

Estudio molecular preliminar de la asociación de los alelos HLA DR*15 y DQ*06 con la narcolepsia en la población cubana

Flora Calzadilla-Lugo,* Zuzet Martínez-Córdova,* Raúl Ferreira-Capote,* Yaimí Rosales,* Adriana Artiles-Valor*

RESUMEN

La narcolepsia, se caracteriza por presentar el paciente una tendencia irresistible al sueño que afecta notablemente su desempeño diario, pérdida brusca del tono muscular y alucinaciones visuales y auditivas al inicio o final del sueño. La asociación del genotipo complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) con la narcolepsia se conoce desde 1983 y es el aspecto que más se ha abordado para su diagnóstico y el conocimiento de su etiopatogenicidad. En la actualidad se conoce que los alelos DRB1*1501 y el DQB1*0602 están presentes en el 95-98% de los pacientes caucásoides. El DQB1*0602 es en la actualidad el mejor marcador de la enfermedad y está asociado con la aparición y severidad de la cataplexia. Los objetivos del presente trabajo fueron introducir en Cuba un método basado en el análisis del ADN para la detección de los alelos HLA asociados con la narcolepsia y evaluar el comportamiento de estos alelos en los pacientes narcolépticos en esta población. Se estudiaron 36 pacientes, divididos por razas que fueron evaluados clínicamente como narcolépticos y se realizó la detección de los alelos DR*15 y DQ*06 empleando la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores de secuencia específica (PCR-SSP). El 77.7% de los pacientes resultó positivo al alelo DR*15 y el 86.1% fue positivo al alelo DQ*06, correspondiéndose estos resultados con los reportados por la literatura. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la presencia de ambos alelos en los grupos raciales analizados.

Palabras clave: MHC, HLA, narcolepsia, alelos.

ABSTRACT

*Narcolepsy is a sleep disorder characterized by severe, irresistible daytime sleepiness and sudden loss of muscle tone (cataplexy), and can be associated with sleep-onset or sleep-offset paralysis and hallucinations, frequent movement and awakening during sleep, and weight gain. Since 1983 it is known the association between narcolepsy and HLA genotype and its role in diagnosis and etiopathogenicity of the disease. Nowadays many researchers have studied HLA alleles DRB1*1501 and DQB1*0602 behaviour in different populations as Caucasoids, African Americans, Japanese, Chinese, etc. The DQB1*0602 allele is the best genetic marker for narcolepsy and it is associated with the appearance and severity of cataplexy. The aim of this paper is to introduce a molecular method for the detection of the HLA alleles associated with narcolepsy in Cuba and assess their role in our narcoleptic patients. We studied the presence of DR*15 y DQ*06 HLA alleles in 36 narcoleptic patients separated in two ethnic groups. The 77.7% of our patients were positive to the presence of DR*15 allele and the 86.1% were positive to DQ*06 allele, these findings agree with previous reports. No significant differences were found between the two ethnic groups concerning the presence of both alleles.*

Key words: HLA, narcolepsy, alleles.

* Departamento de Genética Molecular, Hospital "Hermanos Ameijeiras", Ciudad de La Habana, Cuba.

Correspondencia:
MSc Zuzet Martínez-Córdova
San Lázaro Núm. 701, Esquina a Belascoán. Centro Habana, 10700 Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: zuzet.mtnez@infomed.sld.cu

Recibido: 10-04-2007

Aceptado: 10-03-2008

INTRODUCCIÓN

La narcolepsia es una enfermedad cuya patogénesis está relacionada con la disfunción de estructuras neurales que intervienen en el ciclo sueño - vigilia y que puede ser primaria o secundaria a lesiones del sistema nervioso central. Entre sus síntomas fundamentales podemos mencionar la excesiva somnolencia diurna, alteraciones del sueño REM, parálisis del sueño, alucinaciones hipnagónicas y la cataplexia. Estudios epidemiológicos de la narcolepsia muestran que la prevalencia de la narcolepsia/cataplexia se ha reportado entre 25 y 35 por cada 100,000 individuos.¹ Los reportes sobre la incidencia son limitados y reportan resultados de 0.74 por cada 100,000 individuos.²

La asociación del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) con la narcolepsia se conoce desde 1983.³ Los alelos DRB1*1501 y el DQB1*0602⁴ están presentes en el 95-98 % de los pacientes caucásoides. Este último se considera el mejor marcador de la enfermedad y se asocia con la aparición y severidad de la cataplexia.

El genotipaje de los alelos de susceptibilidad en genes del HLA ha sido estudiado en diferentes grupos étnicos⁵ demostrándose una fuerte asociación en el caso del alelo DQB1*-0602 y un efecto protector de los alelos DQB1*0601, DQB1*0501, DQA1*01. El alelo DRB1*1501 también se considera de susceptibilidad mientras en DRB1*1502 se asocia con un efecto protector. Resulta de gran importancia el genotipaje en el diagnóstico de la narcolepsia para valorar aquellos alelos que aportan susceptibilidad o resistencia a la enfermedad, además de establecer su papel en la fisiopatología de la enfermedad, como es la aparición de la cataplexia asociada a la presencia del haplotipo DRB1*1502/DQB1*0602.⁵

La aparición de la narcolepsia/cataplexia ocurre frecuentemente durante la adolescencia y persiste durante toda la vida. Estudios fisiopatológicos han mostrado que esta enfermedad se produce por la pérdida temprana de neuronas del hipotálamo productoras de hipocretina, un neurotransmisor presente en el fluido cerebroespinal.¹

Como muchas de las enfermedades asociadas al HLA, son de naturaleza autoinmune, se ha propuesto la hipótesis de que esta pérdida neuronal podría ser de origen autoinmune, pues la mayoría de los pacientes narcolépticos son portadores del alelo HLA DQB1*0602 que predispone a los individuos a padecer dicha enfermedad. Numerosos reportes han intentado demostrar la naturaleza autoinmune⁶⁻⁸ de la narcolepsia aunque los resultados de las pruebas inmunopatológicas descri-

tas en otras enfermedades autoinmunes como son: la velocidad de sedimentación de los eritrocitos de sangre periférica, la proteína C reactiva, factores del complemento y subpoblaciones de linfocitos, no han logrado sustentar esta hipótesis. Con el objetivo de demostrar la importancia de la autoinmunidad en la etiología de la narcolepsia numerosos estudios actuales se han encaminado en esta dirección sin éxito.⁹⁻¹⁴

El tratamiento de la narcolepsia está basado en el empleo de fármacos estimulantes para la supresión de la somnolencia diurna, fármacos antidepresivos para la cataplexia y el γ -hidroxibutirato para ambos síntomas.¹

Por la importancia que tiene la enfermedad en el contexto social y en la calidad de vida del paciente, debe incluirse en su manejo clínico los aspectos inmunológicos vinculados a ella, especialmente el tipaje HLA.

Las diferencias observadas en el grado de asociación étnica de estos alelos con la narcolepsia⁵ exige que cada población sea definida particularmente, más aún aquéllas como la nuestra con un alto nivel de mezcla racial. Es por ello que nuestro principal propósito en este artículo consiste en caracterizar de forma preliminar el comportamiento de esos alelos en nuestros pacientes narcolépticos y emplearlos como marcadores de valor diagnóstico en esta enfermedad.

MÉTODOS

Selección de los pacientes

Fueron estudiados 36 pacientes procedentes de la consulta de neurofisiología que se ocupa del estudio de los trastornos del sueño del hospital "Hermanos Ameijeiras". La etnicidad fue definida como blancos (primera o segunda generación blancos) (n = 18) y negros (n = 18) (mezcla racial en la primera o segunda generación). En el análisis del comportamiento de la frecuencia de ambos alelos en la población de narcolépticos se empleó un control histórico obtenido a partir del análisis de las frecuencias de los alelos HLA clase I y clase II en la población sana cubana.¹⁵

La clasificación de pacientes en narcolépticos se llevó a cabo mediante un estudio polisomnográfico nocturno. Además fueron registradas derivaciones del electroencefalograma, electrooculograma, electromiografía del mentón, y de ambos músculos tibiales anteriores, electrocardiograma, flujo aéreo nasobucal, movimientos respiratorios torácico y abdominales, saturación de oxígeno, y electromiografía. Fue monitoreada mediante video la conducta durante el sueño y al día siguiente se realizó la prueba de laten-

cias múltiples del sueño, con siestas de veinte minutos en un intervalo de 2 h.

En este estudio fueron incluidos todos los pacientes narcolépticos de nuestra población previamente caracterizados clínicamente, el tamaño de muestra es pequeño pues esta enfermedad se caracteriza por presentar una baja prevalencia e incidencia.^{1,2}

Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó por el método de Bunce y Welsh,¹⁶ a partir de 5 mL de sangre periférica. La concentración exacta de ADN se calculó a partir de la medición de la densidad óptica en espectrofotómetro y se ajustaron a 100 ng/ μ L.

Detección de los alelos HLA-DR*15 y HLA-DQ*06

La detección de estos alelos se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con cebadores de secuencia específica (PCR-SSP)¹⁷ de baja a media resolución. Para evidenciar la presencia del producto amplificado se realizó una electroforesis en agarosa al 2% teñida con bromuro de etidio.

Para la identificación de las bandas correspondientes al control interno y a cada alelo se emplearon dos marcadores de peso molecular de 100 pb y 200 pb (Invitrogen-GIBCO, EU) en cada corrida electroforética.

Cebadores

Los cebadores utilizados se presentan en el cuadro I.

Ética

En todos los casos se respetaron las normas de seguridad y el Reglamento de Atención al Paciente insti-

tuido en el Hospital "Hermanos Ameijeiras", que incluyen la aplicación del consentimiento informado.

Análisis estadístico

Los resultados se presentan como frecuencias y proporciones. Para realizar el análisis del comportamiento de los alelos DR*15 y DQ*06 en la población se empleó el estadígrafo χ^2 , se consideró la prueba estadísticamente significativa si se obtenía un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Los por cientos de positividad de los alelos DR*15 y DQ*06 en ambos grupos étnicos se reportan en el cuadro II.

No se observó una diferencia estadísticamente significativa al aplicar el estadígrafo χ^2 en cuanto al comportamiento de ambos alelos en los grupos raciales analizados. La frecuencia de ambos alelos en los grupos raciales de pacientes narcolépticos fue mayor que la reportada para la población cubana sana¹⁵ (Cuadro III).

DISCUSIÓN

La fisiopatología de la narcolepsia se relaciona con una disfunción de la neurotransmisión hipocretina/orexina, causada por una pérdida temprana de las neuronas del hipotálamo productoras de hipocretina, un neurotransmisor (neuropéptido) presente en el fluido cerebroespinal.¹⁸ En los modelos caninos la causa de esta disfunción se asocia con mutaciones en los genes que codifican para el receptor 2 de la hipocretina.

La causa de la narcolepsia en humanos aún se desconoce, sin embargo, es posible que procesos degenerativos, genéticos o autoinmunes puedan estar implicados.¹⁹ Esta enfermedad está asociada fundamentalmente con niveles indetectables de hipocretina en

Cuadro I. Cebadores utilizados para los diferentes alelos probados.

Alelo detectado	Reacción	Cebadores (secuencia 5'-3')
HLA-DR15	PM 115 (206 pb)	TCC TGT GGC AGC CTA AGA G CCA CCG CGG CCC GCG C
HLA-DR51	PM 186 (173 pb)	GTT TCT TGC AGC AGG ATA AGT A GCT GTT CCA GTA CTC AGC G
	PM 146 (139 pb)	CCG CGG AAC GCC ACC TC TTT CGT GCT CCA GTT TAA GGC
HLA-DQ6	PM 147 (175 pb)	GAC GTG GGG GTG TAC CGC GGA GCG CGT GCG TCT TGT A
		TGC ACA CCG TGT CCA ACT C TGC ACA CCC TGT CCA CCG
Control interno	CPM (796 pb)	TGC CAA GTG GAG CAC CCA A TGC CAG AGCA TCT TGC TCT GTG CAG A

el fluido cerebroespinal.²⁰ También ha sido reportada una pérdida selectiva del ARNm de la hipocretina e inmunorreactividad en varios pacientes.²⁰

Los resultados anteriores conjuntamente con su asociación al sistema HLA han conducido a la hipótesis de una destrucción de las neuronas que producen hipocretina mediada por procesos autoinmunes. Ha sido reportada la presencia de autoanticuerpos contra los receptores 1 y 2 de la hipocretina y directamente contra las neuronas aunque no se ha logrado corroborar su papel en la disfunción de este sistema de neurotransmisión.^{13,14}

Como parte importante del diagnóstico de la narcolepsia se incluye el genotipaje HLA fundamentalmente del alelo DQB1*0602, bien caracterizado en su relación con esta enfermedad y su ausencia puede ser un criterio excluyente²¹ gracias a su fuerte asociación con esta enfermedad (una de las más fuertes asociaciones HLA-enfermedad que han sido reportadas).

El comportamiento de los alelos DRB1*1501 y DQB1*0602 en su relación con la narcolepsia ha sido estudiado en varios grupos étnicos, siendo los reportes de Mignot y cols.^{5,22} los más representativos de todos. Dicho estudio permite arribar a varias conclusiones respecto a diferentes grupos étnicos como caucasoide, afro-norteamericano y japonés, confirmando el importante papel del alelo DQB1*0602 como marcador genético de la narcolepsia en todos los grupos étnicos.^{5,22} En el caso de los caucasoideos el DRB1*1501 y el alelo DQB1*0602 fueron marcadores equivalentes con un 67% de positividad mientras que la positividad al alelo DQB1*0602 en los afro-norteamericanos fue mucho mayor (86%).²²

La baja frecuencia y prevalencia que caracteriza a esta enfermedad (afecta sólo al 0.02% de los adultos a nivel mundial)¹⁸ hace que el número de pacientes analizados en nuestro artículo sea pequeño, no obstante, realizamos un análisis preliminar del comportamiento de los alelos en dos grupos étnicos. Obteniendo un 67% de positividad para el alelo DR*15 en el caso de la raza blanca, similar a lo obtenido por Mignot,²² y un 83.3% de positividad para el alelo DQ*06 (*Cuadro II*). En el caso de la raza negra se observó equivalencia para la presencia de ambos alelos con una positividad

88.8%, con un por ciento de positividad para ambos alelos mayor que la obtenida para la raza blanca similar a lo obtenido por Mignot²² en cuanto al alelo DQ*06. Aunque los reportes de Mignot incluyen los alelos DR*1501 y DQ*0602 establecemos una comparación con los mismos, pues dada la fuerte asociación de estos alelos con la narcolepsia en estos grupos étnicos cabe esperar que los alelos involucrados en nuestros resultados sean el DQ*0602 y DR*1501 aunque sólo podamos hacer referencia al DQ*06 y al DR*15.

No se observaron diferencias significativas en cuanto a la presencia de ambos alelos en los grupos raciales analizados. El resultado obtenido no es definitivo, pues sólo ha sido estudiado un pequeño número de pacientes.

Se obtuvieron valores mayores de frecuencia para ambos alelos en la población total de pacientes narcolepticos cuando fueron comparadas con las frecuencias observadas en un estudio de la población cubana sana (*Cuadro III*).¹⁵ Estos resultados corresponden con lo reportado por la literatura acerca del comportamiento de las frecuencias de estos alelos en diferentes poblaciones.^{5,23,24}

No existe un estudio de frecuencia de los alelos DR*15 y DQ*06 en la población cubana, teniendo en cuenta una estratificación racial de la población, lo cual permitiría calcular la probabilidad de que la asociación o no de estos alelos y la narcolepsia se deba a un evento fortuito. Sin embargo, está reportado en la literatura, la frecuencia de aparición de estos alelos en las distintas etnias.^{23,25,26} Por esa razón, consideramos la posibilidad de que la población cubana se comporte de forma similar a lo reportado y se pueda utilizar la detección de ambos alelos en el diagnóstico de la narcolepsia una vez que se amplíe el número de casos estudiados.

Además debe incluirse como parte de la profundización de este estudio la realización del subtipaje de ambos alelos, pues se ha reportado que específicamente el alelo DQB1*0602 se manifiesta como el marcador de susceptibilidad más importante asociado a la narcolepsia/cataplexia mientras que el alelo DQB1*0601 aparece como protector.⁵ En cuanto al alelo DR*15 aparece el DRB1*1501 como un marcador genético de suscepti-

Cuadro II. Por ciento de positividad de los alelos DR*15 y DQ*06 en los dos grupos étnicos.

Alelos	Blancos (n = 18)	Negros (n = 18)
DR*15+	12 (66.6%)	16 (88.8%)
DQ*06+	15 (83.3%)	16 (88.8%)

Cuadro III. Comportamiento de la frecuencia de los alelos DR*15 y DQ*06 en la población de narcolepticos.

Alelos	Frecuencia del alelo en la población total de narcolepticos (%)	Frecuencia del alelo en la población Cubana (%) ¹⁵
DR*15 +	77.7	23.1
DQ*06 +	86.1	37.6

bilidad, en poblaciones chinas y caucásoides el haplotipo DRB1*1501/DQB1*0602²³⁻²⁶ manifiesta una fuerte asociación con la narcolepsia/cataplexia.

Hemos considerado este estudio como preliminar pues se emplean técnicas de genotipaje de baja a media resolución, por lo que sólo podemos determinar la presencia de los alelos DQ*06 y DR*15. Aunque según lo reportado cabe esperar en nuestros pacientes narcolepticos la presencia del alelo DQ*0602 y el DR*1501, es necesario incorporar en nuestro laboratorio las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de alta resolución y aplicarlas para completar la investigación que a continuación presentamos, y lograr determinar los alelos de susceptibilidad y resistencia a la narcolepsia en nuestra población particular.

Consideramos que hasta esta fase de estudio, el resultado ha sido positivo, puesto que se logró incorporar en el sistema de salud pública un método de biología molecular en el diagnóstico de la narcolepsia. Como se conoce, estas técnicas permiten el procesamiento de un mayor número de muestras y optimiza el tiempo de trabajo de los investigadores y técnicos e igualmente, permite la aplicación a otros estudios posteriores, además de garantizar una mayor sensibilidad y especificidad cuando se compara con los métodos sexológicos.^{27,28}

Resulta entonces, importante el hecho de haber introducido en el país estas técnicas de alto nivel científico, que reportan ventajas sociales y económicas.

Con este estudio se intenta iniciar el diagnóstico de pacientes narcolepticos en la población cubana empleando métodos moleculares. El aumento del número de muestras, la introducción de un estudio poblacional que incluya la estratificación por razas, aspecto fundamental dado el mestizaje que se observa en la población y la realización del subtipaje de los alelos involucrados en dicha patología permitirá una mejor caracterización del comportamiento de los marcadores genéticos involucrados en la narcolepsia en la población cubana.

REFERENCIAS

1. Dauvilliers Y, Carlander B, Billiard M. Narcolepsy, from Westphal to hypocretin. *Presse Med.* 2004; 33: 1593-600.
2. Longstreth WT Jr, Koepsell TD, Ton TG, Hendrickson AF, Van Belle G. The epidemiology of narcolepsy. *Sleep.* 2007; 30: 13-26.
3. Honda Y, Asaka A, Tanaka Y, Jujuy T. Discrimination of narcoleptic patients by using genetic markers and HLA. *Sleep Res.* 1983; 12: 254.
4. Mignot E, Lin X, Arrigoni J, Macaubas C, Olive F, Hallmayer J. DQB1*0602 and DQA1*0102 (DQ1) are better markers than DR2 for narcolepsy in Caucasian and black Americans. *Sleep.* 1994; 17(8 Suppl): S60-7.
5. Mignot E, Ling L, Rogers W, Honda Y, Qiu X, Lin X, et al. Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. *Am J Hum Genet.* 2001; 68: 686-99.
6. Parkes JD, Langdon N, Lock C. Narcolepsy and immunity. *Br Med J.* 1986; 292: 359-60.
7. Carlander B, Eliaou JF, Billiard M. Autoimmune hypothesis in narcolepsy. *Neurophysiol Clin.* 1993; 23: 15-22.
8. Mignot E, Tafti M, Dement W, Grumet FC. Narcolepsy and immunity. *Adv Neuroimmunol.* 1994; 5: 23-37.
9. Martínez-Rodríguez JE, Sabater L, Graus F, Irazoqui A, Santamaría J. Evaluation of hypothalamic-specific autoimmunity in patients with narcolepsy. *Sleep.* 2007; 30:27-8.
10. Fujiki N, Nishino S. Neuropeptides as possible targets in sleep disorders: special emphasis on hypocretin-deficient narcolepsy. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2007; 6: 45-62.
11. Knudsen S, Mikkelsen JD, Jennm P. Antibodies in narcolepsy-cataplexy patient serum bind to rat hypocretin neurons. *Neuroreport.* 2007; 18: 77-9.
12. Wurtman RJ. Narcolepsy and the hypocretins. *Metabolism.* 2006; 55(10 Suppl 2):S36-9.
13. Tanaka S, Honda Y, Inoue Y, Honda M. Detection of autoantibodies against hypocretin, hcrt1, and hcrt2 in narcolepsy: anti-Hcrt system antibody in narcolepsy. *Sleep.* 2006; 29: 633-8.
14. Overeem S, Verschueren JJ, Fronczek R, Schreurs L, den Hertog H, Hegeman-KleinnIM, et al. Immunohistochemical screening for autoantibodies against lateral hypothalamic neurons in human narcolepsy. *J Neuroimmunol.* 2006; 174: 187-91.
15. Morera BL, Ustáriz GC, García GM, Báez DN, Díaz LR, Guerreiro HA y cols. Frecuencia fenotípica y génica de los antígenos HLA en una muestra de la población cubana. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2005; 21(3). Disponible en: <http://bvb.sld.cu/revistas>.
16. Bunce M, Welsch KI. PCR-SSP typing. *Rev Immunogenetics.* 1999; 1: 157.
17. Orelup O, Zetterquist H. PCR - SSP in HLA genotyping. *Tissue Antigens.* 1992; 39: 225-35.
18. Dauvilliers Y, Arnulf I, Mignot E. Narcolepsy with cataplexy. *Lancet.* 2007; 369: 499-511.
19. Dauvilliers Y, Tafti M. Molecular genetics and treatment of narcolepsy. *Ann Med.* 2006; 38: 252-62.
20. Mignot E. A Hundred years of narcolepsy research. *Arch Ital Biol.* 2001; 139: 207-18.
21. Deflandre E, Roelants F, Cambon L, Poirrier R. Narcolepsy-cataplexy. *Rev Med Liege.* 2002; 57: 519-24.
22. Mignot E, Hayduk R, Black J, Grumet FC, Gulleminault C. US Modafinil in narcolepsy study group. *Sleep Res.* 1997; 26: 433.
23. Jeong JH, Hong SC, Shin YK, Han JH, Lee SP. HLA-DQB1 allele and hypocretin in Korean narcoleptics with cataplexy. *J Korean Med Sci.* 2007; 22: 127-31.
24. Okun ML, Lin L, Pelin Z, Hong S, Mignot E. Clinical aspects of narcolepsy-cataplexy across ethnic groups. *Sleep.* 2002; 25: 27-35.
25. Roh EY, Park MH, Park H, Park DH, Choi JB, Kim SJ, et al. Association of HLA-DR and -DQ genes with narcolepsy in Koreans: comparison with two control groups, randomly selected subjects and DRB1*1501-DQB1*0602-positive subjects. *Hum Immunol.* 2006; 67: 749-55.
26. Dolenc-Grosel L, Vodusek DB. The importance of HLA DQB1*0602 typing I in Slovene patients with narcolepsy. *Cell Mol Biol Lett.* 2002; 7: 359-60.
27. Bonet-Roselló L, Martínez-Córdova Z. Los métodos serológicos y moleculares en la tipificación de los antígenos de leucocitos humanos. Minirevisión. *Bioquímica* 2004; 29: 126-30.
28. Han F, Chen EZ, Wei HL, Dong XS, Li J, Li M, et al. HLA-DRB and -DQB allele contribution to narcolepsy susceptibility in Chinese patients with narcolepsy. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2003; 83: 644-6.