, el HLA-Cw7 mostró una asociación significativa en el grupo de pacientes no atópicos con reacción idiosincrásica a AINEs (mayoritariamente constituido por las reacciones de tipo anafilactoide).

De los datos presentados puede extraerse que el riesgo relativo que confiere HLA-Cw7 es independiente de la existencia de atopia y básicamente está relacionado con la expresión clínica de la enfermedad, especialmente en el caso de reacciones de tipo sistémico.

Cuando analizamos los diferentes fenotipos clínicos obtenidos tras la POC, aparecen otras diferencias adicionales: en primer lugar, que la especificidad HLA-Cw7 estuvo significativamente aumentada (52 %) en los pacientes con reacción anafilactoide ($p < 0,01$) con respecto al grupo control, asociado a un riesgo relativo de 7,3; y, en segundo lugar, que las frecuencias de este alelo no difirieron significativamente con respecto al grupo control en el caso de los pacientes con AEP aislado. Así, los diferentes tipos de reacciones idiosincrásicas inducidas por AINEs se asociaron con distintos marcadores genéticos. Sin embargo, sólo una 1/3 parte de los pacientes HLA-Cw7 positivos desarrollaron reacción anafilactoide tras la exposición al AINE, implicando que la presencia de este alelo es, en la mayoría de los casos, necesaria pero no suficiente para desarrollar la reacción anafilactoide. Con todo, la frecuencia de HLA-Cw7 en estos pacientes es lo suficientemen-

te alta como para pensar en un probable papel etiológico directo o indirecto en el desarrollo de la enfermedad.

Es posible que esta heterogeneidad clínica y genética traduzca la existencia de distintos mecanismos patogénicos en estos tipos de reacciones idiosincrásicas.

La asociación de la especificidad HLA-Cw7 y las reacciones idiosincrásicas a AINEs (reacción anafilactoide) puede ser explicada de dos formas:

1. En primer lugar, es posible que la asociación obtenida con el fenotipo HLA-Cw7 pueda estar poniendo de manifiesto un desequilibrio de unión con un determinado alelo de clase II, que sí podría tener un papel fundamental en el reconocimiento específico de un hapteno derivado del AINE por parte de las células T CD4+, y desarrollar así una respuesta inmunológica mediada por anticuerpos.

2. La otra posibilidad es que un gen no-HLA que codifique algún producto involucrado en la patogénesis de la reacción anafilactoide, estrechamente unido a la región C, esté alterado en el haplotipo Cw7. Otras hipótesis similares han sido realizadas en procesos de etiología incierta asociados a genes HLA en estudios de población¹⁹, como es el caso de la narcolepsia y la hemocromatosis idiopática.

Una u otra explicación, que sin duda ulteriores investigaciones dilucidarán, implican un mismo hecho: la descripción de un marcador genético asociado con las reacciones anafilactoides inducidas por AINEs. Otros proyectos paralelos analizando las frecuencias alélicas de las subregiones DP, DQ y DR están en curso y sin duda alguna ayudarán a comprender y tipificar este grado de asociación.

AGRADECIMIENTOS

Al personal de Enfermería: Elisabet Ugarte, Teresa Martínez, Blanca González y Rosario Dávila; y Auxiliar: Carmen Teresa Santana y Gloria Henríquez, por su inestimable colaboración en la realización de este trabajo.

A la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Nuestra Señora del Pino, por todo el soporte técnico prestado.

Este trabajo ha sido financiado por una Beca de la Fundación de la Sociedad Española de Alergo-

logía e Inmunología Clínica (Convocatoria 1995) y del Fondo de Investigaciones Sanitarias (n.º de proyecto 96/0685).

BIBLIOGRAFIA

1. Dyer, P.; Warrens, A.: Design and interpretation of studies of major histocompatibility complex in disease. In: *HLA and disease*. Lechler, R. (ed.), San Diego, California, Academic Press Inc 1994: 93-113.
2. Stevenson, D. D.: Diagnosis, prevention and treatment of adverse reactions to aspirin and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74: 617-22.
3. Juhlin, L.: Recurrent urticaria: clinical investigation of 330 patients. *Br J Dermatol* 1981; 104: 369-81.
4. Czerniawska-Mysik, G.; Szczeklik, A.: Idiosyncrasy to pyrazolone drugs. *Allergy* 1981; 36: 381-4.
5. Bochenek, G.; Nizankowska, E.; Szczeklik, A.: The atopy trait in hypersensitivity to non steroidal antiinflammatory drugs. *Allergy* 1996; 51: 16-23.
6. Quiralte, J.; Blanco, C.; Castillo, R., et al.: Reacciones adversas a antiinflamatorios no esteroideos: manifestaciones clínicas durante la provocación controlada en 82 pacientes. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1995; 5: 263-71.
7. Quiralte, J.; Blanco, C.; Castillo, R., et al.: Intolerance to non steroidal antiinflammatory drugs: results of drug challenges in 98 patients. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 678-85.
8. Szczeklik, A.; Gryglewski, R. J.; Czerniawska-Mysik, G.: Clinical patterns of hypersensitivity to nonsteroidal antiinflammatory drugs and their pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 1977; 60: 276-84.
9. Hopkins, K. A.: Basic microlymphotoxicity test. In: Zachary, A. A.; Teresi, G. A. (eds.): *Laboratory manual*, 2nd ed., Lenexa, Kans.: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 1990: 195-201.
10. Dunn, O. J.: Multiple comparisons among means. *Am J Stat Assoc* 1961; 56: 52-64.
11. Woolf, B.: On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 1955; 19: 251-3.
12. Haldane, J. B. S.: The estimation and significance of the logarithm of a ratio of frequencies. *Ann Hum Genet* 1956; 20: 309-11.
13. Jones, D. H.; May, A. G.; Condemni, J. J.: HLA DR typing of aspirin sensitive asthmatics. *Ann Allergy* 1984; 52: 87-9.
14. Mullarkey, M. F.; Thomas, P. S.; Hansen, J. A., et

- al.: Association of aspirin-sensitive asthma with HLA-DQw2. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 261-3.
15. Tiwari, J. L.; Terasaki, P. I.: Overview. In: *HLA and disease associations*, Springer-Verlag, Inc, New York, 1985: 32-48.
 16. Scheibenbogen, C.; Keilholz, U.; Mytilineos, J., et al.: HLA class I alleles and responsiveness of melanoma to immunotherapy with interferon-alpha (IFN-alpha) and interleukin-2 (IL-2). *Melanoma Res* 1994; 4: 191-4.
 17. Krishnamoorthy, R.: HLA class II haplotypes in aspirin-induced asthma. In: Marsh, D. G., Lockhart, A., Holgate, S. T. (eds.), *The genetics of asthma*, Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1993: 225-34.
 18. García-Ramos, A. E.; Fernández-Caldas, E.; Seleznick, M. J., et al.: Respiratory allergies and skin test reactivity in high school students in Tenerife, Canary Islands, Spain. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1992; 2: 19-26.
 19. Trowsdale, J.; Powis, S.; Campbell, D.: The contribution of novel MHC genes to disease. In: *HLA and disease*, Lechler, R. (ed.), San Diego, California, Academic Press Inc 1994: 167-179.

Joaquín Quiralte Enríquez
Sección de Alergia
Hospital Universitario Ntra. Sra. del Pino
C/ Angel Guimerá, 93
35005 Las Palmas de Gran Canaria