

Asociación del HLA Clase II con la Hepatitis Autoinmune en Latinoamérica: Meta-análisis

Sustentación de Tesis
Adriana Rojas Villarraga
Centro de Estudio de Enfermedades Autoinmunes (CREA)
Estudiante Epidemiología
Cohorte 25
Universidad del Rosario - CES



AUTORES

- **Carolina Duarte-Rey.** Médico Rural y Asistente de Investigación Centro de Estudio de Enfermedades autoinmunes (CREA)
- **Aryce L. Pardo.** Magister (c) Escuela Bioestadística Universidad Nacional de Colombia, Investigador Corporación Para Investigaciones Biológicas
- **Yolima Rodríguez-Velosa.** Médico Rural y Asistente de Investigación Centro de Estudio de Enfermedades autoinmunes (CREA)
- **Rubén D. Mantilla.** Médico Reumatólogo. Clínica de Artritis y Rehabilitación Riesgo de Fractura S.A.
- **Juan-Manuel Anaya.** Médico Internista, Reumatólogo, PhD (c) Inmunogenética. Director CREA. Investigador Oklahoma Medical Research Foundation (OMRF)



INSTITUCIONES PARTICIPANTES

- Centro de Estudio de Enfermedades Autoinmunes CREA (Facultad de Medicina, Universidad del Rosario, Bogotá– Corporación Para Investigaciones Biológicas, Medellín)
- Clínica de Artritis y Rehabilitación Riesgo de Fractura S.A., Bogotá



MARCO TEORICO Problema Justificación



Autoinmunidad y Enfermedad Autoinmune

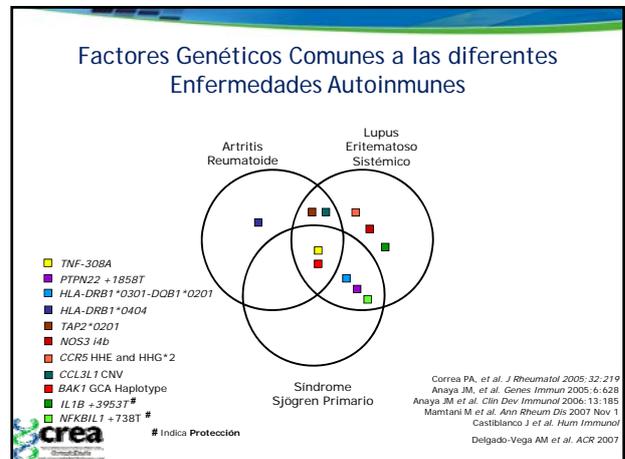
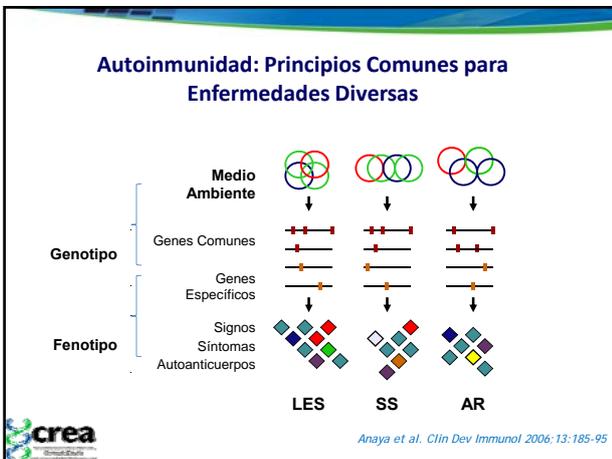
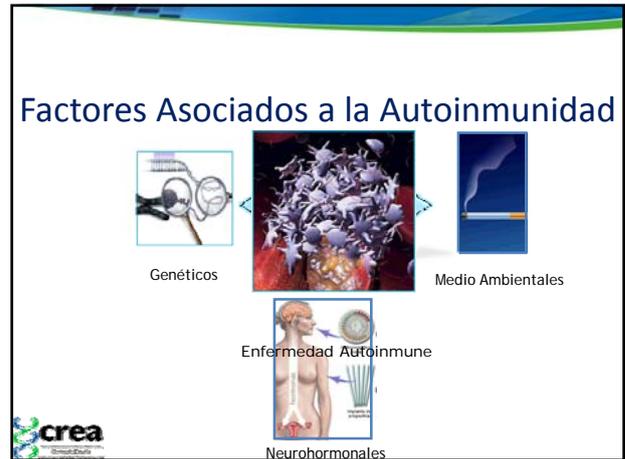
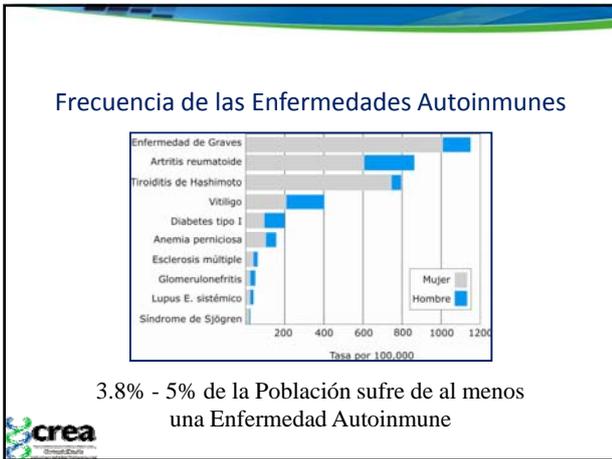
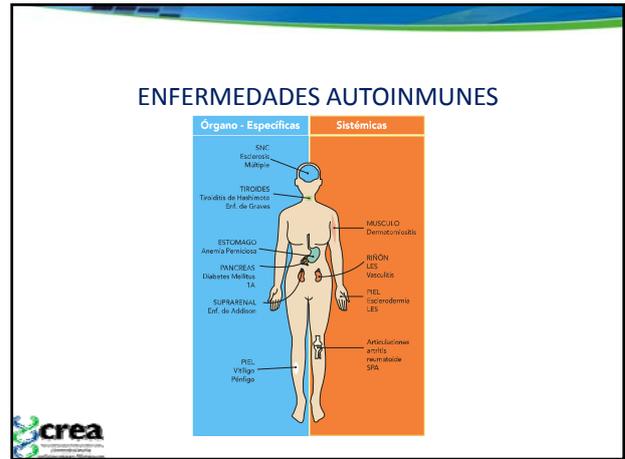
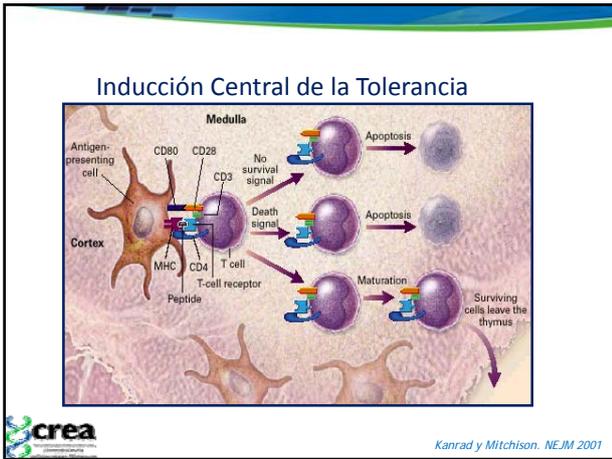
- ✓ La autoreactividad es fisiológica.
- ✓ La enfermedad autoinmune es el proceso patológico (daño tisular) producido por la pérdida de la tolerancia (autoreactividad patológica).
- ✓ Enfermedad causada por la activación de linfocitos T o B, ó ambos, en ausencia de causa discernible (ej. infección, cáncer, medicamentos).



Daño Tisular en Enfermedad Autoinmune

- **Mecanismo Celular** mediante lisis de la célula blanco por necrosis mediada por perforinas o por apoptosis inducida por Granzima B.
- **Mecanismo Humoral** a través de complejos inmunes, citolisis o fagocitosis de la célula blanco, o mediante interferencia de la fisiología celular.





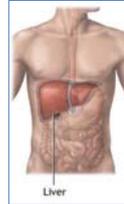
HEPATITIS AUTOINMUNE



- Enfermedad Autoinmune (EAI) hepática crónica
- secundaria a la pérdida de la tolerancia del sistema inmunológico
- Cambios en la histología hepática (hepatitis en la interfase)
- Anticuerpos circulantes e hipergamaglobulinemia



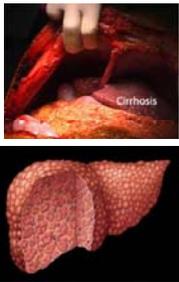
HEPATITIS AUTOINMUNE



- Mujeres en todos los rangos de edad
- Clasificada en tres grupos de acuerdo al comportamiento clínico (Tipo 1, 2 y 3), edad de presentación y características serológicas.



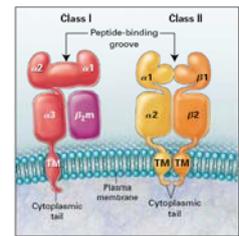
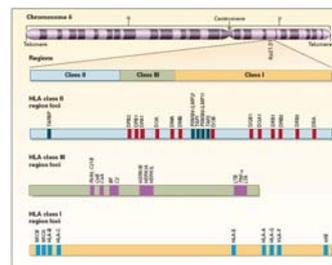
HEPATITIS AUTOINMUNE



- 11 y 23% de los pacientes con enfermedad crónica hepática
- 6% de los trasplantes hepáticos en Estados Unidos y 3% en países europeos
- Prevalencia: 11.6 – 16.9 casos por 100 mil habitantes



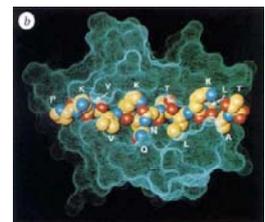
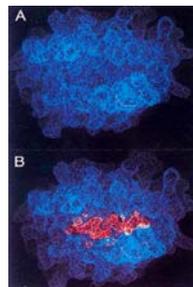
Factores Genéticos HAI



- ✓ Presentación de antígenos a través del HLA (Antígeno leucocitario Humano)
- ✓ Generación de respuesta inmune a través de dicha presentación
- ✓ Presentación de antígenos propios por parte de algunos antígenos crípticos del HLA



HLA : Bolsillos libres y conteniendo un péptido propio



PROBLEMA

- Los factores genéticos de las EAI son difíciles de definir debido al alto polimorfismo de los genes candidatos encontrados hasta ahora, y a la variabilidad poblacional de éstos
- La predisposición genética de las EAIs está demostrada: Concordancia y Agregación
- EAI han sido consideradas individualmente y en pocos estudios en una misma población



JUSTIFICACION

- Hepatitis Autoinmune (HAI) se encuentra frecuentemente asociada a la presencia de otras EAI
- Comparte un origen genético común con las otras EAI
- Enfermedad fulminante en la mayoría de los pacientes
- Diferentes antígenos del HLA asociados



JUSTIFICACION

- Identificación de factores comunes del HLA Clase II que contribuyen a la susceptibilidad de desarrollar HAI en Latinoamérica (población étnica y ancestralmente enriquecida)
- Hallazgo de factores genéticos comunes a la HAI en este tipo de población, aportará al estudio genético de todas las EAIs y así a su posible predicción y prevención



Pregunta de Investigación Objetivos



Pregunta de Investigación

- *Existe asociación entre la presencia de alelos del Antígeno Leucocitario Humano Clase II y la presencia de Hepatitis Autoinmune en pacientes Latinoamericanos?*



OBJETIVO GENERAL

- Determinar la presencia de asociación entre los alelos comunes del HLA de clase II y la presentación de HAI informados en la literatura de pacientes latinoamericanos.



OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Describir los factores genéticos del HLA clase II informados en estudios de casos y controles realizados en pacientes Latinoamericanos con HAI
- ✓ Incrementar el conocimiento del origen genético común para las EAIs en pacientes Latinoamericanos
- ✓ Realizar un análisis funcional de los alelos DQ y DR que se encuentren asociados al riesgo de presentar HAI en pacientes Latinoamericanos, detallando las similitudes y diferencias fisicoquímicas de los mismos.



OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Describir los principales hallazgos clínicos de los pacientes con HAI a nivel latinoamericano y de las principales series mundiales



METODOLOGIA



✓ Diseño

Estudio tipo Revisión Sistemática con análisis del tipo meta –análisis de estudios de casos y controles de HLA en HAI en Latinoamérica

✓ Hipótesis

Existe una asociación significativa (protección o riesgo) entre los alelos del HLA de Clase II y la presencia de Hepatitis Autoinmune en pacientes latinoamericanos.



Población y Muestra

- Revisión sistemática de la literatura
- Dos expertos de manera independiente (ARV y CDR)
- Diferentes bases de datos: MEDLINE, PubMed, SciELO, Bireme, Cochrane y LILACS
- Hasta junio de 2008
- Todos los estudios de asociación genética que evaluarán los alelos del HLA en pacientes con HAI



Revisión Sistemática

- Humanos, escritos en español, portugués e inglés.
- **Majr** (Término del tópico de mayor interés): “Hepatitis Autoinmune”, “Hepatitis Autoimmune” y “Hepatitis Chronic”
- **MeSH** (Medical Subject Headings): “HLA Antigens”, “Antígenos del HLA” “Complejo Mayor de Histocompatibilidad” “Major *Histocompatibility Complex*”



- Combinación con los siguientes términos MeSH en los tres idiomas: "South America", "Mexico", "North America", "Central America", "Argentina", "Bolivia", "Brasil", "Chile", "Colombia", "Costa Rica", "Cuba", "Ecuador", "El Salvador", "Guatemala", "Honduras", "México", "Nicaragua", "Panamá", "Paraguay", "Perú", "Puerto Rico", "República Dominicana", "Uruguay", "Venezuela "
- Términos DeCs en Bireme, LILACAS, BVS



- ### CRITERIOS DE INCLUSION
- Estudios desarrollados en países de Latinoamérica
 - Diseño de casos y controles
 - Estudios que brindaran el Odds Ratio (OR) y el intervalo de confianza (IC) del 95% o información suficiente para poder calcularlos
 - Criterios para incluir a los pacientes con HAI fueron los establecidos por el Consenso del Grupo internacional de Hepatitis Autoinmune entre 1993 y 1999 y que tuvieron tamizaje para descartar infección Viral por Hepatitis antes de su inclusión
 - Manuscritos con orientación de revisión por pares y disponibilidad de texto completo



- ### CRITERIOS DE EXCLUSION
- Estudios en otros idiomas diferentes a los establecidos en la revisión sistemática
 - Estudios sin posibilidad de obtener los datos del OR y el IC o sin datos para poder calcularlo
 - Estudios que brindan únicamente otros datos genéticos diferentes al HLA
 - Estudios que incluyeron población diferente a la latinoamericana
 - Literatura Gris



Variable	Definición Operativa	Tipo de Variable	Escala de Medición
Autor	Nombre del Primer autor del trabajo	Nominal	Cadena
País	Nombre del País al cual pertenecían los individuos que fueron analizados	Nominal	Cadena
Criterios diagnósticos para HAI utilizados	Clasificación que fue tomada en cuenta para definir la HASI en los pacientes incluidos	Categoría	1. Consenso del Grupo internacional de Hepatitis Autoinmune 1993 – 1999 2. Otras clasificaciones
Población estudiada según grupos etareos	Clasificación de los pacientes incluidos en el estudio según el grupo de edad	Categoría	1. Menor 18 años 2. Mayores de 18 años 3. Mixto
Tipo HAI	Clasificación validada de acuerdo a las manifestaciones clínicas de los pacientes incluidos en el estudio	Categoría	1. Tipo 1 2. Tipo 2 3. Tipo 3 4. Mixta



Variable	Definición Operativa	Tipo de Variable	Escala de Medición
Alelos HLA	Alelos del HLA DRB1 y DQB1 genotipificados y encontrados en los pacientes del estudio (Descripción del alelo específico en todas las resoluciones)	Categoría	Desde el DRB1*0101 hasta el DRB1*1611 y desde el DQB1*0201 hasta el DQB1*0633
Técnica de laboratorio utilizada para la genotipificación	Descripción de la técnica por medio de la cual se definieron los alelos dentro del estudio	Categoría	1. Serológica: Técnica de baja resolución con definición por antígenos celulares 2. Molecular: Técnicas por medio de biología molecular (PCR-SSP, PCR-SSOP and PCR-RFLP)
Grupo serológico	Categorización de los alelos (mediana y alta resolución) encontrados en los controles y casos con HAI, de acuerdo a los grupos serológicos (baja resolución) a los que pertenecen, según el diccionario de HLA más actualizado (2008)	Categoría	Grupos serológicos desde DR1 hasta DR52



Variable	Definición Operativa	Tipo de Variable	Escala de Medición
Número de casos	Descripción del número total de pacientes con HAI incluidos en el estudio	Numérica	Discreta definiendo el número de individuos caso incluidos
Número de controles	Descripción del número total de individuos sanos incluidos en el estudio	Numérica	Discreta definiendo el número de individuos incluidos control
Número total de casos con el alelo	Descripción del número de casos con cada uno de los alelos genotipificados en el estudio	Numérica	Discreta definiendo el número de casos en quienes se genotipificó el alelo específico
Número total de controles con el alelo	Descripción del número de controles con cada uno de los alelos genotipificados en el estudio	Numérica	Discreta definiendo el número de controles en quienes se genotipificó el alelo específico



Variable	Definición Operativa	Escala de Medición
Número total de alelos en los casos	Número de individuos multiplicado por dos correspondientes a un par de alelos por cada individuo	Continua
Número total de alelos en los controles	Número de individuos multiplicado por dos correspondientes a un par de alelos por cada individuo	Continua
Número total del alelo específico en los casos	Número de alelos específicos encontrados en los casos	Continua. Obtenida del dato crudo cuando es informado teniendo en cuenta la homocigocidad y heterocigocidad; u obtenida por medio de multiplicar por dos el número de casos con el alelo específico (asumiendo leyes genéticas de tener un par de alelos, uno en cada cromosoma) como factor de conversión.
Número total del alelo específico en los controles	Número de alelos específicos encontrados en los controles	Continua. Obtenida del dato crudo cuando es informado teniendo en cuenta la homocigocidad y heterocigocidad; u obtenida por medio de multiplicar por dos el número de casos con el alelo específico (asumiendo leyes genéticas de tener un par de alelos, uno en cada cromosoma) como factor de conversión.

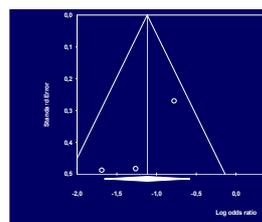
Fuentes de Información y Calidad del Dato

- Comparación de los resultados por parte de los dos evaluadores.
- Lista de búsqueda de los artículos para obtenerlos en formato de texto completo a (bases de datos y bibliotecas)
- Escritura a los autores
- Extracción de datos de manera independiente en una base de datos (Excel)

Calidad del Dato

- La decisión final de los artículos a incluir: comparación de las listas de la revisión sistemática de cada uno de los revisores expertos.
- Unificación de la base teniendo en cuenta los acuerdos y los desacuerdos entre los dos revisores.
- Esta base posteriormente fue cotejada con cada uno de los artículos finalmente seleccionados.
- Si los artículos presentaban datos en portugués se realizó una traducción de las tablas específicas por medio de traductor oficial.

Control de Errores



- Funnel plots (Gráficos en embudo): Resultados agrupados alrededor de una línea vertical tamaño del efecto encontrado (OR global) y distribución simétrica. Se consideró presencia de sesgo de publicación cuando los estudios se agruparon simétricamente en la punta del gráfico

Regresión de Egger

- Modelo de regresión lineal (Intercepto $Y=0$) del efecto estimado normalizado (Estimador dividido por su error estándar) sobre la precisión (el inverso del error estándar del estimador), probando si la ordenada en el origen era estadísticamente significativa con $p < 0,1$

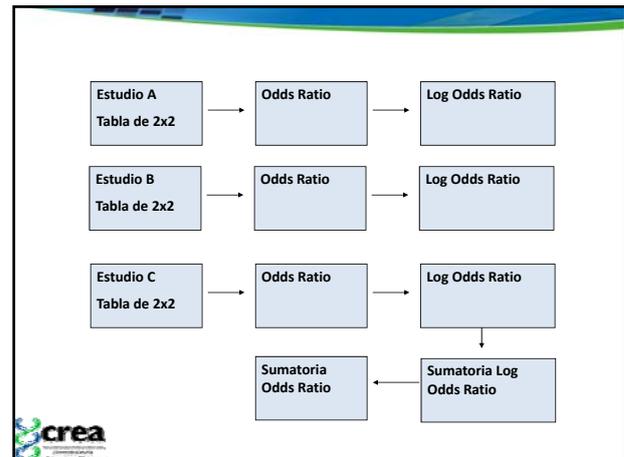
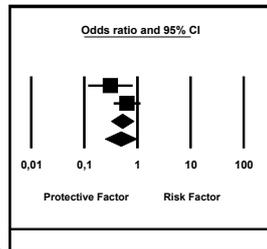
PLAN DE ANALISIS



- Comprehensive Meta Analysis versión 2 (Biostat, Englewood, NJ, 2004).
- El cálculo de los OR:
 - ✓ Número total de alelos en casos
 - ✓ Número total del alelo específico en casos
 - ✓ Número total de alelos en controles
 - ✓ Número total del alelo específico en controles.

Tamaño del Efecto

- Fuerza o magnitud de asociación
OR=1 se interpretó ausencia de diferencia (localización del diamante)
- Precisión (IC, Tamaño muestral)
Ancho del diamante
- Peso de cada estudio (Tamaño caja)
- > precisión (<IC) = > Peso
- Area del cuadrado de cada estudio (Peso) proporcional a la inversa de la varianza



- Fórmula del OR que fue incluido en el meta análisis: AD/BC .
- El logaritmo del OR:
 $\text{Log Odds Ratio} = \ln(\text{Odds Ratio})$
- La varianza $V_{\text{LogOR}} = 1/A + 1/B + 1/C + 1/D$
- El error estándar de la Varianza:
 $EE_{\text{LogOR}} = \sqrt{V_{\text{LogOR}}}$



- Los intervalos de confianza fueron (Teniendo $y =$ tamaño del efecto):
Superior = $\hat{Y} + 1.96 \times EE_y$
Inferior = $\hat{Y} - 1.96 \times EE_y$
- Se realizó análisis de sensibilidad (remoción de un estudio) para verificar cambios significativos frente al resultado final



MODELOS DENTRO DEL ESTUDIO

- Para cada alelo y cada grupo serológico
- Dos estudios o más para meta-analizar
- Modelo de efectos fijos:**
 - ✓ se asumió que todos los estudios en el análisis compartían el verdadero tamaño del efecto.
 - ✓ Efecto sumatorio en este modelo: estimador de los tamaños de efectos comunes
 - ✓ Hipótesis nula: efecto común = 1
 - ✓ Dispersiones observadas: errores de la muestra



Modelo de Efectos Aleatorios

- Verdadero tamaño del efecto: distribución normal, y no exactamente el mismo para todos los estudios.
- Efecto sumatorio: Estimador de todos los efectos relevantes verdaderos
- Hipótesis nula: promedio de estos efectos = 1.
- Dos fuentes de varianza:
 - Error dentro de cada estudio en determinar el estimador
 - Diferencia entre el estimador de todos los estudios observado y aquel que fuera el verdadero.
- Peso de cada estudio: meta de disminuir ambas fuentes de varianza.
- Varianza entre los estudios (denominado **Tau cuadrado T^2**).



Cálculo de la Heterogeneidad

- Varianza entre los efectos verdaderos de cada estudio (verdadera variación y el error aleatorio).

- **Q Cochran**

w= peso de cada estudio ($1/V_i$)

Y_i =tamaño del efecto de cada estudio

M = la sumatoria de los efectos

$$\sum_{i=1}^K W_i (Y_i - M)^2$$

Desviación de cada tamaño del efecto del tamaño del efecto global al cuadrado y "pesado" por el inverso de la varianza de cada estudio

sumatoria general = suma "pesada" de los efectos cuadrados (En inglés WSS) = Q $\alpha=0.10$ (efecto común compartido)



Cálculo de la Heterogeneidad

- **Test de I de Higgins (I²: I Cuadrado)**. proporción de la varianza observada que reflejaba una verdadera varianza en el tamaño del efecto
- Escala relativa (en porcentajes). $\frac{(Q-gI)}{Q} \times 100$
- gl= grados de libertad
- Escala subjetiva para categorizar el valor de I² así:
 - Bajo 25%
 - Intermedia: 50%
 - Elevada: 75%



Análisis Funcional de Aminoácidos

- Proyección de los aminoácidos
- Codificados por parte de cada uno de los alelos encontrados con asociación de riesgo o de protección
- Análisis de las propiedades físico químicas de dichos aminoácidos para encontrar de una manera descriptiva, las similitudes y diferencias entre estas propiedades.



ASPECTOS ETICOS

- El subproyecto de Hepatitis Autoinmune pertenece al proyecto Macro aprobado previamente: Perfil genético Común para Enfermedades Autoinmunes: Comités de Investigación de Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), U. Rosario, Clínica CAYRE Riesgo de Fractura IPS
- Preceptos normatividad Nacional (Resolución 8430) e Internacional



RESULTADOS



Revisión Sistemática

- 137 citaciones de la búsqueda inicial
 - 104 :Medline, PubMed y Cochrane
 - 33 :SciELO, BIREME y LILACS
- 137 citaciones de la búsqueda inicial
- 87 citaciones eliminadas dado su falta de relevancia para los criterios de inclusión y exclusión planteados.
- 12 cumplieron criterios para ser llevadas a revisión metódica.
- 7 estudios fueron seleccionados cumpliendo satisfactoriamente todos los criterios de inclusión así: Tres de Brasil, dos de Argentina, uno de México y uno de Venezuela.



Alelos analizados

- Un estudio: Norte americanos y Brasileños (estos incluidos)
- Un estudio pediátricos y los demás mixtos
- Un estudio solo técnicas serológicas (se incluyó en el análisis por grupos)
- Un estudio criterios anteriores (equiparables)
- Datos para 77 alelos en todos los estudios
- Se realizaron 14 Meta Análisis para los diferentes alelos (al menos dos estudios informaban datos para el alelo)



RESULTADOS ALELOS

- 1769 individuos Latinoamericanos
- 694 fueron pacientes con HAI y 1075 controles sanos (1.5 controles por caso)
- Rango entre 0,9 y 5,8 en los diferentes estudios



Grupos serológicos del HLA en pacientes Latinoamericanos con HAI

Grupo HLA	Modelo	Nombre del estudio	Estadísticos			Odds ratio y 95% IC	
			Odds ratio	Limite Inferior	Limite Superior	Factor Protector	Factor Riesgo
DQ2		Fairbairn, et al.	0,333	0,510	1,706	0,821	
		Vasquez-Garcia, et al.	2,156	1,023	4,546	0,043	
		Bittencourt, et al.	1,345	0,900	2,010	0,148	
		Fortes, et al.	1,667	0,899	3,091	0,105	
		Fijo Alestorio	1,387 1,392	1,055 1,037	1,823 1,870	0,019 0,028	
DQ3		Fairbairn, et al.	0,426	0,244	0,746	0,003	
		Vasquez-Garcia, et al.	0,756	0,435	1,313	0,321	
		Bittencourt, et al.	0,583	0,384	0,884	0,011	
		Fijo	0,578	0,433	0,767	0,000	
		Alestorio	0,576	0,431	0,770	0,000	

Grupos serológicos del HLA en pacientes Latinoamericanos con HAI

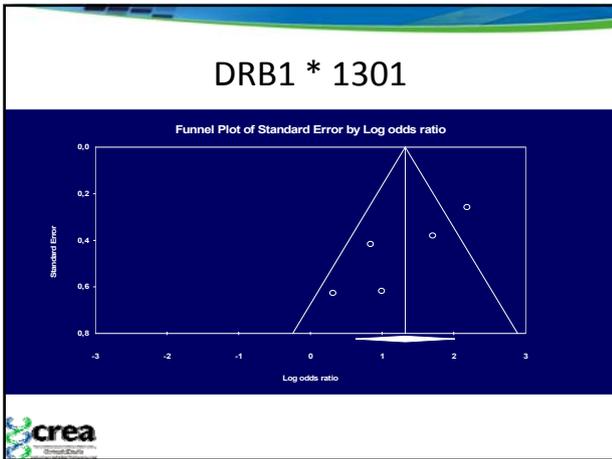
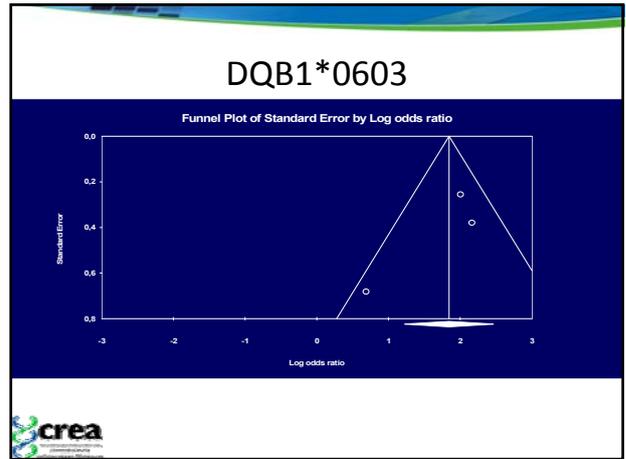
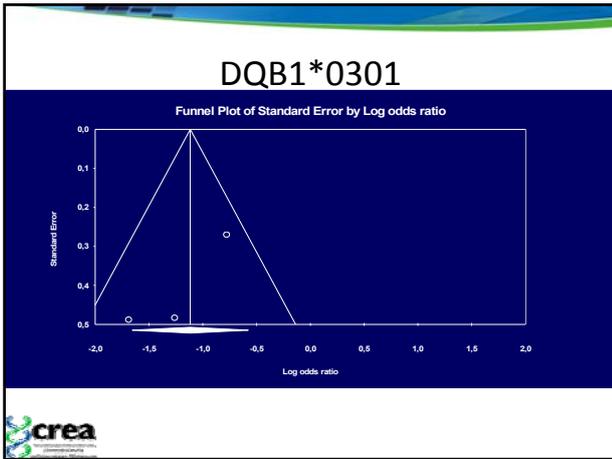
Grupo HLA	Modelo	Nombre del estudio	Estadísticos			Odds ratio y 95% IC	
			Odds ratio	Limite Inferior	Limite Superior	Factor Protector	Factor Riesgo
DR5		Fairbairn, et al.	0,309	0,121	0,794	0,015	
		Bittencourt, et al.	0,637	0,362	1,121	0,118	
		Fijo Alestorio	0,526 0,492	0,324 0,249	0,854 0,970	0,009 0,040	
DR52		Pando, et al.	2,551	1,685	3,862	0,000	
		Bittencourt, et al.	1,507	1,063	2,137	0,021	
		Fijo Alestorio	1,875 1,937	1,435 1,157	2,449 3,243	0,000 0,012	

HLA Alelo	Nombre estudio	Modelo	Estadísticos			Odds ratio and 95% CI	
			Odds ratio	Limite Inf.	Limite Sup.	Factor Protector	Factor Riesgo
DRB1*1301		Fairbairn, et al.	5,513	2,618	11,609	0,000	
		Vasquez-Garcia, et al.	2,705	0,906	8,067	0,107	
		Pando, et al.	8,900	5,369	14,751	0,000	
		Goldberg, et al.	2,315	1,025	5,243	0,043	
		Fortes, et al.	4,507	2,216	13,689	0,000	
	Fijo Alestorio	5,591 4,840	3,997 2,835	7,753 8,264	0,000 0,000		
DRB1*1302		Pando, et al.	0,070	0,009	0,524	0,010	
		Goldberg, et al.	0,210	0,061	0,730	0,014	
		Fijo Alestorio	0,195 0,195	0,054 0,054	0,447 0,447	0,001 0,001	
DRB1*0405		Pando, et al.	11,717	2,5045	48,822	0,002	
		Fortes, et al.	6,641	1,0133	40,6	0,048	
		Fijo Alestorio	6,452 8,452	2,68326 2,68326	6,631 6,631	0,000 0,000	

Alelo	Q	gl	valor-p	P
1301	9.10	4	0.06	56.05
1302	0.83	1	0.36	0
0405	0.39	1	0.53	0

HLA Alelo	Nombre estudio	Modelo	Estadísticos			Odds ratio and 95% CI	
			Odds ratio	Limite Inf.	Limite Sup.	Factor Protector	Factor Riesgo
DOB1*02		Bittencourt, et al.	1,345	0,900	2,010	0,148	
		Fortes, et al.	1,667	0,899	3,091	0,105	
		Fijo Alestorio	1,434 1,434	1,024 1,024	2,008 2,008	0,036 0,036	
DOB1*0301		Fairbairn, et al.	0,185	0,071	0,482	0,001	
		Vasquez-Garcia, et al.	0,283	0,110	0,731	0,009	
		Bittencourt, et al.	0,460	0,271	0,780	0,004	
	Fijo Alestorio	0,352 0,327	0,232 0,191	0,534 0,562	0,000 0,000		
DOB1*0603		Vasquez-Garcia, et al.	1,994	0,524	7,588	0,311	
		Pando, et al.	7,438	4,50512	12,279	0,000	
		Fijo Alestorio	6,323 4,482	3,55410 1,27715	11,0 7,27	0,000 0,019	

Alelo	Q	gl	valor-p	P
02	0.32	1	0.57	0
0301	2.91	2	0.23	31.33
0603	3.27	1	0.07	69.39



ANALISIS FUNCIONAL AMINOACIDOS

Asociación	Alelo	Población estudiada	Bolsillos del HLA y posiciones de los residuos de aminoácidos							
			P6 β13	P4 β69	P4 β70	P4 β71	P4 β72	P4 β73	P4 β74	P1 β86
DRB1										
Riesgo	*0301	Norte América , Norte de Europa	S	E	Q	K	R	G	R	V
	*0401	Norte América, India, Norte de Europa	H	E	Q	K	R	A	A	G
	*0405	Latinoamérica, Japón	H	E	Q	R	R	A	A	G
	*1301	Latinoamérica , India, Norte América	S	E	D	E	R	A	A	V

CONCLUSIONES

- ### Conclusiones
- DQ2 y DR52 Factores de riesgo similar a otras poblaciones, mas no el DR3
 - DRB1*1301, DRB1*0405 y DQB1*0603 asociados a riesgo, similar a otros estudios mundiales
 - Alelos similares a los encontrados en otras enfermedades autoinmunes (epítipo compartido)
-

