

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIDAD I + D ASOCIADA AL CNB-CSIC

**ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN
ENTRE ALELOS HLA CLASE II Y LEUCEMIA
EN POBLACIÓN MESTIZA VENEZOLANA.
POTENCIALES IMPLICACIONES PATOGENICAS.**

TESIS DOCTORAL

Miriam del Carmen Echeverría Velásquez

ALCALÁ DE HENARES, 2012

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIDAD I+D ASOCIADA AL CNB-CSIC



**ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN
ENTRE ALELOS HLA CLASE II Y LEUCEMIA EN
POBLACIÓN MESTIZA VENEZOLANA.
POTENCIALES IMPLICACIONES PATOGENICAS.**

TESIS DOCTORAL

Miriam del Carmen Echeverría Velásquez

DIRECTORES DE TESIS

Melchor Álvarez de Mon Soto,
Catedrático de Medicina,
Universidad de Alcalá.

Sergio Emiro Rivera Pirela
Catedrático de Medicina,
Universidad del Zulia.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A Dios Todopoderoso, por darme vida y salud para alcanzar este sueño hecho hoy una realidad.
- ❖ A la ilustre Universidad del Zulia y a la Universidad Alcalá de Henares, por darme la oportunidad de ascender a otro nivel profesional.
- ❖ Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) por proporcionar el financiamiento para la ejecución de esta investigación.
- ❖ Al Dr. Melchor Álvarez de Mon Soto, por consolidar las bases de los programas de Doctorados en conjunto en nuestra Universidad.
- ❖ Al Dr. Sergio Rivera por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral bajo su dirección, apoyo y confianza.
- ❖ A la Dra. María Giuffrida por ser una gran amiga que me animó y alentó en todo momento, dándome el consejo oportuno y aportando de sus conocimientos, tiempo y dedicación para que yo culminara con éxito esta investigación.
- ❖ A todas las personas que aceptaron participar de manera desinteresada para la realización de este trabajo, así como al personal de la consulta de Hematología y del Banco de Sangre del Hospital Dr. Adolfo Pons de Maracaibo.
- ❖ A los Dres. Atilio Aranguren, Tatiana Pardo, MgSc Ángelo Durán, MgSc. Carmen Cecilia Villalobos, Lic. Georgina Márquez, Lic. Yenni Parra y la Lic. Zuhey Carrillo por su valiosa colaboración para la ejecución de este trabajo.

- ❖ A las Instituciones que con su aporte en equipos y reactivos permitieron culminar este trabajo; en especial a la Universidad Alcalá de Henares, Vicerrectorado Académico de la Universidad del Zulia, Instituto de Investigaciones Clínicas, Laboratorio de Referencias Viroológicas, Laboratorio de Neurociencias de la Facultad de Medicina y al Servicio de Nefrología y Trasplante Renal del Hospital Universitario de Maracaibo, estado Zulia.

- ❖ Mi especial reconocimiento para el Instituto Hematológico de Occidente (Banco de Sangre del estado Zulia), particularmente al Laboratorio de HLA e Inmunología donde se ha forjado el carácter científico de mi vida profesional.

- ❖ A mis compañeros del Laboratorio Clínico del Hospital Nuestra Señora de la Chiquinquirá, en quienes he encontrado siempre el apoyo desinteresado e incondicional para lograr los objetivos que nutren mi carrera profesional. En especial a mi amiga Ilva Villalobos.

- ❖ A mis amigas Nayda y Evelyn juntas pudimos compartir momentos difíciles cuando parecía que no podíamos alcanzar el objetivo preciado; pero que también disfrutamos los gratos momentos llenos de alegría que fueron bálsamo para confortar nuestra alma.

- ❖ A Olida, Raquel y Yinya, por apoyarme, animarme y fortalecerme, sin olvidar al resto de mis amigos, quienes con su amistad motivaron al término de esta tesis.

- ❖ A mi familia por siempre estar a mi lado apoyando cada proyecto que decido emprender, en especial a mi madre baluarte e inspiración para lograr la victoria alcanzada.

- ❖ Aún faltan personas a quienes agradecerles su participación, sin la cual no hubiera podido desarrollar y finalizar este trabajo. A ustedes mi amor, consideración y respeto, están en mi corazón.

A TODOS MUCHAS GRACIAS....

DEDICATORIA

A Dios, mi guía y fortaleza.

A mis padres pilares fundamentales en mi desarrollo profesional, en especial a la memoria de mi padre Nicolás Echeverría.

A mi familia y amigos por ser parte importante en mi vida.

ÍNDICE

CONTENIDO	Página
Abreviaturas.	
Summary.	
I.- Introducción.	
I.1. Enfermedades hemato-oncológicas	1
I.2. Leucemia. Concepto.	1
I.3. Factores de riesgo de las leucemias.	2
I.3.1. Factores ambientales.	2
I.3.2. Factores genéticos.	3
I.3.3. Factores infecciosos.	4
I.4. Clasificación de las leucemias.	5
I.4.1. Leucemias agudas.	6
I.4.1.1. Leucemia linfocítica aguda (LLA)	6
I.4.2. Leucemias crónicas	8
I.4.2.1. Leucemia mieloide crónica (LMC)	9
I.5. Complejo principal de histocompatibilidad (CPH)	14
I.5.1. Generalidades	14
I.5.2. Organización genética	15
I.5.3. Productos de los genes del sistema HLA	16
I.5.4. Características generales del sistema HLA	17
I.5.5. Función de las moléculas HLA clase I y II	20
I.5.6. Estructura de las moléculas del sistema HLA clase I y II	22
I.6. Procesamiento antigénico	25
I.6.1. Vía de presentación antigénica	25
I.7. Tipificación de los antígenos HLA	31
I.8. Aplicaciones al estudio del sistema HLA	33
I.8.1. Asociación HLA y enfermedad	34
I.8.1.1. Asociación HLA con enfermedades diferentes a leucemias	36
I.9. Asociación HLA con leucemias	41
I.10. Epidemiología de la leucemia.	47
II.- Hipótesis y Objetivos.	51

III.- Materiales y Métodos.	
III.1. Diseño de estudio.	54
III.2. Población de estudio y protocolo de seguimiento.	54
III.3. Ámbito de estudio	55
III.4. Criterios de inclusión.	55
III.5. Criterios de exclusión.	56
III.6. Recolección de la muestra.	56
III.7. Ensayos experimentales	57
III.7.1. Estudio molecular HLA clase II.	57
III.7.2. Determinación de los subtipos DRB1*14	60
III.7.3. Evaluación de la respuesta humoral y celular de los pacientes con LMC HLA-DRB1*14	61
III.7.3.1. Respuesta humoral (anticuerpos IgM-IgG frente adenovirus)	62
III.7.3.2. Respuesta celular: Generación de linfocitos TCD8+	62
III.8. Análisis estadístico	64
IV. Resultados.	
IV.1. Valoración de la población mestiza venezolana sana	67
IV.2. Frecuencias alélicas (Fa), cálculo del riesgo relativa (RR), frecuencia etiológica (Fe) y frecuencia preventiva (Fp) para los loci DRB1*, DQB1*, DPA1* y DPB1* en posible asociación con la LLA	69
IV.3. Comparación de haplotipos de pacientes con LLA y controles mestizos venezolanos	73
IV.4. Frecuencias alélicas (Fa), para el loci HLA-DRB1* en asociación con la leucemia mieloide crónica (LMC), cálculo del riesgo relativo (RR), frecuencia etiológica(Fe) y frecuencia preventiva (Fp)	73
IV.5. Subtipos HLA- DRB1*14 asociados a LMC	74
IV.6. Presencia del cromosoma Philadelphia (Ph) en pacientes con LMC HLA-DRB1*14 positivo y negativo.	75
IV.7. Porcentaje de homocigocis HLA-DRB3*/4*/5* en pacientes con	

LLA y LMC	76
IV.8.Frecuencia alélicas para el locus HLA-DQB1* cálculo del riesgo relativo (RR), frecuencia etiológica (Fe) y frecuencia preventiva (Fp).	77
IV.9. Frecuencias alélicas para los loci HLA-DPA1* y HLA-DPB1*, en asociación con la leucemia mieloide crónica (LMC),cálculo del riesgo relativo (RR), frecuencia etiológica (Fe) y frecuencia preventiva (Fp)	78
IV.10.Genotipos HLA-DPA1* en pacientes con LLA y LMC	81
IV.11.Comparación de los haplotipos DRB1*/DPA1*y DPA1*/DPB1* de pacientes con LMC y controles mestizos venezolanos	83
IV.12.Evaluación de la respuesta humoral y celular de los pacientes leucémicos frente a diferentes dianas (adenovirales, celulares o posibles secuencias peptídicas) que pudieran estar relacionadas con la asociaciónHLA-DRB1*14- LMC	84
IV.12.1.Respuesta humoral de los controles y pacientes leucémicos frente al adenovirus	84
IV.12.2.Respuesta celular de los pacientes con LMC en cultivo mixto	85
IV.12.3.Curva dosis respuesta de la estimulación linfocitaria frente al péptido de secuencia LLERRRA del adenovirus.	86
IV.12.4.Citofluometría de flujo de los marcadores linfocitarios CD3, CD4 y CD8 de linfocitos de controles y pacientes LMC, cultivados en presencia del péptido de secuencia LLERRRA de adenovirus	87
V. Discusión	
V.1. Alelos HLA en la población mestiza venezolana	90
V.2. Asociación de los alelos HLA con LLA	93
V.3. Asociación de los alelos HLA con LMC	95
V.4. Respuesta humoral para adenovirus en pacientes con LMC HLA-DRB1*14	99

VI. Conclusiones.	104
VII. Bibliografía.	106
VIII. Anexos.	118
IX. Publicaciones	121

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

HLA: Antígeno leucocitario humano
(*Human Leukocyte Antigen*),

(HTLV)-1: Virus de leucemia de células T humana

PVB 19: Parvovirus B19

ARN: Ácido ribonucleico

Ag T: Antígeno tumoral

LMA: Leucemia mieloide aguda

LMC: Leucemia mieloide crónica

LLA: Leucemia linfóide aguda

LLC: Leucemia linfóide crónica

FAB: Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico

Ph: Cromosoma Filadelfia o
(*Philadelphia*)

FA: Fase acelerada

CB: Crisis blástica

***bcr-c-abl*:** Proteína de fusión anómala

BCR: Gen de fracción de ruptura
(*Breakpoint Cluster Región*)

ABL: Gen ABL del cromosoma 9 virus *Abelson* causante de leucemia

BCR/ABL: Proteína de fusión

(M-BCR): Punto de ruptura mayor

KDa: Kilodalton

(m-BCR): Punto de ruptura menor

CPH: Complejo principal de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*)

Kb: Kilobases

TNF: Factor de necrosis tumoral

TCD8+: Linfocitos T citotóxico CD8+

CPA: Célula presentadora de antígeno

IFN- γ : Interferón gamma

TCD4+: Linfocitos T colaboradores CD4+

Th: Linfocito T colaborador (*T helper cell*)

Tc: Linfocito T citotóxico (*T cytolytic lymphocyte*)

TCR: Receptor antigénico de células T (*T cell receptor*)

RER: Retículo endoplasmático rugoso

ATP: Adenosin-tri-fosfato

TAP: Transportadores asociados a la presentación antigénica

RE: Retículo endoplasmático

Cadena li: Cadena invariante

CLIP: Péptido invariante asociado con clase II

CD: Grupo de diferenciación o (*Cluster of differentiation*)

CD3: Co-receptor de células T

CD4: Co receptor de células T

CD8: Coreceptor de células T

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PCR-SSOP: Sondas oligonucleotídicas secuencia específica

PCR-SSP: iniciadores secuencia específica

RR: Riesgo relativo

EM: Esclerosis Múltiple

LD: Desequilibrio de enlace

DT1: Diabetes Tipo 1

DMID: Diabetes Mellitus insulino dependiente

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

AR: Artritis Reumatoide

IPF: Fibrosis pulmonar idiopática

Ig: Inmunoglobulina

LLA-c: Leucemia linfoblástica aguda común

IVSS: Instituto Venezolano de los Seguros Sociales

FONACIT: Fondo Nacional para la Ciencia y la Tecnología de Venezuela

EDTA: Ácido etilendiamminotetracético

ml: Mililitros

ng: nanogramo

μl: microlitro

RCLB: Buffer lisis de células rojas (*Red Cell Lysse Buffer*)

SSC: Solución salina citrato

NaCl: Cloruro de sodio

M: Molar

v/v: Volumen a volumen

TBE: Solución buffer con tris base bórico-EDTA

pb: Pares de bases

UV: Ultra violeta

Ac: Anticuerpo

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción enzimática

PBS: Buffer fosfato salino

STF: Suero fetal de ternera

PHA: Fitohemaglutinina

T0: Tiempo cero

T48: Tiempo a 48 horas

RPMI 1640: Medio del Instituto Roswell Park Memorial 1640

IL-2: Interleucina 2

BrdU: Bromo-2'-deoxyuridine

AV (DO): Densidad óptica

IP: Índice de proliferación

SAH: Albúmina sérica humana

Fa: Frecuencias alélicas:

Fe: Frecuencia etiológica

Fp: Frecuencia preventiva

RNAm: Ácido ribonucleico mensajero

IL: Interleucina

LLC-B: Leucemia linfática crónica de estirpe B

M: Mitomicina

ND: Valor no determinado

EBV: Virus de Epstein Barr

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

PCP: Clorofiladeperidin

SUMMARY

ANALYSIS OF THE ASSOCIATION BETWEEN HLA CLASS II ALLELES AND LEUKEMIA IN VENEZUELAN MESTIZO POPULATION. POTENTIAL PATHOGENIC IMPLICATIONS

Multiple and varied mechanisms have been proposed by several authors as potential contributors in the pathogenesis of leukemia. The molecules of the MHC (major histocompatibility complex) may be associated with the development of leukemia through molecular mimicry between HLA molecules and infectious agents, modifying the structure of HLA molecules, HLA molecules as receptors, deficiencies in the immune response, deficiencies of HLA class III or failure in the selection of T cells with a receptor (TCR) particularly during the positive or negative selection in the thymus among others. Therefore, the objective of this study was to characterize the HLA class II alleles in patients who developed acute lymphoid leukemia (ALL) and chronic myeloid leukemia (CML) in a mestizo population from Venezuela to determine allelic frequencies in each of these groups, distribution and characteristics, and possible associations positive and/or negative HLA class II alleles with leukemia and their implications for disease pathogenesis. A group of 95 patients, adults and children with symptoms characteristic of leukemia, regardless of sex and aged between 7 months and 78 years, were selected and compared with 48 healthy subjects mestizos, with at least three generations born in Venezuela, without leukemia or other illnesses that could alter the immune response. We used peripheral blood samples with EDTA preserved for DNA extraction and molecular study was performed regions of HLA class II DRB1, DQB1*, DPA1* and DPB1* amplifying the DNA with PCR specific primers. Antigen specific humoral responses were analyzed by indirect ELISA and cellular responses included the mixed lymphocyte culture and "in vitro" lymphocytes proliferation against the purified antigen. The results were analyzed by the Arlequin statistical program and Chi-square test. In this sample, positive associations were observed between DQB1*04, DPA1*01:07, 1:08 and 1:06* with ALL. The DRB1*13 allele, characteristic of the Venezuelan mestizos population, was negatively associated with ALL. DRB1*14 alleles, DPA1*01:03, *2:01 are positively associated with CML in this population. The different patterns of association between ALL and CML with HLA class II, in this population, suggesting*

*differences in the pathogenesis of both diseases. In ALL we would be a failure in the absence of antigen presentation by DRB1*13 allele in these patients, which would act as a protective antigen in the healthy population. In CML, the pathogenesis would be associated, however, with the presence of HLA-DRB1*14, perhaps a peptide sequence mimicking possibly adenovirus, judging from the observed differences in the cellular and serological responses of these patients to adenoviral peptides. CML patients were predominantly serologically negative to Adenovirus and showed a generation of CD8+ T cells both in culture and in mixed lymphocyte proliferation against peptide sequence adenoviral LLERRRA. The presence of the association HLA-DRB1*14 and CML cell behavior and these patients versus adenoviral stimulus may be related to the pathogenesis of the disease.*

Key words: *HLA, MHC, leukemia, acute lymphoid leukemia, chronic myeloid leukemia, allele HLA-DRB1*14*

I. INTRODUCCIÓN

I.1. ENFERMEDADES HEMATO-ONCOLÓGICAS

Las enfermedades hemato-oncológicas designan un grupo de neoplasias generadas por alteraciones en los mecanismos de la vida, del crecimiento, de la diferenciación y de la muerte de las células progenitoras hematopoyéticas. Existen una gran variedad de estas afecciones, entre ellas podemos mencionar el Linfoma de Hodgkin y Linfoma no Hodgkin, Discrasias de células plasmáticas, Macroglobulinemia de Waldenström, Mieloma múltiple y las leucemias (agudas y crónicas). Esta última afección, si bien no es una de las que ocupa el mayor porcentaje de morbi-mortalidad en la población, es de nuestro interés por el gran número de muertes que provoca en la población infantil y joven.

I.2. LEUCEMIA. CONCEPTO

Es una enfermedad neoplásica progresiva del sistema hematopoyético, caracterizada por la proliferación no regulada de las células progenitoras no asignadas o parcialmente diferenciadas. Incluye a un grupo heterogéneo de neoplasias que difieren respecto a su agresividad, célula de origen, características clínicas y respuesta al tratamiento. La figura 1 muestra un hemograma característico de un paciente con leucemia.

Los síntomas de la leucemia se conocen desde tiempos de Hipócrates, fue entre 1839 y 1845 que Virchow reconoció la leucemia como un trastorno clínico distintivo. Llamó a esta enfermedad leucemia por la apariencia blanca de la sangre de pacientes con fiebre, debilidad y linfadenopatía **(Turgeón, 2006)**. Sin tratamiento, la enfermedad varía desde aquellas que evolucionan rápidamente a la muerte hasta aquellas que se mantienen en crecimiento lento por años. Su diagnóstico se realiza mediante el examen de sangre periférica y de médula ósea **(Young et al., 2006)**.

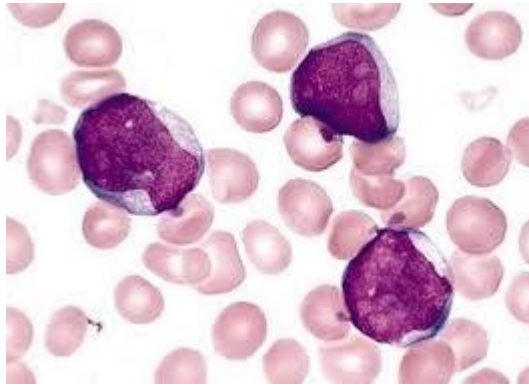


Figura 1. Hemograma de un paciente con leucemia
(Fuente: Mc Donald, 1991)

I.3. FACTORES DE RIESGOS DE LAS LEUCEMIAS

La etiología de las leucemias hasta ahora es desconocida. Existen numerosos estudios que han evidenciado diversos factores de riesgo asociados al desarrollo de estas neoplasias malignas. Dentro de esos factores se han incluido: los ambientales, oncogenes, genéticos e infecciosos.

I.3.1. Factores ambientales:

Exposición a productos químicos: La exposición ocupacional de los padres se ha visto asociada con la presencia de leucemias y linfomas no Hodgkin en sus hijos, destacando las exposiciones de tipo industrial relacionada con el caucho, benceno y otros hidrocarburos policíclicos, pesticidas y sustancias agroquímicas (plaguicidas y fungicidas) (Tirado-Gómez y Mohar, 2007).

El tabaco, el alcohol y el consumo de algunos medicamentos durante el embarazo son otros productos asociados a la presencia de leucemias (Tirado-Gómez y Mohar, 2007). Las quimioterapia en pacientes con cáncer tratados con ciertos tipos de fármacos conocidos como agentes quelantes o inhibidores de la topoisomerasa está asociado a una pequeña posibilidad de padecer Leucemia aguda (Tirado-Gómez y Mohar, 2007).

La radiación ionizante es uno de los factores de riesgo más documentado. En este sentido el estudio más relevante es la cohorte de sobrevivientes a la

bomba atómica de Japón en 1945, el cual ha mostrado un incremento en la frecuencia de ciertos tumores malignos (mama, colon, esófago, pulmón, estómago, tiroides) así como en las leucemias y mieloma múltiple. Las actividades ocupacionales como los mineros expuestos a gas radón radioactivo y los trabajadores en programas de armas nucleares de la antigua Unión Soviética (URSS). Otra situación donde la población estuvo expuesta a radiación ionizante fue el accidente de Chernobyl, a partir del cual se han realizado diversos trabajos que reportan incremento en la incidencia de tumores tiroides y leucemias en niños que habitaban en los países de la ex Unión Soviética **(Tirado-Gómez y Mohar, 2007)**.

Los campos electromagnéticos de baja frecuencia también se han asociado con leucemia aguda infantil **(Wertheimer y Leeper en 1979)**. A partir de éste en las dos últimas décadas se ha publicado un gran número de estudios epidemiológicos que evalúan dicha asociación **(Tirado-Gómez y Mohar, 2007)**.

I.3.2. Factores genéticos

Un solo oncogén producido mediante la mutación de una célula blanco no es suficiente para convertir esta célula en células cancerosas totales. Los genes predisponentes al cáncer pueden actuar de varias maneras: Algunos afectan la velocidad con la que se metabolizan los agentes precancerígenos exógenos para producir formas cancerígenas activas que dañan el genoma celular en forma directa. Otros genes alteran la capacidad del huésped para reparar el daño resultante en el ADN. Existen genes predisponentes que alteran la capacidad del sistema inmunitario para reconocer y eliminar los tumores incipientes, mientras que otros afectan la función del aparato encargado de regular el crecimiento celular normal y la proliferación tisular relacionada **(Turgeón, 2006)**.

Anormalidades genéticas incluyendo translocaciones cromosómicas, deleciones de genes, amplificaciones y mutaciones puntuales. Además de las anomalías genéticas adquiridas, una serie de síndromes genéticos heredados está asociada con la leucemia infantil, los más conocidos son el síndrome de Down, las neurofibromatosis, el síndrome de Shwachman, el síndrome de Bloom

y la ataxia- telaniectasia. Los niños con síndrome de Down se estiman tener un aproximado 10 a 15 veces mayor riesgo para el desarrollo de la leucemia aguda **(Gallo et al., 2011)**.

Es importante resaltar que las células neoplásicas en algunos casos de leucemias de células T en el adulto inducidas por virus pudieran ser derivadas de clones linfocitarios T autorreactivos frente a las moléculas HLA DR/DQ **(Dorak, 1996)**.

I.3.3. Factores infecciosos

Diversos estudios han implicado a los virus como agentes etiológicos de leucemias. El virus de leucemia de células T humana (HTLV) -1 fue el primer retrovirus humano en ser descubierto, se ha reconocido como el agente etiológico de la leucemia de células T **(Gallo et al, 2011)**. De igual manera, investigaciones recientes han asociado a las infecciones por Parvovirus B19 (PVB 19) con leucemia linfoblástica aguda infantil impulsando determinados patrones de metilación de ADN en las células susceptibles de precursor B **(Vasconelos et al., 2011)**.

Entre ciertas formas de leucemia se han identificado dos asociaciones ciertas con virus: la primera, el virus de Epstein-Barr, un virus ADN que se asocia al linfoma de Burkitt y la segunda; el virus linfotrópico de células T humanas tipo I, denominado virus de la leucemia/linfoma de células T humanas, un retrovirus ARN que se ha ligado a ciertas leucemias y linfomas de células T, pero su papel en las leucemias humanas sigue siendo incierto **(Beer et al, 2007; Kasper et al., 2008 ; Smith et al., 2008)**.

Ahora bien, y en base al mimetismo expresado por los adenovirus y el alelo HLA DRB1*14 y dado que ellos son altamente oncogénicos en animales, aunque solo una porción de ellos es integrada en el genoma de la célula huésped, esta porción codifica para proteínas de función temprana, entre ellas, las regiones E1A que contiene los oncogenes que codifican varios antígenos tumorales (Ag T).

Sin embargo es necesario acotar que ninguna neoplasia humana ha sido inequívocamente asociada con los adenovirus, más aún, no se ha probado una asociación de las leucemias con procesos infecciosos causados por estos virus (Essex, 1984; Dorak et al., 2004; Hunt, 2007).

I.4. Clasificación de las leucemias

Al principio Virchow dividió la leucemia en dos clases, con o sin linfadenopatía, desde entonces se han desarrollado muy elaborados sistemas de clasificación de las leucemias (Turgeón et al., 2006).

Los diferentes criterios y los habitualmente empleados en la práctica clínica, son los relacionados con el tipo de células afectadas y el estado de maduración de las células leucémicas; así como, su patocronia. En función de esto se clasifican en leucemias agudas y crónicas; esta clasificación se ha hecho atendiendo también al tipo de células que está afectada en la medula ósea: **leucemia linfoide y leucemia mieloide (Ministerio de Salud, 2007).**

Por otra parte, a las leucemias que se inician en las células mieloides en etapa temprana se les llaman **leucemias mieloides**. Es decir, está referida a las células que se convierten en glóbulos blancos y que no sean linfocitos, glóbulos rojos o células productoras de plaquetas (megacariocitos). A éstas también se les conoce como **leucemia mielocítica, mielógena o no linfocítica**.

Las leucemias que se originan en las células que se convierten en linfocitos se les han denominado **leucemias linfocíticas o leucemias linfoides o linfoblásticas**.

Considerando lo anterior, y siguiendo la clasificación de la FAB, se ha dividido a las leucemias en cuatro tipos principales:

- Leucemia mieloide o mielógena aguda (LMA o *acutemyeloid leukemia*, AML).

- Leucemia mieloide o mielógena crónica (LMC o *chronicmyeloid leukemia*, CML).
- Leucemia linfocítica o linfoblástica aguda (LLA o *acutelymphocytic leukemia*, ALL).
- Leucemia linfocítica crónica (LLC o *chronic lymphocytic leukemia*, CLL). (Harris et al.2000)

I.4.1. Leucemias agudas.

Son de rápida evolución, y desde hace algunas décadas, de curso fulminante. Son expansiones neoplásicas de células inmaduras (blastos) en la médula ósea y en la sangre periférica y aumento en la cuenta total de leucocitos (Turgeon, 2006).

En niños, la gran mayoría de las leucemias son de tipo agudo, mientras que en los adultos las leucemias crónicas son las más comunes. El pronóstico de supervivencia en las formas agudas no tratadas es de varias semanas a varios meses, en comparación con las formas crónicas sin tratar, cuyo pronóstico de supervivencia es prolongado, de meses a muchos años después del diagnóstico (Turgeon, 2006).

I.4.1.1 Leucemia linfoide aguda (LLA)

Existe consenso en que las neoplasias precursoras que se presentan como tumores sólidos y aquellas que involucran componentes medulares o sanguíneos son biológicamente la misma patología, pero con diferente presentación clínica. La participación de componentes medulares o sanguíneos son principalmente factores de pronóstico y presentación no de clasificación. Sin embargo, las bases biológicas de las diferentes presentaciones clínicas no han sido suficientemente esclarecidas. Todas las leucemias neoplásicas de precursores T y B retienen el término de leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Harris et al., 2000).

La LLA se caracteriza por la acumulación de células linfoides malignas en la médula ósea y en muchos casos en la sangre periférica (figura 2). Es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista morfológico, citogenético, de análisis de marcadores de superficie celular, de sondas génicas y en función de su aspecto clínico (Vásquez-Palacio et al., 2002).

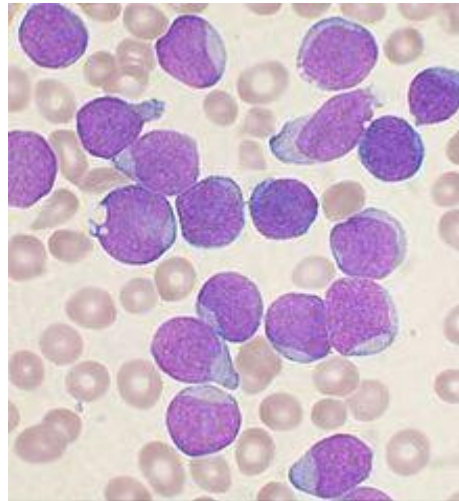


Figura. 2. Hemograma de un paciente con LLA
(Fuente: Mc Donald, 1991)

Existen una serie de factores pronósticos que se han relacionado con un mayor riesgo de recidiva y por consiguiente con una mayor tasa de mortalidad precoz en la LLA de la infancia. Así, los factores pronósticos determinantes son: las anomalías cromosómicas y el fenotipo inmunológico, la infiltración del SNC, el número de leucocitos, la edad al diagnóstico y por último, la presencia de masas tumorales (Pérez González et al., 1999). Se estima que hasta en el 60% de las leucemias agudas hay alguna alteración cromosómica, principalmente translocaciones, inversiones, deleciones, monosomías o trisomías (Trigg et al., 1996).

Las alteraciones cromosómicas que ocurren en las células malignas de la médula ósea en pacientes con LLA tienen relación con la biología de la enfermedad y pueden indicar la ubicación de genes implicados en la leucogénesis. Tales alteraciones definen subgrupos de pacientes, son importantes para el pronóstico y deben tenerse en cuenta en la selección de la

terapia. La identificación exacta de los cambios citogenéticos en las células malignas tiene un papel fundamental en el diagnóstico y tratamiento del paciente (Rodríguez and Cardona, 2007).

Las LLA se han clasificado tomando en cuenta la Asociación Franco-América-Británica (FAB) la cual describe tres subtipos morfológicos: L1, L2 y L3 (Bennett et al., 1976) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de las leucemias linfoides agudas por (FAB)

HALLAZGOS HISTOLÓGICOS	L1	L2	L3
Tamaño celular	Predominio de células pequeñas	Muchas células grandes. heterogéneas.	Muchas células grandes. homogéneas.
Cantidad de citoplasma	Escaso	Variable, con frecuencia más o menos abundante.	Moderadamente abundante
Núcleo	Visibles, o no llamativos	Uno o más, grandes	Uno o más, prominentes
Cromatina nuclear	Homogénea	Variable, heterogénea en cada caso.	Finamente punteada, homogénea.
Forma nuclear	Regular, pueden estar hendidos o indentados.	Irregular, hendidos o indentados.	Regular, ovalados y también redondos
Basofilia citoplasmática	Variable	Variable	Intensa
Vacuolización citoplasmática	Variable	Variable	Prominente

I.4.2. Leucemias crónicas.

Son de evolución prolongada y se asocian a proliferaciones y/o acumulaciones, al menos inicialmente, de leucocitos maduros en la médula ósea y sangre periférica; así como, cuentas leucocitarias totales que van desde muy elevadas a menores de lo normal (Turgeon, 2006).

I.4.2.1. Leucemia mieloide crónica (LMC)

Definición e Historia de la LMC

La leucemia mieloide crónica (LMC) fue descrita por primera vez en 1845 por Hughes Bennet, quien mencionó que se trataba de una enfermedad infecciosa que causaba hipertrofia en hígado y bazo hasta provocar la muerte. En 1870, Neumann reconoció que las células leucémicas descritas se originaban en la médula ósea y casi cien años después, en 1960 Nowel y Hungerford describieron que en este padecimiento existía un cromosoma anormal que se presentaba en todos los casos de esta leucemia. No obstante, fue hasta el año 1973 que Janet Rowley describió que el cromosoma anormal era provocado por una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22, dándosele el nombre de cromosoma Philadelphia (Ph) **(Chávez-González et al., 2010)**.

La Leucemia mieloide crónica (LMC), forma parte de las enfermedades mieloproliferativas, desorden de las células madre pluripotenciales que se caracteriza por un incremento de la hematopoyesis, resultando en un elevado nivel de una o más líneas celulares en sangre periférica y hepatoesplenomegalia. Se observa además hiper celularidad con maduración y sin displasia en la médula. El prototipo de las enfermedades mieloproliferativas es la leucemia mieloide crónica a cromosoma Philadelphia (Ph1)+ [BCR/ABL+]. Las otras entidades aceptadas son la policitemia vera, mielofibrosis idiopática y trombocitemia esencial. Controversialmente, dentro de este grupo se incluye la clasificación y definición de las leucemias mielomonocíticas juveniles también conocidas como leucemia juvenil mieloide crónica y la leucemia juvenil mielomonocítica crónica, leucemia mielomonocítica crónica y leucemia mieloide crónicas atípicas **(Harris et al., 2000)**

Actualmente se sabe que la LMC (figura 3), es un síndrome mieloproliferativo crónico de naturaleza clonal, con origen en una célula madre pluripotencial común a la tres series hematopoyéticas. Fue la primera enfermedad maligna asociada con una lesión genética **(Rodríguez et al., 2007)**.

La figura 3 muestra un hemograma característico de un paciente con leucemia mieloide crónica (LMC).

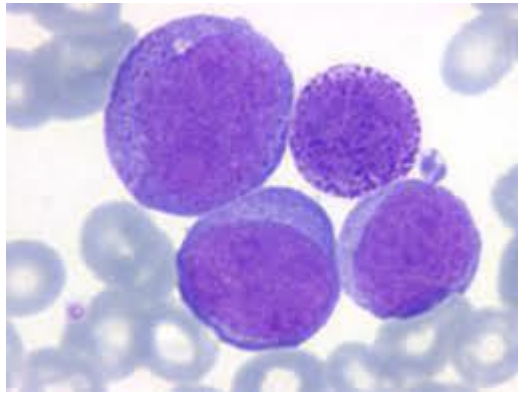


Figura 3. Hemograma de un paciente con LMC
(Fuente: Mc Donald, 1991)

Características de la LMC

La LMC se caracteriza por la presencia del cromosoma Ph y su producto oncogénico BCR-ABL en las tres series hematopoyéticas: granulocítica, eritroide y megacariocítica (Rodríguez et al., 2007, Chávez-González et al., 2009). La enfermedad se presenta con un curso bifásico o trifásico y transita constituida por diferentes etapas. Una crónica, caracterizada por la expansión de células mieloides con una maduración normal; el 90 % de los pacientes se diagnostican en esta etapa y de ellos, el 15 o 20 % son asintomáticos al diagnóstico. De la fase crónica evoluciona a una etapa más agresiva que sigue dos grandes patrones clínico-hematológicos: la fase acelerada (FA) y la crisis blástica (CB). Durante las fases tardías de la enfermedad, las células leucémicas pierden la capacidad de diferenciarse resultando en una leucemia aguda resistente a la quimioterapia (Pavón et al., 2005, Rodríguez et al., 2007)

En ésta, la traslocación c-abl pasa del cromosoma 9 al punto de ruptura bcr en el cromosoma 22 y origina una nueva estructura genética de fusión denominada bcr-abl, que codifica para la producción de una proteína anormal de tirosina quinasa que puede estar relacionada con la mielopoyesis desordenada

que se encuentra en la LMC, ya que esta proteína transforma las células hematopoyéticas progenitoras alterando sus propiedades celulares como la adhesión, proliferación y apoptosis (Smith et al., 2008; Pavón M.V et al., 2005; Clark et al., 2001).

Aunque la causa de la LMC es desconocida, se cree que puede aparecer tras la exposición a radiaciones ionizantes o a ciertos agentes químicos, y la idea de que su origen pueda ser multifactorial, fue planteada hace más de 20 años. Se piensa que alguna anomalía molecular adquirida pueda preceder a la translocación "t" (9,22). También tiene importancia la hipótesis de que la generación del gen de fusión bcr-abl en la célula pluripotencial bajo condiciones de supervivencia inmunológica reducida, es suficiente para iniciar la expansión del clon que modula el comportamiento de la enfermedad (Pavón et al., 2005).

Citogenética de la LMC

El hallazgo diagnóstico es la presencia del cromosoma Ph y de los reordenamientos *bcr-c-abl* e infiltrado hepático perisinusoidal. Las anomalías moleculares relacionadas con el cromosoma Ph han sido asociadas con la fisiopatología y el desarrollo de la enfermedad (Pavón et al., 2005).

Hasta hace poco se consideraba que la adquisición del cromosoma Ph por las células progenitoras hematopoyéticas les confería a estas una ventaja proliferativa del clon leucémico sobre la hematopoyesis residual normal, la cual era suprimida indefinidamente. Recientemente se han publicado evidencias clínicas y de laboratorio que han demostrado la persistencia de la hematopoyesis Ph negativa en numerosos pacientes. Varios marcadores de clonalidad han sido utilizados para mostrar que al menos algunas células no pertenecen al clon leucémico y son aparentemente normales. La LMC de Ph-1 negativo tiene una respuesta más precaria al tratamiento y una supervivencia más corta que los pacientes Ph1 positivos. Sin embargo, los pacientes Ph-1 negativos que tienen el reordenamiento del gen *bcr/abl* detectable por análisis de *Southernblot*, tienen pronósticos equivalentes a los pacientes Ph-1 positivos (Smith et al., 2008).

El cromosoma Ph está presente en el 95 % de los pacientes con LMC y cerca de un tercio de los pacientes que aparentan tener un cariotipo normal, lo tienen citogenéticamente oculto, pues expresan el BCR-ABL que representa la expresión molecular del Ph. La translocación t (9, 22) existe como única anormalidad cromosómica a través de la fase crónica de la enfermedad y se mantiene también durante las fases avanzadas, pero entre el 50 y 80 % de los pacientes que adquieren anormalidades cromosómicas adicionales con el avance de la enfermedad **(Pavón et al., 2005)**.

Mientras la translocación es observada en el 100 % de las metafases al diagnóstico, el porcentaje de las células Ph positivas disminuye con el tratamiento, por lo que la respuesta a un agente terapéutico determinado puede ser evaluada mediante el seguimiento de las metafases Ph positivas. Se ha demostrado una estrecha relación entre la evolución citogenética y la progresión de la enfermedad. Este hecho está dado por la evidencia de que los cambios citogenéticos adicionales al cromosoma Ph, acompañan, y en ocasiones preceden a la transformación aguda **(Pavón et al., 2005)**.

Bases moleculares de la LMC

El desarrollo de las técnicas moleculares ha permitido reconocer que la translocación entre los cromosomas 22 y 9 es recíproca, ya que el cromosoma 9 transfiere a su vez una pequeña porción de sus brazos largos al cromosoma 22. Este material constituye el protooncogen ABL, que al unirse a la región BCR (*break point cluster región*) del cromosoma 22, da origen al oncogén BCR-ABL **(Pavón et al., 2005)**.

Dependiendo del sitio de ruptura en el gen BCR, se pueden formar 3 tipos de BCR-ABL; el gen híbrido predominante en la LMC clásica es derivado de la disrupción en el punto de ruptura mayor (M-BCR). El producto final de este gen es una proteína de fusión citoplasmática de 210 KDa, la cual es responsable de la mayoría de las anormalidades fenotípicas de la fase crónica; puede ser b3a2, en el 55 % de los casos ó b2a2 en el 40 %. Esta proteína es la que se observa en

más del 95 % de los pacientes con LMC y en el 20 % de los pacientes con LLA. Mucho menos frecuente, la LMC puede resultar del gen híbrido derivado del punto de ruptura menor (m BCR) transcripciones (e1a2); el resultado es la proteína de 190KDa que se observa en el 10 % de las LLA del adulto y en el 5 % de las LLA pediátricas. Cuando el punto de ruptura sea en la región mínima (m-BCR) con transcripciones e19a2, en estos casos la enfermedad tiene fallos fenotípicos particulares tales como monocitos, neutrofilia o trombocitopenia. Se corresponde con la proteína de 230 KDa. Este es el punto de ruptura menos frecuente y se ha descrito como forma neutrofilia de la LMC, semejante a la leucemia neutrofílica crónica, pero Ph-positiva y asociada con el transcrito c3a2 del gen BCR-ABL (**Pavón et al., 2005; Chávez-González et al. 2009**).

A diferencia de lo que ocurre en la proteína ABL normal, en la BCR ABL la función se ejerce de una forma constantemente descontrolada. La producción continua de esta enzima induce múltiples interacciones proteicas que intervienen en diferentes vías de transmisión de señales intracelulares, cuyas activaciones conducen a la transformación maligna celular, le confieren a las células de la LMC ventajas de crecimiento e interfieren con los procesos celulares básicos como el control de la proliferación, la adherencia y la apoptosis. La enzima BCR ABL estimula la transmisión de señales mediante la liberación de ATP de un grupo fosfato que se une con las diferentes proteínas que le sirven de sustrato. Debido al proceso de auto fosforilación, existe un gran aumento de fosfotirosina en la proteína BCR ABL, que crea sitios de unión para otras proteínas (**Pavón et al., 2005**).

La llegada de un ligando a la membrana citoplasmática permite, al nivel de esta, la creación de un dímero que a su vez transmite señales hacia el interior del citoplasma, y como consecuencia hay una cascada de señales. La activación de ese sistema de señales permite llevar el mensaje a los factores de transcripción dentro del núcleo, los que a su vez lo llevan a la región promotora del gen y determinan la síntesis del ARN con la información de la proteína a sintetizar, según la señal recibida (**Pavón et al., 2005**).

I.5. COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (CPH)

I.5.1. Generalidades

El complejo principal de histocompatibilidad (CPH o MHC por sus siglas del inglés *major histocompatibility complex*) es un conjunto de genes polimórficos dispuestos dentro de una tira continua larga de ADN que está localizada en humanos en el cromosoma 6 en la banda 6p21.3; se diferencia del complejo H-2 en ratón ubicado en el cromosoma 17. Estos genes codifican la expresión de unas proteínas de superficie celular que reciben el mismo nombre, las cuales tienen como función principal presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T para su reconocimiento y posterior activación (**Abbas et al., 2009**).

Históricamente, el locus CPH murino *H2*, fue identificado y posteriormente nombrado así por su papel en la histocompatibilidad hace casi 60 años por George Snell. Poco después, Jean Dausset reconoció el CPH humano, o la región del Antígeno Leucocitario Humano (o HLA por sus siglas en inglés *Human Leukocyte Antigen*), la cual fue llamada así porque estos antígenos fueron identificados originalmente en la superficie de los leucocitos humanos (**Vandiedonck and Knight, 2009; Fernando et al., 2008**). (Figura 4).

Esta región es una de las mejor estudiadas en el genoma humano debido a la contribución de múltiples variantes de este locus con las enfermedades inflamatorias, infecciosas, autoinmunes y trasplante de órganos.

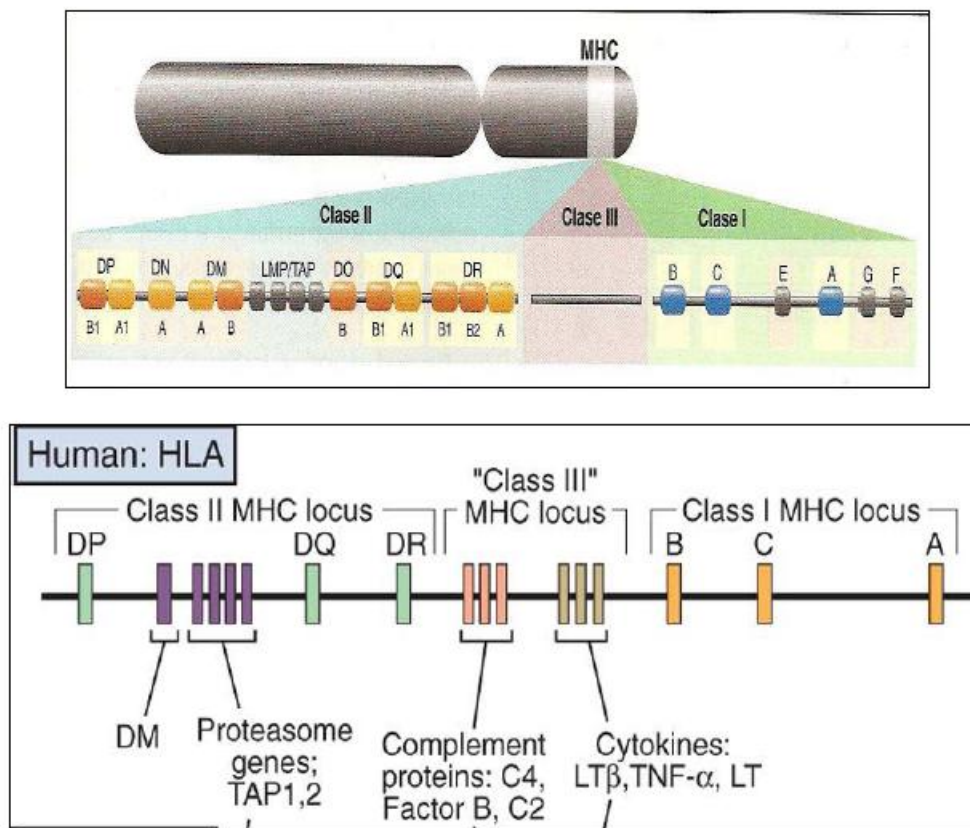


Figura 4. Genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
(Fuente: Solano et al., 2003)

I.5.2. Organización genética

El CPH es una de las regiones de mayor extensión del genoma humano, abarca 3.500 kilobases (kb) de ADN y cuya secuenciación se ha completado ya, obteniéndose un mapa de su organización génica de alta resolución. En términos genéticos clásicos el CPH se extiende unos 4 centimorgans. Los genes de CPH se organizan en regiones que codifican tres clases de moléculas: Una telomérica llamada de clase I, otra centromérica llamada clase II, y una tercera intermedia denominada clase III. Esta última región de clase III contiene genes que codifican proteínas que no tienen la estructura de las moléculas de clase I y II (Abbas et al., 2009) (Figura 5).

I.5.3.Productos de los genes del sistema HLA

I.5.3.1. Los genes HLA de clase I: Codifican glicoproteínas transmembrana denominadas moléculas HLA clase I clásicas:(HLA-A, HLA-B, HLA-C) que se expresan en la superficie de casi todas las células excepto en el trofoblasto, eritrocitos y neuronas. Las moléculas no clásicas: (HLA-E, HLA-F, HLA-G), algunas se expresan en todas las células incluyendo el trofoblasto y otra como la HLA-F no se expresa en la superficie celular (**Vega Robledo, 2009**).

Los genes de HLA clase II: Codifican glicoproteínas transmembrana llamadas moléculas HLA clase II clásicos: (HLA-DR, HLA-DQ y HLA DP) que se expresan en la superficie de células especializadas del sistema inmune. También el locus del CPH de clase II contiene los genes que codifican las moléculas no clásicas: HLA-DM, HLA-DN y HLA-DO se encuentran en vesículas intracelulares. (**Vega Robledo, 2009**). Como cada molécula de clase II es en realidad un heterodímero ($\alpha \beta$), cada grupo de genes contiene al menos un gen que codifica la cadena α (genes DRA, DQA1 y DPA1) y un gen que codifica la cadena β , (genes DRB1, DQB1 y DPB1). Algunos individuos expresan además un cuarto producto denominado DR51, DR52 o DR53, donde la cadena DR es la misma que presenta la molécula HLA-DR, y esta cadena es producto de uno o más genes adicionales que poseen estos individuos en su genoma denominados DRB3, DRB4 o DRB5, respectivamente(**Fernando et al., 2008; López-Martínez et al., 2005; Vega Robledo, 2009**).

Los genes de HLA clase III: Codifican, además de otros productos, varias proteínas secretadas que desempeñan funciones inmunitarias, inclusive componentes del sistema de complemento y moléculas relacionadas con la inflamación, entre ellas vale la pena mencionar: Factor de necrosis tumoral (TNF), linfotoxina α y linfotoxina β , y algunas proteínas del shock térmico, factores del complemento: 2,4 y factor B de la properdina) (Figura 5).

Solo las moléculas de clase I y II están involucradas en los eventos de procesamiento y presentación de los péptidos antigénicos a los linfocitos T para su reconocimiento, activación y proliferación (**Golsby et al., 2004**).

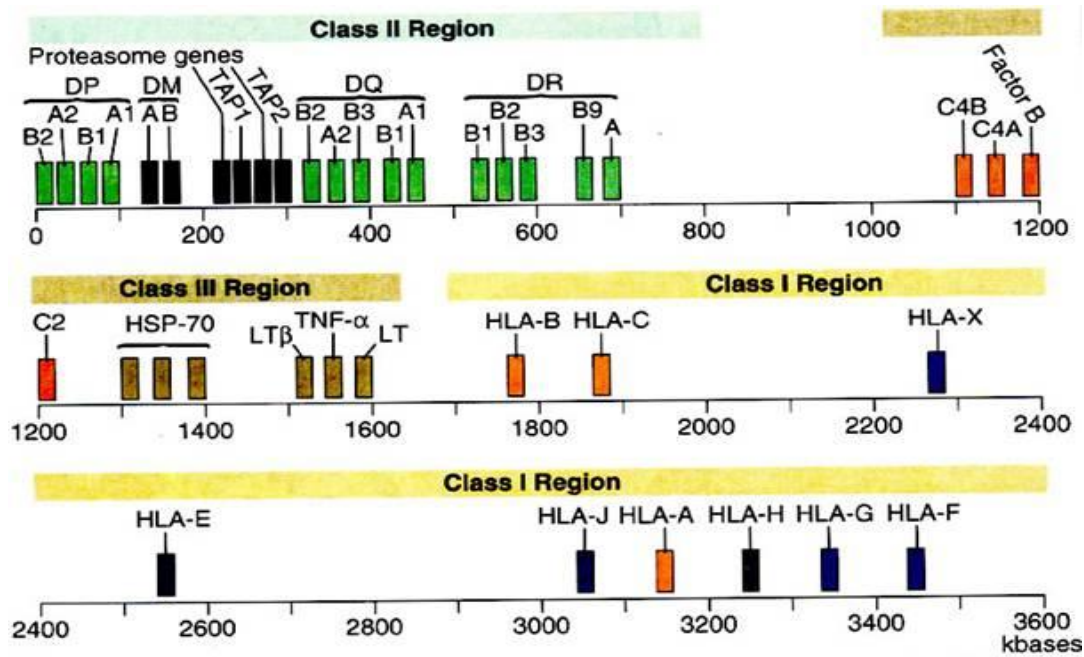


Figura 5. Mapa del CPH
(Fuente: Brandan et al., 2011)

I.5.4. Características generales del sistema HLA.

El sistema HLA se caracteriza por el poligenismo, el polimorfismo (tabla 2) y la codominancia. El poligenismo está referido a que existen varios genes y moléculas de clase I y de clase II dentro del CPH. Cada uno de estos genes a su vez es polimórfico; lo que quiere decir que la secuencia de los genes (y de las proteínas codificadas por ellos) difiere entre los individuos de la población. Existen más de 250 alelos para algunos de estos genes en la población.

Los genes de los locus de CPH se encuentran muy cercanos entre sí, por esta razón, casi todas las personas heredan los alelos unidos en forma estrecha como dos grupos, uno del padre y otro de la madre, llamados haplotipos y esta expresión de ambos progenitores es lo que se conoce como codominancia que se heredan de acuerdo con las leyes de Mendel (López-Martínez et al., 2005).

La posición que ocupa un determinado gen en un cromosoma se le denomina locus y cada una de las formas alternativas de un gen polimorfo se le

conoce con el nombre de alelo, se hereda separadamente de cada padre. Los genes son segmento específico de ADN que controlan las estructuras y funciones celulares, la unidad funcional de la herencia (**Shankarkumar, 2004**). Para los genes polimorfos, un individuo puede tener el mismo alelo en el locus génico de los dos cromosomas del par, y entonces se dice que es homocigoto, o bien tener dos alelos diferentes, uno en cada cromosoma y se denomina heterocigoto (**Abbas et al., 2009**).

Varios cientos de variantes alélicas diferentes de moléculas CPH clase I y clase II se identifican en el hombre (Figura 6). Sin embargo, cualquier persona solo expresa una cifra pequeña de estas moléculas hasta seis diferentes moléculas clase I y hasta 12 moléculas clase II distintas. No obstante, esta cifra limitada de moléculas de CPH debe ser capaz de mostrar una disposición enorme de diferentes péptidos antigénicos a células T y permitir que el sistema inmunitario responda de manera específica a una variedad amplia de retos antigénicos (**Fernando et al., 2008; López-Martínez et al., 2005; Vega Robledo, 2009**).

El polimorfismo no se explica solo como resultado de una combinación al azar, sino que algunos haplotipos se encuentran en mayor frecuencia a la esperada. Este fenómeno se conoce como desequilibrio de ligamento y se corresponde, pues, a la mayor frecuencia observada para una combinación particular de alelos en un haplotipo que la esperada con base a las frecuencias de los mismos considerado individualmente.

Tabla 2. Polimorfismo HLA

Polimorfismo HLA		
	Tipo	Número Alotipos
CLASE I	A	218
	B	439
	C	96
	E	4
	F	1
	G	6
	CLASE II	DM
DO		3
DP		100
DQ		59
DR		319

(Fuente: <http://inmunologiaenlinea.es/index>)

Para explicar este fenómeno, se ha propuesto la intervención de varios procesos que no son excluyentes entre sí:

- a) Que los haplotipos con representación mayor en la población actual reflejarían las combinaciones de alelos presentes en los fundadores (esto es por ejemplo lo que ocurriría en la población india de América).

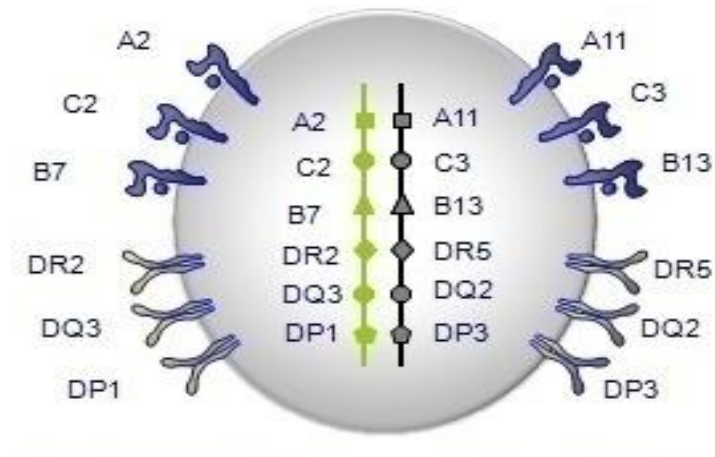


Figura 6. Inmunología en línea.
(Fuente: <http://inmunologiaenlinea.es/index>)

b) Que se presente como consecuencia de los efectos del proceso evolutivo; por ejemplo, algunas combinaciones de alelos proporcionarían resistencia a ciertas enfermedades y harían que se seleccionaran y estuvieran representadas en mayor frecuencia mientras que otros que podrían generar efectos perjudiciales, como mayor susceptibilidad enfermedades, y se expresasen con menor frecuencia debido a un proceso de selección negativo.

I.5.5.Función de las moléculas HLA clase I y clase II

Las moléculas de clase I actúan como receptores de péptidos endógenos o citoplasmáticos propios o no propios provenientes de antígenos tumorales o virales, para facilitar su reconocimiento por células TCD8+ (o linfocitos citotóxicos); las células presentadoras de antígeno que expresan tanto HLA I y II en su membrana, también pueden presentar péptidos procedentes de proteínas exógenas que van a ser reconocidas también por linfocitos TDC8+, para su reconocimiento, activación y proliferación, en un mecanismos de presentación cruzada (Kovacsovics-Bankowski et al.1995;Norbury at el 1995).

Las moléculas clase II tienen como función ligar péptidos antigénicos derivados de proteínas exógenas endocitadas por la célula presentadora de antígenos profesionales (ya sean proteínas propias de la célula, patógenos extracelulares o de antígenos intravesiculares), y presentarlo a linfocitos TCD4+ para su reconocimiento, activación y proliferación (**Fernando et al., 2008; López-Martínez et al., 2005; Vega Robledo, 2009**).

Las moléculas de clase II poseen una distribución tisular muy restringida y se expresa constitutivamente en la superficie de las células presentadoras de antígenos profesionales (CPA). Células dendríticas, células de Langerhans, linfocitos B, macrófago/monocitos, y en otras células como: epitelio tímico, células de Kupffer, y linfocitos T activadas (**Fernando et al., 2008; López-Martínez et al., 2005; Vega Robledo, 2009, Vyas et al., 2008**). El interferón gamma (IFN- γ) estimula la expresión de las moléculas de HLA clase II en aquellas células donde normalmente no se expresan (**Shankarkumar 2004; Martí y Jaraquemada, 2006**).

Las moléculas de clase II, a diferencia que las de clase I, unen péptidos de mayor tamaño que oscilan entre 12 y 34 aa. La forma de unión del péptido a la cavidad de unión es también distinta a la de clase I. En la hendidura de CPH-II el péptido queda unido por su secuencia central (*core*), quedando libres los extremos del péptido a cada lado de la hendidura (figura 7).

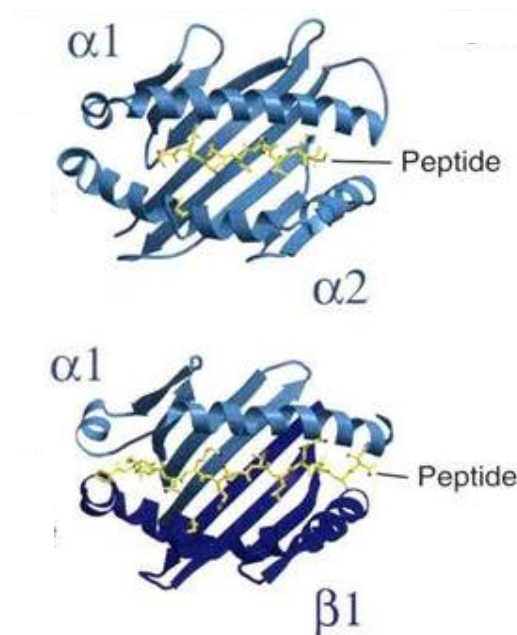


Figura 7. Moléculas de la clase I y II
(Fuente: Solana et al., 2003)

La variabilidad observada en la secuencia de dichos péptidos también se halla sujeta a una cierta restricción que depende de la molécula de clase II. Aunque las posiciones de anclaje del péptido a la hendidura no son tan constantes como para la clase I, los aminoácidos en dos o tres posiciones extremas (generalmente, 2 o 4 y 9) de la secuencia central del péptido son las posiciones principales de anclaje al CPH y por lo tanto las que definen el motivo estructural específico de alelo.

I.5.6. Estructura de las moléculas del sistema HLA clase I y clase II

Las moléculas de clase I: constan de dos cadenas polipeptídicas unidas de forma no covalente: una cadena alfa codificada por el sistema HLA (o cadena pesada) de 44 a 47 KDa y una subunidad de 12 KDa no codificada por el CPH denominada β 2- microglobulina (figura 8). La cadena α está orientada de manera que aproximadamente tres cuartas partes del polipéptido completo se extienden

dentro del medio extracelular, un breve segmento hidrófobo cruza la membrana celular y los aminoácidos carboxílicos terminales se localizan en el citoplasma. Los segmentos amino terminal (N-terminal) $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la cadena alfa, cada uno con una longitud aproximada de 90 aminoácidos, interactúan para formar una plataforma de una lámina de ocho hebras antiparalelas con plegamiento β que soportan dos hebras paralelas de hélice α . Esta forma la hendidura de unión a los péptidos de las moléculas de la clase I. El tamaño es suficientemente grande para fijarse a péptidos de 8 a 11 aminoácidos con una conformación extendida y flexible. Los extremos de las hendiduras de unión a los péptidos de la clase I están cerrados, de forma que los péptidos grandes no pueden unirse. El mayor polimorfismo de estas moléculas están limitados a los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ donde contribuyen a producir variaciones ente diferentes alelos de la clase I en la unión a los péptidos y en el reconocimientos por los linfocitos T (Abbas et al., 2009).

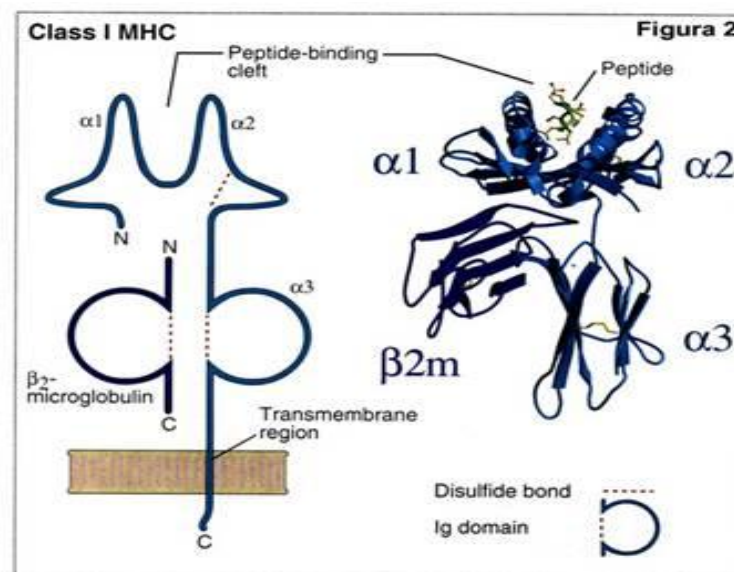


Figura 8. Estructura de una molécula del CPH de la clase II. (Fuente: Abbas et al., 2009).

La molécula de clase II es un heterodímero compuesto por dos cadenas polipeptídicas asociadas de forma no covalente, una α de 32 a 34 kDa y una β de 29 a 39 kDa. Ambas cadenas están codificadas por genes polimorfos del CPH (Abbas et al., 2009). La molécula de clase II se divide estructuralmente en una región

extracelular y otra intracelular. La región extracelular se divide en segmentos de 90 aminoácidos, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 . A diferencia de la clase I, la zona de unión al péptido está formada por ambas cadenas, segmentos α_1 y β_1 , respectivamente (figura 9). Estas cadenas forman la hendidura, al igual que en la molécula clase I, los residuos más polimórficos se concentran en esta área. La región similar a inmunoglobulinas está formada por los segmentos α_2 y β_2 . Se cree que la relación entre células CD4+ y moléculas de clase II se debe a la unión entre la molécula CD4 y los residuos no polimórficos del segmento β_2 . La región intracelular también comprende una zona intramembrana-celular y otra intracitoplasmática. Aunque se conoce menos acerca de estas regiones, se cree que son similares a las descritas en clase I (**López-Martínez 2005**). Los segmentos amino terminales α_1 y β_1 interactúan para formar la hendidura que se unen a los péptidos. Cuatro hebras del suelo de la hendidura y una de las hélices están formadas por α_1 , mientras que las otras cuatro hebras del suelo y la segunda hélice están formadas por β_1 , en el interior y alrededor de la hendidura que se une a los péptidos.

El mayor polimorfismo en estas moléculas clase II se encuentran en la cadena β . Los extremos de la hendidura que se une a los péptidos están abiertos, de manera que pueden entrar péptidos de 30 aminoácidos o más. Los segmentos α_2 y β_2 de las moléculas de la clase II, están plegados en dominio de Ig y no son polimorfos entre varios alelos de un gen particular de la clase II. El punto de unión para CD4 es un bucle presente en el segmento β_2 de las moléculas de la clase II. En general, las cadenas α de un locus del CPH de la clase II (p.ej., DR) se emparejan más a menudo con cadenas β del mismo locus y con menos frecuencia con cadenas β de otros locus (ej. DQ, DP) (**Murphy, 2009**).

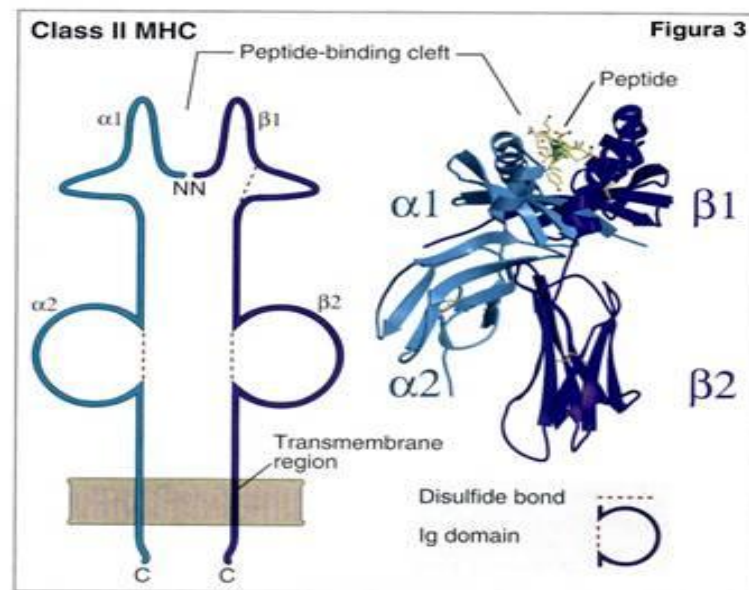


Figura 9. Estructura de una molécula del CPH de la clase II.
(Fuente: Abbas et al., 2009).

I.6. Procesamiento antigénico

Es el conjunto de mecanismos de degradación del antígeno tanto endógeno como exógeno para su presentación a células T una vez unida a moléculas de HLA I o II, respectivamente.

I.6.1.Vía de presentación antigénica.

La especificidad de las respuestas de las células T la determina el reconocimiento por el receptor de antígeno, el complejo TCR/CD3. El ligando de este receptor son fragmentos de antígenos presentados por moléculas del complejo principal histocompatibilidad (CPH). Es decir, a diferencia del complejo receptor de inmunoglobulinas en la célula B, que reconoce antígenos libres en el espacio extracelular, las células T reconocen los antígenos de una forma “restringida” por el CPH; y el complejo TCR/CD3 reconoce no solo el “antígeno” sino también a la molécula de histocompatibilidad (figura 10). Generalmente, existen dos rutas independientes de procesamiento de antígenos; extracelulares e

intracelulares que tienen un profundo impacto en la regulación del sistema inmune al afectar a la actividad de dos subpoblaciones de linfocitos funcionalmente distintas, las células TCD4+ cooperadoras (Th) y las TCD8+ citotóxicas/supresoras (Tc) (Pérez-Rodríguez, 2005). Así que los linfocitos T citotóxicos solo reconocen fragmentos peptídicos unidos a las moléculas CPH de clase I y los linfocitos T colaboradores los péptidos asociados a las moléculas de clase II.

El procesamiento y la presentación del antígeno son procesos que ocurren dentro de una célula presentadora de antígeno (CPA), y resulta en la fragmentación de proteínas antigénicas (proteólisis) y la asociación de esos fragmentos (péptidos antigénicos) con moléculas del CPH; ya sea de clase I o clase II, finalmente la expresión de ese complejo péptidos- moléculas CPH sobre la superficie celular, donde ellos pueden ser reconocidos por el receptor de la célula T (TCR). Sin embargo, la vía que conduce a la unión de fragmentos de proteínas con moléculas CPH es diferente para clase I y para clase II. Las moléculas de clase I presentan productos degradados derivados de proteínas (endógenas) intracelulares del citosol, (tales como virus, bacterias intracelulares o transformaciones celulares). Las moléculas de clase II del CPH presentan fragmentos derivados de proteínas (exógenas), extracelular localizadas en el citosol (Vyas, 2009).

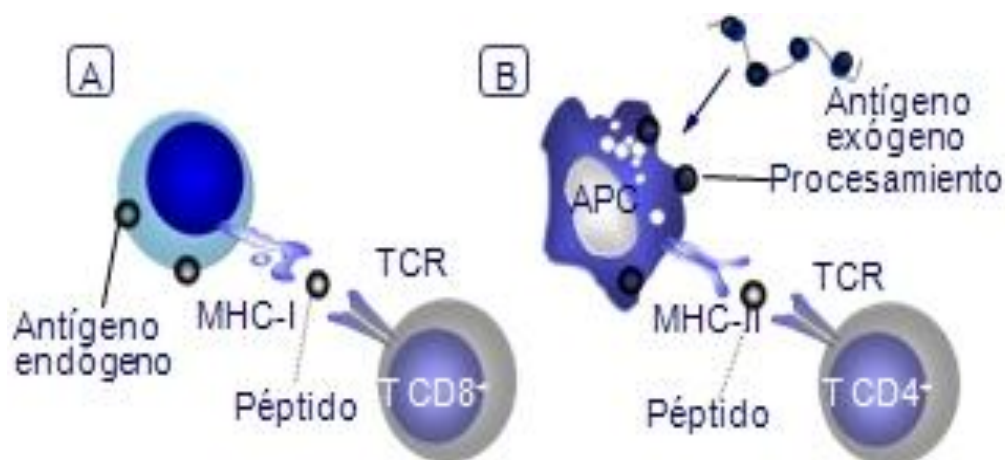


Figura 10. Presentación de péptidos antigénicos a los linfocitos T
(Fuente: Martí y Jaraquemada, 2003)

Procesamiento y presentación del antígeno en las células que expresan moléculas de clase I y II

Presentación antigénica de las moléculas HLA clase I

Los péptidos que se presentan unidos a las moléculas del CPH derivan de proteínas citosólicas, la mayoría de las cuales se sintetizan en las células nucleadas.

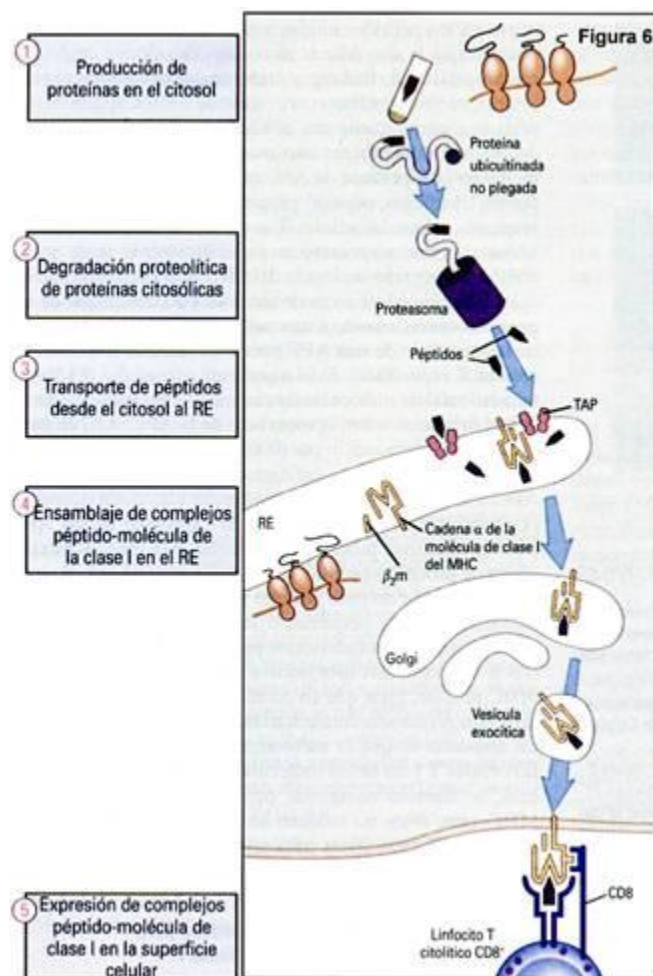


Figura 11. Procesamiento antigénico vía endógena
(Fuente: Abbas et al., 2009)

Degradación proteolítica de las proteínas citosólicas

Esta vía de procesamiento es mediada por una enzima multicatalítica, el proteosoma responsable de la degradación de proteínas en el citosol es un complejo enzimático multiproteínico cuyo peso es aproximadamente 700 KDa,

aparece como un cilindro compuesto de un conjunto de anillos cada uno compuesto por siete subunidades, se encuentra en el citoplasma de la mayoría de las células. Antes de su catabolismo las proteínas citosólicas son modificadas mediante la unión covalente de varias copias del polipéptido ubiquitina. De esta manera las proteínas modificadas son reconocidas por el proteosoma que facilita su degradación.

Transporte de los péptidos desde el citosol

Los péptidos generados en el citosol deben ser traslocados al interior del retículo endoplasmático rugoso (RER) donde están las moléculas de clase I recién sintetizadas para unirse a ellas. En este proceso participan los transportadores dependientes de ATP denominados TAP (transportadores asociados con la presentación antigénica) TAP1/TAP2 presentes en la membrana del RER. Los péptidos traslocados dentro del RER se unirán a las moléculas de clase I adheridas al dímero TAP en la cara luminal de la membrana del RER. La síntesis y el ensamblaje de las moléculas de clase I necesitan la presencia de chaperonas presentes en el RER.

Ensamblaje de los complejos péptido –molécula de clase I en el RER

Cuando la cadena α de la molécula de clase I se sintetiza se une temporalmente a una proteína chaperona denominada calnexina que la mantiene parcialmente plegada.

Al unirse la cadena α de la molécula de clase I con la β 2-m se forma el heterodímero α - β 2-m. En este momento el heterodímero se disocia de la calnexina y se asocia con un complejo de proteínas. Una de ellas la calreticulina, cumplirá funciones de chaperona similares a la calnexina. Otra proteína de este complejo es la tapasina que se une a la TAP-1 del heterodímero TAP1/TAP2. De esta manera la molécula de clase I unida a TAP-1 espera la llegada del péptido. La

unión del péptido estabiliza a la molécula de clase I. Se libera luego de TAP y deja el RER para ser transportada hacia la membrana celular.

Expresión en superficie de los complejos péptido-clase I

Los complejos péptido molécula clase I estables se mueven del interior del RER a través del complejo de Golgi se transporta hacia la superficie celular mediante vesículas exocíticas (Abbas et al., 2009, Vyas, 2009).

Presentación antigénica de las moléculas HLA clase II

La secuencias de acontecimientos en el procesamiento y presentación antigénica de las moléculas de clase II se da en varias etapas (figura 11):

Captación de las proteínas exógenas en los compartimientos vesiculares de las CPA: La mayoría de los péptidos asociados a la clase II derivan de antígenos proteínicos que son captados e interiorizados en los endosomas por CPA. Después de su interiorización, los antígenos proteínicos se localizan en vesículas intracelulares unidas a la membrana que se denominan endosomas que contienen enzimas proteolíticas y un pH ácido. La vía endosomas del tráfico proteínico intracelular se comunica con los lisosomas, que son vesículas más densas rodeadas de membrana que contienen enzimas. Los microbios particulados se interiorizan en vesículas denominadas fagosomas, que se pueden fusionar con los lisosomas, lo que dan lugar a los fagolisosomas.

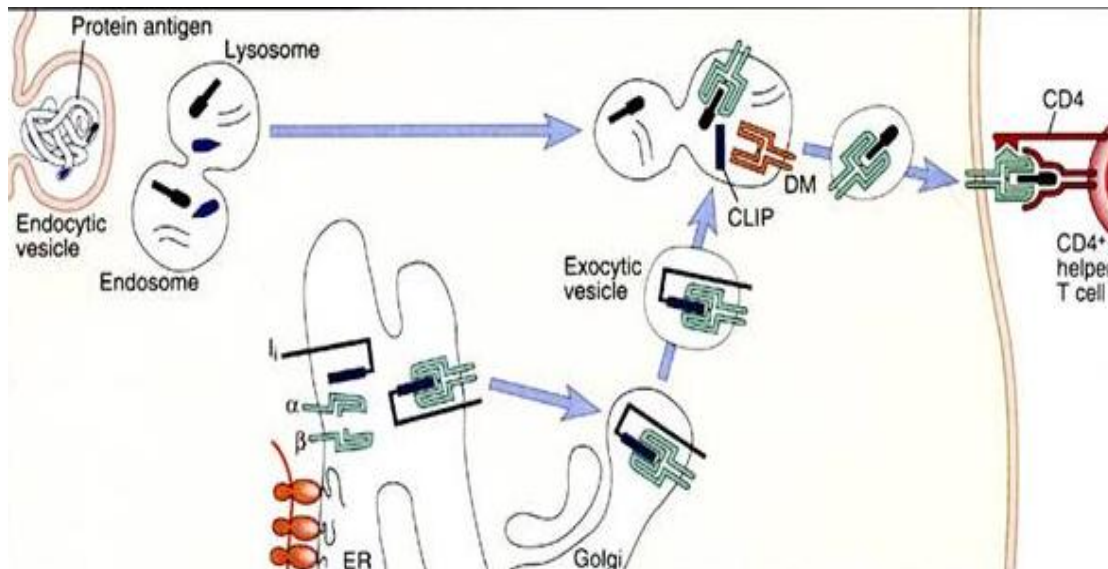


Figura 12. Procesamiento antigénico vía exógena
(Fuente: Abbas et al., 2009)

Procesamiento de las proteínas interiorizadas en las vesículas endosómicas y lisosómicas: Las proteínas interiorizadas se degradan por acción enzimática que tienen un pH óptimo en los endosomas y lisosomas, para dar lugar a los péptidos, muchos de los cuales tienen propiedades estructurales que les permiten unirse a los lugares de fijación a péptidos de las moléculas del CPH de la clase II. Las proteínas degradadas o escindidas parcialmente se unen a las hendiduras con extremos abiertos de las moléculas del CPH de la clase II y después son recortadas por enzimas hasta su tamaño final. Aunque la mayoría de los péptidos que se unen al CPH de clase II deriva de proteínas interiorizadas desde el medio extracelular, de manera ocasional también entran en la vía de la clase II proteínas citoplasmáticas y de membrana. En algunos casos esto se puede deber a la vía celular normal de recambio del contenido citoplasmático, lo que se denomina autofagia.

Biosíntesis y transporte de las moléculas del CPH clase II: Las cadenas alfa y beta de las moléculas de clase II se sintetizan y ensamblan en el retículo endoplasmático (RE), junto con proteína llamada una cadena invariante (Ii; o CD74), este complejo es transportado a través del aparato de Golgi por unas vesículas hasta llegar a los endosomas donde se encuentran los péptidos antigénicos.

Asociación de los péptidos procesados a las moléculas del CPH de la clase II en las vesículas: En este compartimiento ácido, la cadena invariante es degradada por acción del pH ácido y de las proteasas endosomales, quedando una porción de la cadena li de 24 aminoácidos ocupando el sitio de unión del péptido, denominado CLIP (péptido invariante asociado con clase II). El péptido CLIP permanece unido a las moléculas de clase II hasta que interacciona con una molécula de clase II llamadas HLA-DM, está disociará el CLIP permitiendo la unión del péptido a la molécula de CPH clase II

Expresión de los complejos péptido-clase II en la superficie de las CPA: Las moléculas del CPH clase II se estabilizan por los péptidos unidos .Finalmente, los complejos estables péptido- molécula clase II se expresan sobre la superficie de las CPA donde se presentan para su reconocimiento por los linfocitos TCD4+ específicos cuyo coreceptor CD4 (del inglés *cluster of differentiation*) cumple la función esencial de unirse a las regiones polimorfos de las moléculas de clase II(**Abbas et al., 2009, Vyas, 2009**).

Si la molécula presentada resulta extraña, la célula T cooperadora se activa y secreta citocinas. Estas citocinas pueden activar a la célula presentadora de antígeno y a linfocitos y células circundantes (respuesta predominante Th1), así como estimular la producción de anticuerpos (respuesta de predominio Th2). La clase de citocinas secretadas y por ende, la función que realicen, depende del tipo de célula Th que responda. En todo caso existe una regulación que al término del estímulo antigénico; frena la respuesta, induce apoptosis de células activadas, inhibe la inflamación e inicia la reparación (**Vega Robledo, 2009**).

I.7. Tipificación de los antígenos HLA

Se entiende que la mayoría de alelos HLA son altamente polimórficos, como ya se explicó anteriormente, y cada especificidad definida en la superficie celular representaría un alelo diferente a nivel genómico. Se han descrito numerosos alelos para los diferentes *loci* HLA. Por lo tanto, se denomina tipaje HLA al análisis llevado a cabo en el laboratorio para conocer los alelos HLA de un

determinado individuo mediante métodos serológicos, análisis de genes por biología molecular y métodos celulares. Este análisis de los antígenos de histocompatibilidad tradicionalmente se ha realizado con un sistema de tipificación serológica basados en la citotoxicidad mediada por anticuerpos y complemento, prueba denominada “Microlinfocitotoxicidad” donde se utilizan sueros que contienen anticuerpos específicos contra antígenos HLA. Estos aloantisueros se obtienen de mujeres multíparas o individuos politransfundidos previamente caracterizados en lo referente a la especificidad que ellos reconocen. Se han obtenido también numerosos anticuerpos monoclonales, a partir de hibridomas murinos o humanos. Los anticuerpos anti-HLA son muy específicos para los determinantes estructurales individuales que caracterizan a los diferentes antígenos del sistema HLA. Así, si los sueros que contienen anticuerpos anti-HLA se mezclan con linfocitos, los anticuerpos se unirán únicamente a sus antígenos blancos específicos (Tristam et al., 1998).

El advenimiento de las técnicas de biología molecular proporciona hoy en día una gran ventaja en la tipificación de los antígenos HLA, ya que permiten determinar la presencia de alelos que con los métodos de serología eran imposibles distinguir. Los niveles de resolución de los antígenos que permiten alcanzar los métodos moleculares son muy superiores a los serológicos, por lo que ahora los alelos HLA de clase II pueden ser determinados con gran precisión por el uso de amplificaciones de ADN e hibridación con oligonucleótidos. El método define alelos sobre las bases de sus secuencias variables, proporcionando una información más amplia que no podría obtenerse por las antiguas técnicas. Es así que desde que se descubrió la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (del Inglés *polymerase chain reaction*) se han diseñado diferentes tipos de reacciones para amplificar el ADN genómico y facilitar su posterior análisis. Existen procedimientos que permiten realizar una tipificación molecular de “baja resolución” que brinda información equivalente a las especificidades serológicas y que para muchas aplicaciones de rutina son muy adecuadas. Actualmente, se cuenta con técnicas de tipificación molecular de “alta resolución” que permiten definir con precisión alelos DRB que posee un individuo

(Fernández et al., 1990; Gao et al., 1990; Gao et al., 1991; Bodmer et al., 1990; Lindel et al., 1997).

Aunque todos los protocolos comienzan con una amplificación genómica, los mismos difieren en la estrategia de análisis del ADN amplificado. El producto de la PCR puede ser hibridado a una colección de sondas oligonucleotídicas secuencias específicas y esta metodología recibe el nombre de PCR-SSOP (del inglés *polymerase chain reaction sequence specific oligonucleotide-probe*). Alternativamente, los iniciadores (*primers*) pueden ser diseñados para amplificar exclusivamente un alelo o un grupo de alelo en cuyo caso si se obtienen producto de amplificación, la muestra es positiva para ese alelo. Esta metodología recibe el nombre de PCR-SSP (*polymerase chain reaction sequence-specific-primers*) (Arrazola-García, 2005).

I.8. Aplicaciones al estudio del sistema HLA

El conocimiento cada vez más preciso adquirido en los últimos años respecto a la evolución y función de genes y moléculas HLA ha permitido su estudio aplicado a múltiples disciplinas (Gómez-Casado, 2002):

- **Legales:** el polimorfismo del sistema HLA permite realizar estudios de paternidad, ya que es muy improbable que dos personas no relacionadas genéticamente posean los mismos antígenos HLA. Su poder de discriminación supera el de otros sistemas de proteínas.
- **Evolutivas:** el polimorfismo y el desequilibrio de ligamiento del sistema HLA sirven como herramienta para relacionar filogenéticamente grupos poblacionales humanos, alelos y loci genéticos entre intra e inter especies.
- **Clínicas:** Una de las aplicaciones clínicas del HLA es intentar establecer la relación entre la compatibilidad HLA y la supervivencia de los trasplantes de órganos. Por otra parte, existen estudios que relacionan ciertas moléculas HLA, e

incluso determinadas secuencias de ADN, como factores de protección y susceptibilidad a padecer enfermedades. Se ha postulado que el mimetismo molecular entre ciertos patógenos y péptidos autólogos podría desencadenar una respuesta específica autoinmune. De allí la importancia de la tipificación de los antígenos HLA empleando diferentes métodos para la identificación de los mismos.

I.8.1. Asociación HLA y enfermedad

Durante los estudios de asociación se investiga la contribución de los genes de susceptibilidad a una enfermedad (o cualquier otro fenotipo). Desde hace varias décadas se sabe que el padecimiento de ciertas enfermedades se asocia con el incremento en la frecuencia de un determinado alelo HLA (tabla 3). Esta asociación cuando tiene un valor estadísticamente significativo, se viene considerando como un factor de susceptibilidad o un marcador de riesgo a padecer una determinada enfermedad. Esto puede cifrarse estadísticamente como “riesgo relativo” (RR) y da una idea de la mayor o menor probabilidad que tiene un sujeto a padecer una determinada enfermedad si presenta dicho marcador o alelo HLA con respecto a aquellos individuos que no lo tienen (Murphy et al., 2010). Así que el primer intento por correlacionar un sistema polimórfico con susceptibilidad a enfermedades se realizó después del descubrimiento de los grupos sanguíneos, cuando se encontró en 1953 la primera asociación entre grupo sanguíneo A y cáncer en el estómago. Pero es a partir del descubrimiento de los sistemas H-2 en el ratón y HLA en humano, cuando el CPH se constituyó el objetivo de estudios extensos de asociación con enfermedad.

Tabla 3. Enfermedades asociadas a HLA.

Enfermedades Asociadas a HLA		
Enfermedad	Alelo	RR
Espondilitis anquilopoyetica	B27	70
Uveítis anterior aguda	B27	10
Hemocromatosis idiopática	A3	7
Hiperplasia adrenal congénita	B47	10
Enfermedad de Behcet	B5	4
Narcolepsia	DR2	30
Dermatitis herpetiforme	DR3	17
Pénfigo vulgar	DR4	15
Enfermedad Good-Pasture	DR2	14
Enfermedad Celiaca	DR3	12
Artritis reumatoide	DR4	4

RR = riesgo relativo.

(Fuente: Manzanares et al., 2009)

El primer reporte de asociación entre el sistema HLA y una enfermedad en humanos fue presentado por Amiel en 1967, durante el tercer Taller Internacional de Histocompatibilidad en Turín. Su estudio reveló un aumento débil en la frecuencia del antígeno HLA^B4C' (ahora HLA-B5, -B35, -B18) en pacientes con enfermedad de Hodgkin (51%), al compararse con la frecuencia obtenida en testigos sanos (27%). Sin embargo, fueron los estudios de Brewerton y Schlosstein en 1973 los que iniciaron numerosos reportes de asociación entre el sistema de HLA y la susceptibilidad a enfermedades, al revelar una fuerte asociación entre la Espondilitis Anquilosante y el antígeno HLA-B27 (De Vries, 1994). Desde entonces, diferentes estudios han demostrado la asociación entre antígenos del sistema HLA clases I y II con enfermedades. El descubrimiento de otros genes en esta región (MIC, TNF, TAP y LMP) ha hecho necesario investigar su posible participación como genes de susceptibilidad (Pérez-Rodríguez, 2005).

Efectivamente, a pesar del alto polimorfismo de las moléculas HLA y de la ampliación del número de subtipos alélicas de clase I y de clase II, hoy se conocen diversas enfermedades que están asociadas a clase I y otras a clase II.

El número de enfermedades asociadas a alelos de clase I es menor que el de las asociadas a clase II.

Las enfermedades asociadas con los antígenos HLA tienen ciertas características que la identifican, algunas de ellas son: que poseen un origen y mecanismo fisiopatológico desconocido; una forma hereditaria de distribución pero escasa penetrancia; no asociación absoluta con un antígeno HLA determinado; se asocian con anomalías inmunológicas y tienen poco o ningún efecto sobre la reproducción.

I.8.1.1. Asociación HLA con enfermedades diferentes a leucemias

Existen diversos tipos de estudios tanto poblacionales como familiares que demuestran la relación entre un marcador genético particular HLA y diversos estadios de la enfermedad. Estos estudios han proporcionado dos tipos distintos de información; los de población han servido para determinar estadísticamente la frecuencia de la relación entre un marcador genético particular HLA y una enfermedad determinada. En contraste, los estudios familiares han servido para demostrar eslabonamiento entre un gen de susceptibilidad a la enfermedad y el marcador HLA (Parslow et al., 2002).

Se ha postulado una serie de hipótesis para tratar de explicar el mecanismo de asociación como (Pérez-Rodríguez, 2005):

1. Mimetismo molecular entre moléculas HLA y agentes infecciosos. Esta hipótesis del mimetismo molecular comprende dos alternativas. La primera sostiene que debido a la similitud entre el agente causal y el antígeno HLA, el agente etiológico se aprecia como propio y no se desencadena una respuesta inmunitaria, por lo que el agente causal produce la enfermedad sin interferencia con la respuesta inmunitaria del receptor. La segunda alternativa sugiere que el agente causal se mira como ajeno, y se origina una respuesta inmunitaria vigorosa contra el agente etiológico. Debido a la similitud del agente y el antígeno

HLA la respuesta inmunitaria se dirige contra el antígeno HLA y es esta respuesta “autoinmunitaria” la que produce la enfermedad (Parslow et al., 2002).

2. Modificación de la estructura de las moléculas HLA. Propone que el agente que causa la enfermedad altera moléculas constituyentes normales del individuo y las transforma en blancos de una respuesta autoinmune.

3. Moléculas HLA como receptores. Los antígenos HLA pueden actuar como receptores de agentes infecciosos o de sus productos antigénicos, de esta forma, la presencia de las moléculas HLA sobre la célula blanco se considera un prerrequisito para la penetración del patógeno a nivel celular y para el desarrollo de la enfermedad (Pérez-Rodríguez, 2005; Trabace, 2000).

4. Deficiencias en la respuesta inmune. Los antígenos del sistema HLA participan en la regulación de la respuesta inmunitaria, por lo tanto, cualquier trastorno que se manifieste como aumento o defecto en la respuesta inmunitaria podría implicar a los antígenos HLA y explicar su participación en la predisposición genética a la enfermedad (Pérez-Rodríguez, 2005; Trabace, 2000).

5. Deficiencias de los antígenos HLA clase III. Las deficiencias de antígenos clase III, solas o en desequilibrio génico con otro antígeno HLA, pueden asociarse con la susceptibilidad a algunas enfermedades, por ejemplo: la deficiencia del factor C2 del complemento se ha encontrado asociada con DR3 en el lupus eritematoso sistémico, y el defecto en el gen CYP21 de la 21-hidroxilasa se ha asociado con HLA-B47 en la hiperplasia adrenal congénita.

6. Falla en la selección. Existe la posibilidad que las moléculas HLA asociadas con la enfermedad participen en la selección de las células T, con un receptor (TCR) particular durante la selección positiva o negativa en el timo. La selección de linfocitos T autorreactivos o moléculas deficientes en la presentación de péptidos antigénicos pueden contribuir en la patogénesis de la enfermedad. Dependiendo de los péptidos presentados por las moléculas HLA, se originará una respuesta inmunitaria protectora o una deficiencia en la respuesta inmunitaria

que pudiera favorecer el desarrollo de una enfermedad (Pérez-Rodríguez, 2005; Trabace, 2000).

Debido a la asociación existente entre los alelos HLA y las enfermedades autoinmunes, vale la pena tomarlas en cuenta para indicar los hallazgos encontrados en estos últimos años. Aunque los mecanismos subyacentes a la asociación del CPH no están claramente entendidos, se ha sugerido como una vía de explicación la ruptura en la tolerancia inmunológica a antígenos propios a través de la presentación aberrante de péptidos extraños o propios por las moléculas clase II a los linfocitos T autorreactivos (Fernando et al., 2009). Dentro de las enfermedades autoinmunes asociadas con HLA se pueden mencionar:

La Esclerosis Múltiple (EM). Es un desorden desmielinante inflamatorio crónico del sistema nervioso que se asocia con el haplotipo HLA-DR2. Esto se observó por primera vez en 1972 y sigue siendo uno de los hallazgos más reproducibles en la genética del CPH. Debido al fuerte desequilibrio de enlace (del inglés *Linkage Disequilibrium* o LD) de todo el haplotipo asociado, no está claro si el conductor principal de la asociación es el alelo HLA-DQB1*06:02 o el DRB1*15:01. Sin embargo, hay más evidencia de la estrecha relación del alelo HLA-DRB1 *15:01 con el *15:03 en los afro-americanos y posiblemente, la población europea en comparación con el HLA-DQB1* 06:02 (Fernando et al., 2009).

La Diabetes Tipo 1 (DT1): Es una enfermedad autoinmune crónica caracterizada por la destrucción de células T que median la destrucción de células beta de los islotes pancreáticos. Hasta la fecha, la mayoría de las evidencias apoyan la variación en el HLA-DQ como el principal locus de predisposición a esta enfermedad. El papel predominante de los haplotipos DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02 y DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01 en la susceptibilidad a DT1 en poblaciones europeas, se ve confirmada por varios estudios (She, 1996). La heterocigocidad para ambos haplotipos de riesgos confiere el importantísimo riesgo genético conocido para la DT1. La formación de dímeros DQ *trans* específicos por transcomplementación entre los alelos HLA-DQA1 y HLA-DQB1 en cromosomas homólogos (DQA1*03:01/DQB1*02:01 y

DQA1*05:01/DQB1*03:02) pueden ser los responsables del incremento en el riesgo heterocigoto. El HLA-DR4 (DRB1*04:05-DQB1*04:01) y DR9 (DRB1*09:01-DQB1*03:03) han mostrado asociación con DT1 en poblaciones japonesas y coreanos. El alelo DQB1* 06:02 se ha reportado de protección, de igual manera es importante recalcar que en la población latinoamericana se confirmó la asociación de los alelos de riesgo DRB1*03, DQA1*05:01, DQB1*02y DQB1*03:02 con la DT1 y los alelos de protección DQB1*05:01 **(Cifuentes et al., 2010)**.

En general, los estudios hasta la fecha sugieren que tanto los genes HLA-DR y HLA-DQ son importantes para determinar el riesgo de la enfermedad; sin embargo, los efectos de los alelos individuales pueden ser modificados por los haplotipos que lo portan **(Fernando et al., 2009)**. El genotipo DPA1*01-DPB1*02:02:02 fue el único genotipo asociado significativamente con Diabetes Mellitus insulino dependiente (DMID) en una población venezolana **(Dausset, 1958)**. En estudios familiares, el alelo DPB1*03:01 haplotipo DPA1*01:03-DPB1*03:01 se encontró asociado con susceptibilidad, mientras que el DPB1* haplotipo DPA1*01:03-DPB1*04:02y el haplotipo DPA1*01:03-DPB1*01:01 resultaron de protección en la DMID **(Benacerraf, 1981)**.

El Lupus Eritematoso Sistémico (LES). Se ha vinculado al CPH como el principal factor de riesgo genético en la susceptibilidad a esta enfermedad. Sin embargo, la contribución exacta atribuible al CPH con respecto al riesgo genético total queda por determinar. Las asociaciones HLA mas firme con LES reside con los alelos clase II HLA-DR3 (DRB1*03:01) y HLA-DR2 (DRB1*15:01) y sus respectivos haplotipos principalmente en poblaciones blancas. Estudios en poblaciones no blancas han mostrado resultados contradictorios **(Fernando et al., 2009)**. Mientras que en la población del noroeste de Irán mostraron que el alelo DQ6 (*06:01-*06:09) probablemente sea el asociado genéticamente con susceptibilidad a LES. Esta asociación de LES con varios antígenos HLA sugiere que los péptidos presentados por los antígenos HLA son numerosos y con diferentes afinidades en los sitios de unión al péptido de las moléculas HLA **(Rezaieyazdi et al., 2008)**. Los análisis anteriores ponen de relieve la importancia del polimorfismo dentro de HLA-DR3-que contiene los haplotipos en la susceptibilidad

a lupus. El resto de las señales de asociación en gran parte surgen de los alelos de los genes de clase II HLA-DRB*1, HLA-DQA*1 y HLA-DQB*1 (Fernando et al., 2009).

La Artritis Reumatoides (AR). El CPH representa aproximadamente un tercio del total de los componentes genéticos de riesgo a la AR. Probablemente no todos el riesgo atribuible al CPH están asociado con la variación en el HLA-DRB1*. Cuando los subtipos HLA-DR susceptibles fueron considerados como un grupo, Gregersen et al. (1987), notó una secuencia de aminoácidos compartida en la posiciones 70–74 de la proteína de HLA-DRB1*. Estos alelos ahora se conocen colectivamente como "epítpe compartido". El epítpe compartido llevado por la gran mayoría de los pacientes con artritis reumatoide, es un motivo de secuencia 5-bis en la tercera región alélica hipervariable del HLA-DR de la cadena β . Los alelos más comunes de susceptibilidad HLA-DRB1* con epítpe compartidos incluyen: *01:01, *04:01 y *04:04 presentes en personas de ascendencia europeas y *04:04 y *09:01 en individuos de ascendencia asiática(Fernando, 2009).En los estudios realizados en pacientes ecuatorianos que padecían de artritis reumatoide se encontró una asociación positiva entre los alelos DR4 y el DR14 (Aguirre et al., 2010), al igual que en otras investigaciones similares realizados en poblaciones de Turquía e Italia, allí se revela una alta frecuencia de los alelos DRB1*01, *04, *09 y *10 con la artritis reumatoide, mientras que el alelo DRB1*13 y el DRB1*03 lo han reportado de protección(Uçar et al., 2011; Sandoughi et al., 2011).

Otras patologías de curso infecciosas e inflamatorias también se han asociado con los alelos HLA en el caso de la Fibrosis Pulmonar Idiopática (IPF, por su siglas en inglés *Idiopathic Pulmonary Fibrosis*), se ha observado que el alelo DRB1*15:01 está sobre expresado entre los caucásicos con IPF. Los genotipos DPA1*02:02-DPB1*05:01 y DPA1*02:02:02-DPB1*03:01, respectivamente, se asociaron fuertemente con el riesgo de infección persistente con el virus de la hepatitis B en asiáticos (Balducci-Silanoa y Layrisse, 1995; Kamatani et al., 2009). El alelo DPA1*02:02:02 se asoció positivamente con hiperseropositividad de niveles de anticuerpo después de la vacunación anti sarampión en niños escolares en Estados Unidos (Ovsyannikova et al., 2004).

I.9. Asociación HLA con leucemias

El estudio de la asociación HLA con las leucemias, se inició con la investigación de la susceptibilidad en el ratón para desarrollar leucemias y se realizó con conocimientos limitados del complejo H-2. **Gross (1961)** demostró que cuando los filtrados libres de células de ratones AKR o C58 (cepa pura con una incidencia muy alta de leucemia espontánea) eran inyectados a los ratones recién nacidos de estirpe C3H/Bi o C57BR/cd (con baja incidencia natural de leucemias) estos desarrollaban leucemia, mientras que los ratones adultos eran resistentes. Interesantemente estas cuatro cepas (AKR, C58, C57BR, C3H) todas tienen el mismo haplotipo del CPH H-2^k (**Gorer, 1956 y Gross, 1961**). **Lilly et al. (1964)** demostraron el papel del haplotipo H-2 en el desarrollo de leucemia por inoculación de extractos leucémicos en ratones de las generaciones segregadas con diferentes tipos de H-2^k. El haplotipo H-2^k causó incremento en la susceptibilidad para ambas leucemias, la “virus- inducida” y la “espontánea”, pero solamente en homocigotos. Estudios posteriores continuaron demostrando que el desarrollo de la leucemia espontánea y la inducida por virus estaban influenciados por H-2^k (**Lilly, 1966; Boyse et al., 1972**).

Es importante mencionar que las investigaciones de leucemias en modelos de ratones tratados con virus inductores de linfomas, demostraron la susceptibilidad de las cepas de los ratones portadores del alelo del CPH-21-A^{kk} en comparación con la resistencia observada por las cepas de ratones portadores de los alelos H-2^{bb} o H-2^{bk} (**Lilly, 1973; Lonai et al., 1982; Zijlstra y Mlief, 1986**). Sin embargo, la contribución del CPH en el desarrollo de las leucemias aparece como un elemento secundario dentro de un contexto multifactorial y poligénico. La misma relación de susceptibilidad y resistencia a la leucemia asociada al CPH, ha sido observada en otras especies animales tales como: ratas, bovinos, aves y conejos (**Dorak, 2007**).

En el humano el estudio sobre el papel del sistema HLA en la susceptibilidad con leucemias comenzó en la década de los 90, cuando se encontró que la frecuencia del alelo HLA-A2 estaba aumentada en todos los pacientes (**Dorak, 2007**). En 1970 un segundo estudio en LLA amplió la primera asociación HLA-A2 a

las asociaciones de los haplotipos HLA-A2-B12 (**Walford et al., 1967**). Aunque no confirmado en todos los estudios, la asociación HLA-A2 es una de las pocas asociaciones de leucemia señaladas en más de un estudio y de hecho, una asociación significativa en los datos acumulados (**Tiwari y Terasaki, 1985**).

De allí en adelante, se han realizado diversos estudios para determinar los alelos del sistema HLA implicados en la susceptibilidad a los diferentes tipos de leucemias, ya sean crónicas o agudas, en niños y en adultos. La mayoría de esos trabajos examinaron un gran número de pacientes y controles empleando las mejores técnicas de tipificación disponibles para el tiempo. Pero el estudio de asociación HLA más extenso en leucemias se realizó con los datos del registro Internacional de trasplante de médula en el año 77 y 78. Estos estudios analizaron un total de 1.834 pacientes con LLA, LMA y LMC tratados entre 1969 y 1985 (**D'Amaro et al., 1984 y Bortin et al., 1987**). Es interesante mencionar el estudio de **Navarrete et al. (1986)** en pacientes con LMA y LLA donde encontró que existía una disminución de la frecuencia del alelo HLA-Aw19 en todos los pacientes con LLA, mientras que en los pacientes con LMA, observó una disminución de los antígenos HLA-B18 y HLA-DR5 (DRw11). Estos resultados sugieren que el antígeno Aw19 puede conferir cierto grado de resistencia al desarrollo de LLA y que el HLA-B18 y/o el antígeno DR5 pueden ser factores de resistencia para desarrollar LMA (**Tristam et al., 1998**).

Siendo la base los estudios realizados por **Gorer (1956)** en ratones, las leucemias sigue siendo la patología que más dedicación ha tenido en cuanto a su asociación con HLA. A medida que avanza la tecnología para la determinación de estos genes, también se perfecciona su búsqueda e identificación especialmente para

LLA y LMC.

En la LLA, se han reportado alelos asociados tanto de clase I como de clase II. En los estudios realizados por **Dorak et al. (2002)** en pacientes varones con LLA infantil se describe una fuerte asociación de las LLA con homocigocis HLA-DRB4* (DR53). Esta especificidad DR53 está codificada por el locus DRB4* en la región

de HLA clase II. El DRB4* es uno de los loci que existen solo en haplotipos que poseen HLA-DRB1*04, DRB1*07 y DRB1*09. Los niveles de expresión de DRB4* es variable, (Leen MP y Goroski J. 1997) y se expresa no solo por el haplotipo HLA-B57, DR7, Dw11 (Knowles RW et al., 1986). El gen HLA-DRB4* o su producto de proteína DR53 se han asociado con un mayor riesgo para todas los tipos principales de leucemias. La mayoría de los haplotipos HLA-DR53 portan el alelo HLA-A2 de susceptibilidad (Dorak et al., 2002).

Otro alelo asociado a la LLA que muestran una frecuencia elevada considerada de alto riesgo en niños iraníes con LLA es el HLA-DRB1*04. Mientras que el alelo DRB1*13 con una frecuencia disminuida en esta población se muestra como un marcador de protección (Yari F. et al., 2008). De igual manera el alelo HLA-DRB1*15 en otra población de pacientes infantiles con LLA, fue reportado de riesgo para esa patología (Wang et al., 2009).

En cuanto a la región HLA-DP, es poco lo que se conoce acerca de la relevancia del polimorfismo en la respuesta inmunitaria; sin embargo, se han descrito algunas asociaciones con diferentes leucemias. Pawelec et al. (1988), utilizando a 254 pacientes con diferentes tipos de leucemias, fueron de los primeros en señalar la influencia de la región DP en la susceptibilidad o resistencia a la LLA, mostrando una asociación positiva con el DPw2 y DPw5, ninguna con la LMC, mientras que el HLA-DPw1 solo se observó asociado positivamente a pacientes con leucemia aguda no linfocítica (Sánchez-Pérez et al., 1986; Moent et al., 1984; De Jongh et al., 1984).

Estudios realizados por Taylor et al.(2002), revelan que la susceptibilidad a leucemia linfoblástica aguda común (LLA-c) en niños, estaba asociada con un alelo *DPB1*02:01* en el locus HLA-DPB1, apuntando esta susceptibilidad a mecanismos que involucran la presentación de péptidos antigénicos específicos, derivados probablemente de agentes infecciosos, por proteínas alotípicas relacionadas a *DPB1*02:01* que conducen a la activación de células T colaboradoras que median la proliferación de células pre-leucémicas. Recientemente, el gen HLA-DRB1*15 se señaló como factor de riesgo en niños con LLA (Wang XJ et al., 2009) Se especula que la molécula HLA-DPB1*06:01 puede

estar funcionalmente involucrada en leucemias infantiles (Taylor GM et al., 2009). Ciertas hipótesis se han tejido en torno a la posibilidad de participación de estas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad en la patogenia de las leucemias (Taylor M, et al., 2009). Todos estos antecedentes apuntan a que la región DP, conformada por los alelos HLA-DPB1* y HLA-DPA1*, ambas cadenas con diferentes polimorfismos, aparecen involucradas en la patogenia de las leucemias.

Así como en la leucemia linfocítica aguda se ha reportado una serie de asociaciones positivas y negativas con las moléculas de HLA clase I y II, también en la leucemia mieloide crónica se han encontrado alelos de susceptibilidad y de protección en el padecimiento de esta patología. Estudios realizados en pacientes iraníes con LMC reportó una asociación negativa del alelo HLA-DRB1*11 con la LMC considerándolo de protección; mientras que con los alelos HLA-DQA1*05:05 y el HLA-DQB1*03011 se encontró una asociación positiva indicando estos alelos de riesgos para la LMC (Amirzargar et al., 2007). El alelo DRB1*11 y el DRB1*04 se han reportado también de protección (Oguz et al., 2004; Posthuma et al., 2000).

Algunos virus imitan epítomos comunes HLA, como los adenovirus que emplean un mecanismo de evasión y mencionado anteriormente. En la leucemia mieloide crónica (LMC) una traslocación entre en el cromosoma 9 y 22 da como resultado la formación de una proteína quimérica de **bcr y abl** detectada en el 95% de los casos de LMC. La proteína quimérica bcr-abl se expresa solamente en células de LMC pero no en las células normales. Por tal motivo, la secuencia de fusión puede actuar como blanco potencial del ataque de la respuesta inmune mediada por los linfocitos T frente a las LMC. Postuma et al. (2000) describe la expresión del DR4 asociada a la disminución de la incidencia de LMC, posiblemente por la presentación de péptidos de fusión bcr-abl en esa molécula HLA sobre la membrana de la célula leucémica. Se ha demostrado generar linfocitos TCD8+ citotóxicos específicos de **bcr-abl** in vitro. El producto de la traslocación b3a2 es presentado por los alelos HLA-DRB1*1101 (Pawelec G, et al., 1996), DRB1*04:01 y DRB1*09:01 in vitro. Ninguno de estos alelos ha sido asociado in vivo con protección en pacientes con LMC (Yasukawa M. et al 2001).

Se ha publicado la asociación positiva del alelo HLA DRB1*14 con la LMC (Rosas-Cabral et al., 2003), donde algunos subtipos de este alelo se han postulado como posibles blancos de reacciones autoinmunes por mimetismo molecular con péptidos virales oncogénicos. Esta observación es de particular interés debido al mimetismo mostrado por varios virus oncogénicos para el epítipo HVR3 del DR53 que se extiende a los alelos DRB1*01, DRB1*10 y DRB1*14 (Dorak et al., 1999; Schlehofer et al., 1996). En este caso en particular, interesa el mimetismo molecular entre el adenovirus y los subtipos del alelo DRB1*14 (14:01, 14:07, 14:08, 14:10, 14:11, 14:14, 14:18, 14:23,14:26, 14:28, 14:31, 14:32, 14:34, 14:35, 14:36, 14:38 y 14:39), los cuales presentan el mismo cambio de posición observado en el aminoácido del epítipo DR53 (Dorak et al., 1996). Este segmento mimetizado ha sido identificado como un polipéptido de 7 aminoácidos de secuencia LLERRRA de acuerdo a trabajos realizados por Dorak et al. (1994). Es de acotar también que existen varios reportes que indican una asociación entre t (9; 22) (q34; q11) y diferentes alelos HLA. Esta asociación sugiere un posible papel de las células T citotóxicas en la patogénesis de la enfermedad relacionado a las proteínas de fusión *bcr-abl*, los resultados de algunas asociaciones negativas significantes fueron observadas HLA-A* 02(b2a2, a1a2), B*14(b2a2, b3a2, a1a2). DQB1*03:03 (b2a2, b3a2), DQB1*06:03 (b2a2) DRB1* 04:01 (a1a2), DRB1*07:01 (b3a2) y DRB1*11 (b2a2) (Mundhada et al., 2007). Así, individuos portadores de ciertos alelos HLA capaces de unirse a péptidos derivados de los transcritos de fusión *bcr-abl* presenta una ventaja biológica cierta para enfrentar esta enfermedad en comparación de aquellos que carecen de estos alelos. En estudios previos, usando tipaje de alta resolución para HLA-DRB, Yasukawa et al. (2000) reportaron una asociación positiva con HLA-DRB1*12:01/(b2a2) y DRB1*04:03, DRB1*08:02, DRB1*14:03, DRB1*14:05 /(todos b3a2), además de una asociación negativa con DRB1*04:05, DRB1*08:03:02, DRB1*15:02/(todos b2a2) y DRB1*08:03:02, DRB1*15:01/(ambos b3a2) en la población japonesa.

En la literatura está ampliamente descrita la importancia de la presentación de péptidos antigénicos previamente procesados por las moléculas HLA de clase I o clase II a los linfocitos T CD4+ ó CD8+, para generar una respuesta inmunitaria eficaz en la eliminación de ese patógeno. Sin embargo, investigaciones han

evidenciado que eventualmente esa misma respuesta que pudiera ser de protección, se convierte en generador de respuestas dañinas para el organismo. Diversos hallazgos sugieren una respuesta por parte de los linfocitos T que es autorreactiva, y que son inducidas por la presencia de virus que desencadenan procesos descontrolados de proliferación celular involucrándose en neoplasias. Las leucemias son un tipo de neoplasia que pudiera estar asociada a tal evento, y una explicación de este hallazgo podría ser, que la expresión antigénica favorecería el reconocimiento en la célula leucémica de determinados péptidos y supondrían una señal de activación del mecanismo citotóxico mediado por los linfocitos CD8+. Todo ello sugiere la participación de un determinado patrón inmunofenotípico en la célula leucémica, con expresión de un mayor número de moléculas antigénicas y cambios en el patrón de dispersión, que podría ir asociado a un aumento de linfocitos TCD8+.

De igual manera se han descrito asociaciones positivas y negativas de haplotipos con LMC. La combinación HLA-DR4/DR53/DQ8 de susceptibilidad en pacientes alemanes. **(Manchilla et al. 2003)** y los haplotipos DRB*11/DQB1*03011/DQA1*05:05 y HLA-DRB1*04/DQB1*03:02/DQA1*03011 en iraníes **(Amirzargar et al., 2007)** muestran una asociación positiva y de riesgo para esta leucemia.

La información hasta ahora descrita sobre los estudios de asociación, ha permitido identificar la presencia de genes HLA de susceptibilidad para las leucemias, y que aun cuando no permiten explicar los mecanismos que desencadenan esta patología, sin embargo, conllevan a concentrar las futuras investigaciones en esos alelos asociados a la enfermedad. Es así oportuno desarrollar estudios más profundos utilizando entre otros, modelos experimentales que imiten los eventos que suceden in vivo de esta patología. De esta manera, se obtendría respuesta para resolver incógnitas que hasta ahora han bloqueado la posibilidad de ofrecer a los pacientes que padecen leucemias la esperanza de solventar su salud. Es necesario elaborar tratamientos eficaces y oportunos, así como la elaboración de vacunas de protección.

Por tal motivo, en base a los antecedentes mencionados y conociendo la importancia de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad en la respuesta inmunitaria mediante el procesamiento y presentación antigénica. Se plantea estudiar una vez que se ha identificado los alelos de susceptibilidad para la LLA y LMC, luego de identificar los subtipos del alelo de riesgo en este caso del HLA-DRB1*14, proceder a valorar los mecanismos inmunitarios antivirales de los pacientes con LMC mediante la determinación serológica de anticuerpos contra adenovirus y la determinación de linfocitos TCD8+ contra el epítipo HVR3 y contribuir al planteamiento ulterior de una asociación entre la infección viral, presencia de alelos HLA asociados y una enfermedad neoplásica.

I.10. Epidemiología de la leucemia

Pese a no ocupar los primeros lugares de morbilidad y mortalidad general, las enfermedades hemato-oncológicas tienen gran relevancia debido a la elevada incidencia de mortalidad en la población infantil y adulta joven (Tirado Gómez et al 2007). Tal es el caso de las leucemias, de la cual se conoce que para el año 2000 unas 256.000 personas desarrollaron esta enfermedad, muriendo 210.000 (82% de mortalidad). (Colin et al., 2001).

Las leucemias son más frecuentes en hombres (56%) que en mujeres y la incidencia varía de acuerdo a la edad y tipo de leucemia, aun cuando ocupan el 10mo lugar de morbilidad. En USA (en inglés *United States of America*), representan el 25% de todos los cánceres que se presentaron en niños menores de 20 años en el período 1997-2002, siendo la leucemia linfática aguda la más frecuente en este grupo de edad (~ 1/70,000 en adultos). En cambio en los adultos, especialmente en los mayores de 50 años, las más frecuentes fue la leucemia linfática crónica y leucemia mieloide aguda (~ 1/10,000). La incidencia de leucemia mieloide crónica (1,25/100,000) aumenta discretamente en mayores de 40 años. En Europa, las leucemias tienen una incidencia de 2,6/100.000, con un total de muertes el 2004 de 52.600 (3,1%). En Chile, de un total de 8.050 egresos hospitalarios por leucemia (CIE- 10, C91- C95) en el año 2003, un 54,4% correspondieron a personas de 10 años y más, con un total de 47.204 días de

estada, y una tasa de letalidad de 3,54/100 egresos. En tanto la tasa de mortalidad en ambos sexos fue 3, 7/100.000 (DEIS, 2002) con un total de 581 fallecidos; 54% correspondieron a hombres (4,0/100.000) y 46% mujeres (3,4/100.000). Durante el año 2004 se presentaron 486 casos nuevos de leucemia en personas de 15 años y más, siendo entre un 60% a 70% leucemias agudas. El total de casos estimados (leucemias crónicas y agudas) a tratar por año sería aproximadamente entre 450 – 500 casos país. (Programa Cáncer del Adulto, PANDA, 2005)(Guía Clínica de leucemias en adultos, series clínicas MINSAL No. 45, 2007). En México en el año 2002 ocupó el segundo lugar en mortalidad, por neoplasias malignas en niños de 5 a 14 años de edad, con una tasa de 2.71 por 100,000 habitantes **(Tirado-Gómez y Mohar, 2007)**.

Es la más común de las neoplasias en niños y su frecuencia es mayor entre los 3 y 5 años, abarca el 25% de todos los cánceres en menores de 15 años. Su incidencia anual es de 3 por 100.000 niños. La LLA se presenta con una frecuencia del 80-85% de los casos y la leucemia aguda no linfocítica en el 20% **(Trigg et al., 1996; Heim y Mitelman, 1995; Pérez-González et al., 1999)**.

Las LMC representan entre el 15 y el 20% del total de leucemias y su incidencia en los países occidentales se estima en 1,6 casos por 100.000 habitantes/año. La edad mediana de su aparición es de 53 años, la incidencia máxima se encuentra entre los 40 y 60 años. Predomina ligeramente en varones, con una relación de 1.3:1. Alrededor de la mitad de los pacientes son asintomáticos al diagnóstico y la mediana de supervivencia global después de este es de 4 a 6 años **(Rodríguez et al., 2007)**.

En el caso de Venezuela para el año 2006 las leucemias ocupaban el quinto lugar entre las diez principales localizaciones de cáncer en hombres y mujeres. En niños y adolescentes menores de 15 años, representa junto con las neoplasias malignas del sistema nervioso central y los linfomas, más del 40% de la patología neoplásica infantil, donde solo el 30 % es susceptible a trasplante **(Capote Negrin, 2006)**.

Se ha señalado, que la genética poblacional tiene un gran impacto en la epidemiología de las poblaciones, y eso puede ser una extraordinaria herramienta

para el entendimiento del estado de salud, demografía, historia y Antropología considerando que étnicamente, las poblaciones mezcladas pueden ser analizadas por regiones dentro de su propio país (**Gorodezky et al; 1992**). Las cifras epidemiológicas presentadas anteriormente para Venezuela, motivan a dirigir la atención en la investigación de leucemia en esta población debido principalmente a que estudios previos sobre antígenos de histocompatibilidad realizado por **Villalobos et al. (2003)** en una población mestiza venezolana observó un incremento significativo en la frecuencia de los alelos HLA-B*39 y HLA-C*03 en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC). Varios haplotipos HLA clase I de dos loci, mostraron diferencias significativas en estos pacientes LMC con respecto a los controles. El haplotipo de tres loci HLA-A*02, B*40, C*03 se asoció positivamente a la LMC con un alto riesgo relativo. En este estudio no se encontró ningún tipo de asociación con leucemia linfocítica aguda.

La tipificación de los alelos de HLA clase II (DRB*1, DQB1*, DPA1* y DPB1*) a realizarse en el presente trabajo en pacientes con leucemia y sus potenciales implicaciones patogénicas, complementa el estudio de asociación HLA en estos pacientes mestizos venezolanos, constituyendo un aporte de importantes datos para la comprensión del origen de esta mortal enfermedad.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las asociaciones positivas o negativas de alelos del sistema HLA con el desarrollo de enfermedades es un hecho patogénico establecido. Esta asociación se ha demostrado en entidades nosológicas de muy diferente naturaleza incluyendo procesos autoinmunes/inflamatorios, infecciosos y neoplásicos. La consistencia de estas asociaciones es diferente entre distintas razas y etnias. En leucemia linfocítica aguda y leucemia mieloide crónica, las asociaciones positivas o negativas con los alelos del complejo principal de histocompatibilidad (HLA) varían enormemente de una población a otra y entre grupos de pacientes. El análisis molecular preliminar de posibles asociaciones positivas y negativas entre LLA y LMC y los alelos HLA clase II arroja resultados alentadores que permiten sugerir su existencia y plantear que puedan participar a través de diferentes mecanismos en la patogenia de la enfermedad. Entre ellos se incluirían la falta de presentación de los antígenos o mimetismo con potenciales agentes microbianos inductores de la enfermedad de carácter autorreactivo.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los alelos HLA clase II de individuos sanos y pacientes con leucemia (LLA o LMC) en una muestra de población mestiza venezolana con el fin de establecer las frecuencias alélicas, asociaciones HLA positivas o negativas y su posible implicación en la patogénesis de la enfermedad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El presente estudio persigue los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer la expresión de los alelos de la población control mestiza venezolana para validar el estudio inmunogenético.
2. Analizar en pacientes con LLA y LMC la frecuencia alélica de HLA-DRB1*, DQB1*, DPA1* y DPB1* e investigar sus posibles asociaciones positivas y negativas con la enfermedad.

3. Establecidas las posibles asociaciones, determinar los sub-tipos de alelos asociados positiva y/o negativamente a las leucemias utilizando la técnica PCR-SSP de alta resolución.
4. Analizar con técnicas inmunológicas de evaluación de la respuesta humoral y celular de estos pacientes frente a diferentes diana celulares o posibles secuencias peptídicas que pudieran estar mimetizadas por las moléculas HLA producto de la asociación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio prospectivo traslacional, de corte transversal, clínico y experimental.

III.2. Población de estudio y protocolo de seguimiento.

La población de estudio estuvo conformada por 95 pacientes leucémicos y 48 individuos sanos mestizos venezolanos de tres generaciones. Esta se clasificó de la siguiente manera: 47 pacientes con LLA en edades comprendidas entre 7 meses a 65 años, 48 pacientes con LMC en edades entre 18 a 70 años y 48 individuos sanos sin evidencia clínica de enfermedad autoinmune o tumoral en edades comprendidas entre 8 a 78 años.

Los pacientes fueron seleccionados previo diagnóstico de LLA y LMC por exámenes de citogenética, citometría de flujo y revisión de historias clínicas, los cuales asistieron a las consultas de Hematología de los Hospitales de Especialidades Pediátricas, del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales (IVSS) Dr. Adolfo Pons y Central Dr. Urquinaona, ubicados en el Municipio Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.

Tanto los pacientes como los individuos sanos fueron sometidos a la realización de un cuestionario que sirvió para evaluar el estado de salud general y los antecedentes familiares sobre enfermedades (**anexo 1**).

Todos los individuos en el estudio, fueron debidamente notificados acerca del objetivo e implicaciones de participar en el presente estudio y se les pidió firmar de manera voluntaria un consentimiento informado (**anexo 2**). Todos los procedimientos realizados se rigieron por lo establecido en la Declaración de Helsinki (Ramiro, 2004), y en el Código de Bioética del Fondo Nacional para la Ciencia y la Tecnología de Venezuela (FONACIT) (Briceño et al., 2002) para procedimientos experimentales en humanos.

III.3. Ámbito de estudio.

El diagnóstico de las LLA y LMC se realizó en el Laboratorio de Citogenética y Citometría de Flujo del Instituto Hematológico de Occidente (Banco de Sangre) y del Hospital de Especialidades Pediátricas de la ciudad de Maracaibo-estado Zulia, Venezuela.

La tipificación de los alelos HLA, que involucró la extracción y amplificación del ADN se realizó en el Laboratorio de HLA e Inmunología del Instituto Hematológico de Occidente (Banco de Sangre) de la ciudad de Maracaibo-estado Zulia.

La concentración de los ADN se midió en el Laboratorio de Neurociencias del Instituto de Investigaciones Biológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

La serología para adenovirus se realizó en el Laboratorio de Referencias Viroológica de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

El cultivo mixto linfocitario se llevó a cabo en el Laboratorio de HLA e Inmunología del Instituto Hematológico de Occidente (Banco de Sangre) de la ciudad de Maracaibo-estado Zulia.

La determinación de marcadores linfocitarios TCD3, TCD4+, TCD8+ se realizó en el Laboratorio de Citometría del Banco de Sangre del estado Zulia.

La estimulación frente al péptido LLERRRA del adenovirus, se llevó a cabo en el Laboratorio del Servicio de Nefrología y Trasplante Renal del Hospital Universitario de la ciudad de Maracaibo- estado Zulia.

III. 4. Criterios de inclusión:

Para la tipificación del HLA, se incluyeron pacientes con LLA y LMC diagnosticados por estudio citogenético y citometría de flujo, con sintomatología característica de leucemia que incluyeron los siguientes criterios:

Fiebre persistente, sangrado, presencia de hematomas en piel sin que se recuerde traumatismo alguno, vómito, falta de apetito, debilidad general, dolores óseos, adenomegalia y hepatoesplenomegalia (**Ministerio de Salud, 2007**).

Para LLA, propensión al sangramiento e infecciones; además de dolor en huesos y articulaciones, propensión a hematomas y sangrado (como encías sangrantes, sangrado de la piel, sangrado nasal, períodos anormales), sensación de cansancio y debilidad, fiebre, inapetencia, pérdida de peso, palidez, dolor o sensación de llenura por debajo de las costillas, presencia de petequias (manchas rojas en la piel), linfadenopatía (ganglios inflamados en cuello, axilas e ingle), sudores fríos (**Pérez González et al., 1999**).

Para LMC, el cansancio intenso, fiebre no elevada, inapetencia, pérdida de peso, sudoración nocturna, sensación de llenura debajo de las costillas, esplenomegalia (bazo inflamado) (**Pérez-Requejo, 1987**).

III.5. Criterios de exclusión:

Para el estudio se excluyeron aquellos pacientes con LLA y LMC que habían recibido transfusiones de sangre recientes, al igual que los individuos aparentemente sanos con diagnóstico de alguna patología degenerativa, neoplásica, procesos infecciosos y trastornos hematológicos.

III.6. Recolección de la muestra.

Luego de ayuno nocturno (mínimo de 8 horas) y bajo condiciones de asepsia, a cada paciente con LLA y LMC, así como a los controles, se les tomó 5 ml de muestra de sangre venosa periférica, mediante venipuntura, los cuales fueron colocados en tubos estériles conteniendo 0,05 ml de anticoagulante EDTA (del inglés *Ethylenediaminetetraacetic acid*) para la obtención de sangre completa.

III.7. Ensayos experimentales.

III.7.1. Estudio molecular HLA clase II.

Con el fin de analizar en pacientes con LLA y LMC las posibles asociaciones positivas y negativas con los alelos HLA-DRB1*, DQB1*, DPA1* y DPB1* se utilizó la técnica de PCR-SSP.

Se separó el *buffy coat* (capa de células blancas) de la sangre completa para obtener el ADN necesario que sirvió para la determinación de los alelos HLA de clase II (HLA-DRB1*, HLA-DQB1*, HLA-DPA1*, HLA-DPB1*).

Para la extracción del ADN de la sangre de los pacientes con LLA, LMC y controles, se utilizó el método “*Salting-out*” (Miller et al., 1988). Luego, para la amplificación genética se realizó la técnica de PCR-SSP (reacción en cadena de la polimerasa) usando cebadores con secuencias específicas de la región a amplificar.

Extracción del ADN

La extracción y separación del *buffy-coat*: se realizó a partir de la sangre completa, la cual fue mezclada suavemente y centrifugada a 1300g durante 10 minutos para la separación de las células blancas (*buffy-coat*).

Para la lisis de las células rojas, se separó el plasma con una pipeta Pasteur plástica y se tomó el *buffy-coat* el cual se transfirió a un tubo de polipropileno de 15 ml con tapa, que contenía previamente 2 ml de buffer de lisis de células rojas RCLB (del inglés) luego se resuspendió con una pipeta Pasteur desechable. Se agregó 8 ml de buffer de lisis de células rojas (RCLB Buffer de lisis de células rojas) y se mezcló suavemente durante 1 minuto. Posteriormente, se centrifugó durante 15 min a 1300 g y se descartó el sobrenadante, al sedimento se le agregó 1 ml de RCLB y se mezcló como en el paso anterior, luego se centrifugó a 1300g durante 15 min se descartó el sobrenadante al

sedimento se le agregó 1 ml de solución salina citrato (SSC) al 1X y se resuspendió. Se agregó 2 ml de proteinasa K y se resuspendió, y se tapó el tubo mezclándolo suavemente por inversión. Se incubó a 37°C en baño de maría durante toda la noche y se agregó 1 ml de NaCl 5M, se agitó vigorosamente por 15 segundos y luego se centrifugó durante 15 minutos a 1500g y el sobrenadante se transfirió a un tubo Falcón de 15 ml.

Para la formación de la hebra de ADN, se tomó un volumen del sobrenadante anterior y se le agregó un volumen igual de Isopropanol (v/v), se mezcló suavemente por inversión hasta que se observó la formación de la hebra del ADN. Luego con una pipeta Pasteur de vidrio, a la que previamente con calor se le ha sellado el extremo, se pescó el ADN precipitado y se lavó en un tubo que contenía etanol al 80% dejándolo secar en la varilla o pipeta Pasteur por dos segundos.

Este ADN se transfirió a un tubo de micro-centrífuga de 1,5ml estéril previamente rotulado, que contenía entre 100-600 µl de agua ultra pura dependiendo de la cantidad de ADN precipitado. Luego se incubó en baño de maría a 80 °C durante 10 minutos para disolver ese ADN y se almacenó a -20 °C hasta la medición de la concentración del ADN.

Para determinar la concentración y pureza del ADN extraído, éste se incubó en baño de maría a 37°C por 1 hora y luego se agitó en vortex para mezclarlo bien. La lectura de la muestra de ADN se realizó con un espectrofotómetro de luz ultravioleta marca Perkin Elmer uv/vis Spectromater Lambda Bio 10 donde se midió A260/280

Después de medir la concentración del ADN, la muestra se guardó a 4°C hasta el momento de la amplificación con la PCR.

La concentración óptima exigida por la técnica de amplificación es de 30 ng/µl, debido a que aquellas que excedan los 50 ng/µl, incrementan el riesgo de bandas extras, débiles y amplificaciones no específicas.

Amplificación del ADN:

Para la prueba de amplificación, la muestra almacenada a 4°C, se agitó durante 5 segundos en el vortex y se centrifugó durante un minuto a 11.600g para asegurar una mezcla homogénea. Una vez utilizada la muestra, se almacenó a 4 °C nuevamente.

Para amplificar los ADN y determinar los alelos HLA-DRB1*, DQB1*, DPA1*, DPB3*,4*,5* y subtipos DRB1*14* se utilizó el método de la PCR-SSP (*Sequence- Specific Primer*) de Olerup SSP®.

El kit Olerup SSP™ permite evaluar 277 alelos del locus HLA DRB1*, 3*,4*,34 alelos del locus DQB1*, 28alelos del locus DPA1*, 123 alelos DPB1* y 64subtipos del alelo DRB1*14. El procedimiento y las condiciones de la PCR dependen de la región a amplificar.

Para los locus DRB1*- DQB1* la placa contiene 32 pozos, cada uno de ellos contiene la mezcla de *primers* 5' y 3' específicos de las regiones DQ y DR de baja resolución, además del par de *primers* control interno (que corresponde a la hormona de crecimiento). Los pozos del 1 al 8 contienen los *primer* DQB1* de baja resolución, los pozos del 9 al 31 contiene los *primers* para los alelos del locus DRB1*, el pozo N° 32 constituyó el control negativo.

Para la región DPA1*, se utilizó una placa de 16 reacciones PCR, cada uno contenía una alícuota de mezcla de solución de *primers* 5' y 3' específicos para amplificar esa región, además del par de *primers* control interno. El pozo N° 16 estaba vacío y servía de control negativo.

Para amplificar los alelos DPB1*, se utilizó una placa con 48 pozos que contienen un par de primer control positivo interno que amplifica segmentos de genes de la hormona de crecimiento humana. Los pares de primer control positivo amplifican segmentos del gen de la hormona de crecimiento. Los dos pares de primer control diferentes amplifican cada uno bandas de 430 pares de bases, para la mayoría de los pozos o una banda de 515 pares de base, para algunos pozos.

Verificación del producto amplificado. Una vez finalizada la amplificación, se procedió a realizar la electroforesis para verificar el producto amplificado.

Electroforesis en gel de agarosa: Todos los alelos amplificados se corrieron en un gel al 2 % de acuerdo a lo indicado por el kit. La agarosa fue preparada al 2 % en solución buffer TBE al 0,5X.

El buffer TBE 0,5X se preparó a partir de una solución patrón TBE 10 X (108 gramos de Tris base, 55 g de ácido bórico y 40 ml EDTA 0,5 M), pH 8,0; de esta solución se tomaron 50 ml para preparar 1 litro de TBE al 0,5X.

La presencia y ausencia de productos específicos de PCR al igual que las bandas del control interno positivo (800 y 1070 pb) se leyeron en un Transiluminador UV.

El tipaje del HLA-DR, DQ, DP de cada muestra se determinó mediante una tabla de interpretación descrita para los respectivos alelos provista por Olerup SSP™ (Genovision) DR-DQ, DPA1 y DPB1 de los respectivos lotes (Lot No x 80,73G, 47G).

Luego de asignar los alelos para cada población en estudio y habiendo comparado los pacientes LMC y LLA con sus respectivos controles, se determinaron las posibles asociaciones positivas y negativas entre el alelo HLA-DRB*14 y la LMC. Cuando se obtuvo asociación entre estos dos parámetros, se identificaron los subtipos de este alelo que estaban involucrados en la asociación.

III.7.2.Determinación de los subtipos DRB1*14

Establecidas las posibles asociaciones, se determinaron los sub-tipos de alelos asociados (positiva y/o negativamente) a las leucemias.

Para el estudio de los subtipos de alelos HLA-DRB*14 se incluyeron

solamente 8 pacientes del total de 21 con LMC y 4 controles que resultaron positivos al alelo DRB1*14 y en los cuales se encontró asociación con HLA. Estos subtipos se determinaron utilizando el kit de PCR-SSP Genovision N° de lote 101.117-12/03-*without* Taq –polimerasa de alta resolución.

El kit PCR-SSP contiene los primer 5' y 3' para identificar los alelos desde DRB1*14:01 hasta los alelos DRB1*14:64. La solución de *primer* están pre-alicuotados en tubos PCR de 0.2 ml. Cada tubo contiene los primeros específicos de alelos y los primeros controles de secuencias complementarias no alélicas.

La mezcla madre PCR sin Taq polimerasa contiene: nucleótidos, buffer, glicerol y rojo cresol. Cada prueba consiste de 32 reacciones PCR en una placa de 32 pozos con un volumen de reacción 10µl son realizadas para cada muestra.

Una vez amplificados los ADN se procedió a verificar el producto amplificado e identificar los alelos que corresponden a los subtipos, de acuerdo a la metodología antes descrita para los locus DRB1* DQB1*DPA1* y DPB1*.

Una vez identificados los mencionados tipos y sub-tipos de los alelos HLA asociados, se analizaron sus posibles implicaciones patogénicas con pruebas de biología celular, evaluando la respuesta humoral y celular de estos pacientes frente a diferentes diana celulares o posibles secuencias peptídicas que pudieran estar mimetizadas por las moléculas HLA producto de la asociación.

III.7.3. Evaluación de la respuesta humoral y celular de los pacientes con LMC HLA-DRB1*14.

Para la evaluación de la respuesta humoral y celular de los individuos HLA-DRB1*14 solo se tomaron en cuenta aquellos que tenían los subtipos de DRB1*14.

A los pacientes con LMC y controles se les practicó los análisis siguientes: Serología selectiva de adenovirus IgG e IgM, cultivo mixto linfocitario,

estimulación específica frente al péptido de adenovirus de 7 aminoácidos de secuencia LLERRRA y determinación de marcadores linfocitarios CD3, CD4+ y CD8+ por citometría de flujo.

III.7.3.1. Respuesta humoral (anticuerpos IgM-IgG frente adenovirus)

Para establecer si la LMC del paciente estaba o no relacionada al contacto previo con el adenovirus, se midieron los niveles séricos de IgG e IgM específicas para el virus. Aquellos individuos que resultaron negativos a IgM, se le midió la IgG. Este mismo procedimiento se siguió para los individuos sanos negativos a DRB1*14 (controles).

La determinación IgM e IgG para adenovirus se realizó utilizando un método de ELISA de fase sólida para anticuerpos IgM e IgG, marca Laboratorio DRG Instruments GMBH, DRG products Ref. EIA 3447 (Laferte et al. 1996).

III.7.3.2. Respuesta celular: Generación de linfocitos TCD8+

La leucemia mieloide crónica (LMC) pudiera ser producto de un ataque autoinmune a epítomos semejantes a ciertas estructuras proteicas de virus inductores de leucemia, donde varios de los sub-tipos del alelo DRB1*14 se han visto implicados. Uno de estos virus es el adenovirus cuyo epítomo HRV3 comparte similitudes estructurales con el alelo DRB1*14. Por lo anterior, se investigó en estos pacientes DRB1*14 positivo la posible presencia de células TCD8+ memoria específico, contra los sub-tipos de ese alelo, utilizando péptidos LLERRRA.

Obtención de células mononucleares para cultivo mixto de linfocitos y cultivo linfocitario en presencia del péptido viral:

La muestra de sangre venosa de los pacientes y controles fue tomada con heparina y diluida (v/v) en solución salina tamponada con fosfato (PBS. según sus

siglas en inglés), luego se colocó cuidadosamente sobre un gradiente de densidad Ficoll-Histopaque (Histopaque®-1077, Sigma Diagnostics) y se centrifugó por espacio de 30 minutos a 320g. Posteriormente se recuperó la capa de leucocitos de la interface, la cual fue lavada 3 veces con 10 ml PBS para finalmente ser reconstituida con el medio de cultivo. (González et al., 1986).

Cultivo mixto de linfocitos

Para el cultivo mixto de linfocitos se enfrentaron por 48 horas las células de un individuo sano DRB1*08-11 y las de un paciente con LMC DRB1*14-04 (ambos respondedores) contra las células de un individuo control sano DRB1*13-14 inactivado con mitomicina, que actuó como estimulante.

De acuerdo a la técnica descrita por **Dubey DP et al. (1986)**; se colocaron en un frasco Falcón 1 ml linfocitos a 2×10^6 /ml en medio RPMI 1640 adicionado de suero fetal de ternera al 5% y penicilina-estreptomina (células respondedoras) y 1 ml de linfocitos a 4×10^6 /ml, previamente tratados con mitomicina (Mitomicina sigma) a 4 μ g/ml durante 2 horas (células estimuladoras). Los cultivos se colocaron en atmósfera húmeda de 5% de CO₂ a 37°C durante 48 horas.

Una alícuota de 200 μ l de la mezcla respondedor/estimulante marcados con los anticuerpos monoclonales anti-CD8, anti CD4 y anti-CD3 fueron evaluadas a tiempo 0 (T0) y a las 48 horas (T48) por citometría de flujo (Beckman Coulter, USA). Los valores se expresaron en %CD3+, %CD4+ y %CD8+ y el índice CD4/CD8, en valores absolutos. (Stewart 1992).

Cultivo de linfocitos en presencia de péptido LLERRRA de adenovirus.

Curva dosis-respuesta

Dos individuos controles (positivo y negativo serológicamente al adenovirus) fueron enfrentados en cultivo linfocitario a una suspensión del péptido de secuencia LLERRRA del adenovirus a 0, 5, 10, 25 y 50 μ g/ml.

Los linfocitos separados por Ficoll-Histopaque fueron resuspendidos a $1,5 \times 10^6$ /ml en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal de ternera (STF) al

5% y penicilina-estreptomicina en micro placas de 96 espacios, se añadieron además 165 µg/ml de Interleucina 2 (IL-2 RD System; UK), concentración óptima recomendada por el fabricante. Se cultivaron los linfocitos en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% por espacio de 120 horas (cinco días). La proliferación linfocitaria fue medida por la técnica de la inclusión de la 5- Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (Paztor et al., 1972) y el resultado se expresó en AV (DO) e Índice de Proliferación IP.

Cultivo linfocitario de pacientes con LMC en presencia de péptido de secuencia LLERRRA del adenovirus.

Se cultivaron linfocitos de sangre periférica obtenidos de los siguientes individuos: control 1 un individuo sano HLA-DRB1*08-11, IgG e IgM adenovirus negativo, el control 2 un individuo HLA-DRB1*14-13IgM adenovirus positivo; paciente 1: un individuo con LMC HLA-DRB1*16-03, IgM e IgG adenovirus negativo y paciente 2 un individuo con LMC HLA- DRB1*14-04, IgG e IgM adenovirus negativo, siguiendo el mismo protocolo utilizado para calcular la curva dosis /respuesta, utilizando la concentración óptima de estimulación linfocitaria del péptido LLERRRA del adenovirus (25µg/ml). Un total de 200µl de cada suspensión fueron marcados con anticuerpos monoclonales anti-CD8, anti CD4 y anti-CD3 (Beckman Coulter, USA) y su correspondiente conjugado, luego analizados por medio de citometría de flujo (Equipo Beckman Coulter Epics XL). Paralelamente se cultivaron los mismos pacientes y controles en presencia de albúmina sérica humana (SAH) en lugar del péptido LLERRRA y se evaluaron igualmente, alícuotas de 200 µl de cada una por la técnica de citometría de flujo. Los resultados se expresaron en %CD3+, %CD4+ y %CD8+.

III.8. Análisis estadístico.

Las frecuencias alélicas y genotípicas se determinaron empleando el paquete de análisis genético Genepop (Raymond, 1995). El equilibrio de Hardy Weinberg para cada locus se probó con el paquete Arlequín, versión 3,0 el cual emplea una

prueba exacta análoga a la prueba Fisher teniendo en cuenta modificaciones al algoritmo de la cadena de Markov, descrita por Guo y Thompson en 1992 (Excoffier, 2005). Las frecuencias haplotípicas fueron estimadas igualmente en Arlequín versión 3,0.

Las pruebas de asociación se realizaron utilizando el programa SAS con el procedimiento Prim Comp. Se utilizó un coeficiente de confianza del 95% y se consideró una p corregida $\leq 0,05$ como estadísticamente significativa. La asociación HLA LLA o LMC se consideró positiva si el riesgo relativo (RR) estaba ≥ 3 y negativa si $RR \leq 3$

Los datos obtenidos de la determinación de alelos se registraron en una base de datos computarizada utilizando el paquete estadístico SPSS *statitics* 17, 0 (Sandiego, CA, USA) y el programa Excel for Windows 2007 para cálculo y presentación de datos en tablas y gráficos.

IV. RESULTADOS

IV.1 Valoración de la población mestiza venezolana sana

Para el estudio de alelos de histocompatibilidad de clase II (HLA-DRB1*, DQB1*, DPA1*, DPB1*) y su asociación con LLA y LMC, se valoró las frecuencias alélicas, haplotípicas y el grado de mezcla de un grupo de individuos sanos de la población mestiza venezolana resultado de diferentes etnias asentadas desde la época de la colonia en este país.

Los resultados revelan que el alelo con mayor frecuencia en la región HLA-DRB1* de la población *mestiza* venezolana fue el DRB1*13 con 30,21%, seguido del DRB1*04 (13,54%) y el DRB1*07 (9,37%). En el locus HLA-DQB1* se evidenció que la mayoría de estos individuos portan el alelo DQB1*03 (41,67%), seguido del DQB1*02 (22,92%) y el DQB1*05 (19,79%). Con respecto al marcador HLA-DPA1* se observó que el alelo *02:01 con una frecuencia de 27,08% fue el más relevante en estos individuos, seguido del DPA1*01:09 (27,08%) y el DPA1* 01:09 con 23,96%. En el locus HLA-DPB1* los alelos HLA-DPB1*04:01, DPB1*04:02 y DPB1*02:01 resultaron con frecuencias de 16,67%, 14,59% y 12,52% respectivamente, ver Tabla 4. Los análisis estadísticos determinaron que esta población se encontraba en perfecto equilibrio de Hardy Weinberg.

TABLA 4. Frecuencias alélicas (Fa), HLA clase II de la población mestiza venezolana sana resultante de la evaluación de los alelos DRB1*, DQB1, DPA1* y DPB1* por PCR-SSP de baja resolución

Fa			Fa			Fa			Fa		
DRB1*	n=48	%	DQB1*	n=48	%	DPA1*	n=48	%	DPB1*	n=48	%
01	6	6,25	02	22	22,92	01:03	24	25,01	01:01	7	7,29
03	7	7,29	03	40	41,67	01:03:03	1	1,04	02:01	12	12,52
04	13	13,54	04	2	2,08	01:04	2	2,08	02:02	2	2,08
07	9	9,37	05	19	19,79	01:05	11	11,46	03:01	6	6,26
08	5	5,21	06	13	13,54	01:06	0	0	04:01	16	16,67
09	3	3,13				01:07	0	0	04:02	14	14,59
10	1	1,04				01:08	1	1,04	05:01	2	2,08
11	8	8,33				01:09	23	23,96	06:01	2	2,08
12	1	1,04				01:10	3	3,13	09:01	1	1,04
13	29	30,21				02:01	26	27,08	10:01	0	0
14	3	3,13				02:02	1	1,04	11:01	1	1,04
15	7	7,29				02:03	0	0	13:01	1	1,04
16	4	4,17				02:04	2	2,08	14:01	4	4,17
						03:01	2	2,08	15:01	0	0
						03:02	0	0	17:01	3	3,13
									18:01	0	0
									21:01	0	0
									23:01	1	1,04
									24:01	0	0
									26:01	0	0
									27:01	0	0
									32:01	1	1,04
									33:01	0	0
									38:01	1	1,04
									39:01	0	0
									40:01	0	0
									41:01	2	2,08
									46:01	0	0
									48:01	2	2,08
									49:01	1	1,04
									55:01	0	0
									56:01	1	1,04
									60:01	1	1,04
									63:01	0	0
									68:01	0	0
									76:01	1	1,04
									77:01	1	1,04
									85:01	1	1,04
									86:01	1	1,04
									89:01	0	0
									94:01	1	1,04
									95_01	2	2,08
									99:01	0	0
									104:01	1	1,04
									105:01	1	1,04
									107:01	1	1,04
									116:01	1	1,04
									119:01	0	0
									121:01	1	1,04
									124:01	3	3,13
Total	96	100	96	100	96	100	100	96	96	100	

IV.2. Frecuencias alélicas (Fa), cálculo del riesgo relativo (RR), frecuencia etiológica (Fe) y frecuencia preventiva (Fp) para los loci DRB1*, DQB1*, DPA1* y DPB1* en asociación con la leucemia linfocítica aguda.

Marcador HLA DRB1*

Al comparar las frecuencias de los alelos HLA-DRB1* en pacientes con leucemia linfocítica aguda e individuos sanos, no se observaron asociaciones positivas o negativas que pudieran determinar la presencia de alelos de protección ni de susceptibilidad asociados a la LLA, como se observa en la Tabla 5.

TABLA 5. Comparación de las frecuencias alélicas (Fa) HLA-DRB1* en pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA) y controles mestizos venezolanos

DRB1*	Controles n=48	Fa %	LLA n=47	Fa %
01	6	6,25	4	4,26
03	7	7,29	4	4,26
04	13	13,54	11	11,7
07	9	9,37	6	6,38
08	5	5,21	9	9,57
09	3	3,13	7	7,45
10	1	1,04	3	3,19
11	8	8,33	13	13,83
12	1	1,04	3	3,19
13	29	30,21	22	23,4
14	3	3,13	6	6,38
15	7	7,29	3	3,19
16	4	4,17	3	3,19
Total	96	100	94	100

Marcador HLA-DQB1*

Los estudios estadísticos demostraron que el alelo DQB1*04 (RR= 5,1; Fe= 0,17, $p \leq 0,05$) resultó asociado positivamente con la LLA y el DQB1*05 (RR= 0,36; FP= 0,25, $p \leq 0,05$) negativamente. Tabla 6.

TABLA 6. Comparación de las frecuencias alélicas (Fa) HLA-DQB1* y cálculo del riesgo relativo (RR), frecuencia etiológica (Fe) y frecuencia preventiva (Fp) en pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA) y controles mestizos venezolanos

DQB1*	Controles n=48	Fa %	LLA n=47	Fa %	RR	Fp	Fe	X ²	p≤
02	22	22,92	19	20,21					
03	40	41,67	44	46,81					
04	2	2,08	10	10,64	5,1		0,17	4,51	0,05
05	19	19,79	9	9,57	0,36	0,25		4,7	0,05
06	13	13,54	12	12,77					
Total	96	100	94	100					

Marcador HLA-DPA1*

Los alelos DPA1*01:07 (RR= 24,1; Fe= 0,19, p≤0,0001), DPA1*01:08 (RR=22; Fe=0,3 p≤0,0001), DPA1* 01:06 (RR 14,87: Fe=0,12, p≤0,01) resultaron asociados positivamente con la LLA. El alelo DPA1*01:09 presentó un RR de 0,04 con una Fp de 0,45(p≤0,0001) y el RR para el alelo DPA1*02:01 fue de 0,22 con una Fp de 0,43 (p≤0,0001) resultando asociados negativamente a la LLA. Tabla 7.

TABLA 7. Comparación de las frecuencias alélicas (Fa) HLA-DPA1* y cálculo del riesgo relativo (RR), frecuencia etiológicas (Fe) y frecuencia preventiva (Fp) en pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA) y controles mestizos venezolanos

DPA1*	Controles n=48	Fa %	LLA n=47	Fa %	RR	Fe	Fp	X ²	p≤
01:03	24	25	20	21,28					
01:03:03	1	1,04	0	0					
01:04	2	2,08	1	1,06					
01:05	11	11,46	16	17,02					
01:06	0	0	6	6,38	14,87	0,12		5,489	0,01
01:07	0	0	9	9,58	24,1	0,19	-	9,26	0,0001
01:08	1	1,04	15	15,96	22	0,3	-	15,08	0,0001
01:09	23	23,96	2	2,13	0,04	-	0,45	23,34	0,0001
01:10	3	3,13	0	0					
02:01	26	27,08	10	10,64	0,22	-	0,43	12,35	0,0001
02:02	1	1,04	8	8,51					
02:03	0	0	1	1,06					
02:04	2	2,08	2	2,13					
03:01	2	2,08	3	3,19					
04:01	0	0	1	1,06					
Total	96	100	94	100					

Marcador HLA-DPB1*

Con respecto al locus DPB1* se encontró una asociación negativa con los alelos DPB1* 02:01 (RR= 0,2; Fp= 0,2, $p \leq 0,01$) y DPB1*03:01 (RR=0,15. Fp= 0,1 y $p \leq 0,0025$). No se observaron asociaciones positivas de este locus y la LLA, indicando la ausencia de marcadores de riesgo para esta enfermedad, ver Tabla 8.

TABLA 8. Comparación de las frecuencias alélicas (Fa) HLA-DPB1* y cálculo del riesgo relativo (RR), frecuencias preventivas (Fp) en pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA) y controles mestizos venezolanos.

DPB1*	Controles n=48	Fa %	LLA n=47	Fa %	RR	Fp	X ²	p≤
01:01	7	7,29	5	5,33				
02:01	12	12,52	3	3,19	0,2	0,2	6,19	0,01
02:02	2	2,08	0	0				
03:01	6	6,26	1	1,06	0,15	0,1	5,41	0,0025
04:01	16	16,67	9	9,58				
04:02	14	14,59	10	10,64				
05:01	2	2,08	0	0				
06:01	2	2,08	1	1,06				
09:01	1	1,04	1	1,06				
10:01	0	0	1	1,06				
11:01	1	1,04	2	2,13				
13:01	1	1,04	1	1,06				
14:01	4	4,17	4	4,26				
16:01	0	0	1	1,06				
17:01	3	3,13	2	2,13				
19:01	0	0	1	1,06				
23:01	1	1,04	0	0				
24:01	0	0	1	1,06				
25:01	0	0	1	1,06				
26:01	0	0	1	1,06				
29:01	0	0	4	4,26				
31:01	0	0	1	1,06				
32:01	1	1,04	1	1,06				
38:01	1	1,04	0	0				
41:01	2	2,08	0	0				
46:01	0	0	2	2,13				
48:01	2	2,08	0	0				
49:01	1	1,04	2	2,13				
51:01	0	0	3	3,19				
52:01	0	0	1	1,06				
56:01	1	1,04	1	1,06				
60:01	1	1,04	3	3,19				
64:1N	0	0	2	2,13				
65:01	0	0	1	1,06				
76:01	1	1,04	0	0				
77:01	1	1,04	1	1,06				
82:01	0	0	3	3,19				
84:01	0	0	1	1,06				
85:01	1	1,04	1	1,06				
86:01	1	1,04	3	3,19				
88:01	0	0	1	1,06				
90:01	0	0	2	2,13				
91:01	0	0	2	2,13				
93:01	0	0	1	1,06				
94:01	1	1,04	0	0				
95:01	2	2,08	0	0				
96:01	0	0	1	1,06				
98:01	0	0	1	1,06				
99:01	0	0	1	1,06				
103:01	0	0	1	1,06				
104:01	1	1,04	0	0				
105:01	1	1,04	4	4,26				
107:01	1	1,04	1	1,06				
109:01	0	0	2	2,13				
116:01	1	1,04	1	1,06				
121:01	1	1,04	0	0				
123:01	0	0	1	1,06				
124:01	3	3,13	0	0				
Total	96	100	94	100				

IV.3. Comparación de haplotipos de pacientes con LLA y controles mestizos venezolanos

En la combinación de haplotipos HLA-DRB1*/DPA1* solo se evidenció una asociación negativa con el haplotipo DRB1*04/DPA1*02:01 (RR=0,09 y $p \leq 0,005$) la cual estuvo presente en nueve individuos mestizos venezolanos y en un solo paciente con leucemia linfocítica aguda.

Varios haplotipos HLA-DPA1*/DPB1* resultaron asociados negativamente con las LLA no observándose ninguna asociación positiva de este haplotipo con la enfermedad, ver Tabla 9.

TABLA 9. Haplotipos HLA-DPA1*/ DPB1* asociados negativamente con LLA

DPA1*/DPB1* Haplotipos	Controles	LLA	RR	X ²	p _≤
01:03 - 04:02	13	1	0,07	12,195	0,0001
01:09 - 02:01	6	0	0,07	7,03	0,01
01:09 - 04:01	6	0	0,07	7,03	0,01
02:01 - 04:02	9	1	0,1	8,15	0,005

LLA: Leucemia Linfocítica Aguda; RR: riesgo relativo, X²= Chi cuadrado corregido

IV.4. Frecuencias alélicas (Fa) para el loci HLA-DRB1* en asociación con la leucemia mieloide crónica (LMC), cálculo del riesgo relativo (RR), frecuencia etiológica (Fe) y frecuencia preventiva (Fp).

Marcador HLA-DRB1*

El alelo DRB1*14 resultó el de mayor frecuencia para la región DRB1* con 23,96 % en pacientes LMC cotejado con un 3,13% en los controles sanos. Esta diferencia arrojó un RR=13,8; Fe=0,44; $p \leq 0,0001$, resultando asociado

positivamente con las LMC, constituyéndose en un alelo de riesgo para esta patología. El alelo DRB1*13 con una frecuencia en pacientes LMC de 17,71%, mostró una asociación negativa, con RR=0,35, Fp=0,39, $p \leq 0,01$ identificándolo como un alelo de protección para la LMC, ver Tabla 10.

TABLA 10. Comparación de las frecuencias alélicas (Fa) HLA-DRB1* y cálculo del riesgo relativo (RR), frecuencia etiológica (fe) y frecuencia preventiva (Fp) en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) y controles mestizos venezolanos.

DRB1*	Controles n=48	Fa %	LMC n=48	Fa %	RR	Fe	Fp	X ²	p≤
01	6	6,25	2	2,08					
03	7	7,29	13	13,54					
04	13	13,54	9	9,37					
07	9	9,37	4	4,17					
08	5	5,21	4	4,17					
09	3	3,13	2	2,08					
10	1	1,04	3	3,13					
11	8	8,33	8	8,33					
12	1	1,04	0	0,00					
13	29	30,21	17	17,71	0,35	-	0,39	6,01	0,01
14	3	3,13	23	23,96	13,8	0,44	-	21,09	0,0001
15	7	7,29	8	8,33					
16	4	4,17	3	3,13					
Total	96	100	96	100					

IV.5. Subtipos HLA-DRB1*14 asociados a LMC

Los resultados de la evaluación de los subtipos HLA-DRB1*14 en ocho pacientes con LMC y cuatro controles sanos, demuestran que el 59,09% de los pacientes con LMC presentan el subtipo HLA-DRB1*14:21, mientras que en los controles mestizos venezolanos los subtipos más frecuentes fueron DRB1*14:22, DRB1*14:34 y DRB1*14:52 con 25% cada uno. Tabla 11

TABLA 11. Subtipos del HLA-DRB1*14 determinados por PCR-SSP de alta resolución (Genovision) en controles mestizos sanos y pacientes con LMC. Las frecuencias se expresan en porcentajes (%.)

Subtipos DRB1*14	Controles (%)	Pacientes LMC (%)
14:62	12,5	0
14:64	12,5	0
14:22	25	9.09
14:34	25	0
14:52	25	0
14:21	0	59.09
14:45	0	4.55
14:26	0	4.55
14:33	0	4.55
14:51	0	9.09
14:35	0	9.09
Total	100%	100%

IV.6. Presencia del cromosoma Philadelphia (Ph) en pacientes con LMC HLA-DRB1*14 positivo y negativo.

Al evaluar los resultados del examen citogenético de trece (13) pacientes con LMC se observó que seis (6) pacientes con LMC presentaron el cromosoma Ph+ y siete (7) resultaron Ph-, tres pacientes DRB1*14 positivos resultaron Ph+ y los otros tres resultaron Ph- seis (6) pacientes Ph- fueron igualmente DRB1*14 negativo, ver Tabla 12.

Tabla 12. Cuadro comparativo de los pacientes con LMC Ph+ y Ph- en relación con la presencia del alelo HLA DRB1*14.

Paciente LMC Ph+/DRB1*14+	Paciente LMC Ph+/DRB1*14-	Paciente Ph-/DRB1*14-	Total Ph+	Total Ph-
3	3	6	6	7

IV.7. Porcentaje de homocigocis HLA-DRB3*/4*/5* en pacientes con LLA y LMC

Los controles HLA-DRB4* mostraron un porcentaje de homocigocis del 54,54%, seguido de los pacientes LLA con 52,38% y los LMC con 42,85%. Los porcentajes de homocigocis para las regiones HLA DRB3*/4*/5* en controles y pacientes LLA y LMC se detallan en la Tabla 13.

Tabla 13. Porcentaje de homocigocis HLA-DRB3*/4*/5* en pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA) y leucemia mieloide crónica (LMC)

HLA-DRB	n	Controles %	n	LLA %	n	LMC %
DRB5* (51)	4	18,8	4	19,04	4	19,04
DRB3* (52)	6	27,2	6	28,57	8	38,09
DRB4* (53)	12	54,54	11	52,38	9	42,85

IV.8. Frecuencias alélicas para el locus HLA-DQB1*, cálculo del riesgo relativo (RR), frecuencia etiológica (Fe) y frecuencia preventiva (Fp).

Marcador HLA-DQB1*

Se pudo observar una asociación negativa del alelo DQB1*02 y la LMC constituyendo un alelo de protección, ver Tabla 14.

TABLA 14. Comparación de las frecuencias alélicas (Fa) HLA-DQB1* y cálculos del riesgo relativo (RR), frecuencia etiológica (Fe) y frecuencia preventiva (Fp) en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) y controles mestizos venezolanos

DQB1*	Controles n=48	Fa %	LMC n=48	Fa %	RR	Fp	X ²	p≤
01	0	0	1	1,04				
02	22	22,34	12	12,5	0,39	0,28	4.554	0,025
03	40	41,49	50	52,08				
04	2	6,38	8	8,33				
05	19	17,02	15	15,62				
06	13	12,77	10	10,42				
Total	96	100	96	100				

IV.9.Frecuencias alélicas para los loci HLA-DPA1* y HLA-DPB1*, en asociación con la leucemia mieloide crónica (LMC), cálculo del riesgo relativo (RR), frecuencia etiológica (Fe) y frecuencia preventiva (Fp)

Marcador HLA-DPA1*

Al comparar la frecuencia de alelos entre los controles con los pacientes LMC se encontró una asociación positiva del HLA-DPA1*01:03 con (RR=8,6; Fe= 0,79; $p \leq 0,0001$) y el HLA-DPA1* 02:01 (RR de 3,66 y una Fe de 0,58; $p \leq 0,001$). Los alelos DPA1*01:05 con un (RR de 0,03 y la Fp de 0,24 $p \leq 0,0001$) y el DPA1*01:09 con un (RR de 0,01, Fp de 0,49 y $p \leq 0,0001$), mostraron una asociación negativa. Tabla15.

TABLA 15. Comparación de las frecuencias alélicas (Fa) HLA-DPA1* y cálculo del riesgo relativo (RR), frecuencia etiológica (fe) y frecuencia preventiva (Fp) en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) y controles mestizos venezolanos.

DPA1*	Controles n=48	Fa %	LMC n=48	Fa %	RR	Fe	Fp	X ²	p≤
01:03	24	25	43	44,79	8,6	0,79	-	17,83	0,0001
01:03:03	1	1,04	1	1,04					
01:05	11	11,46	0	0	0,03	-	0,24	11,52	0,0001
01:04	2	2,08	1	1,04					
01:06	0	0	5	5,21					
01:07	0	0	0	0					
01:08	1	1,04	0	0					
01:09	23	23,96	0	0	0,01	-	0,49	29,38	0,0001
01:10	3	3,13	0	0					
02:01	26	27,08	39	40,63	3,66	0,58	-	8,05	0,001
02:02	1	1,04	2	2,08					
02:03	0	0	0	0					
02:04	2	2,08	2	2,08					
03:01	2	2,08	2	2,08					
03:02	0	0	0	0					
04:01	0	0	1	1,04					
Total	96	100	96	100					

Marcador HLA-DPB1*

En la región DPB1* no se observó asociación positiva ni negativa con la LMC. Tabla 16.

TABLA 16. Frecuencias de los alelos HLA-DPB1* en paciente LMC y controles mestizos venezolanos.

DPB1*	Controles n=48	Fa %	LMC n=48	Fa %
01:01	7	7,29	8	8,33
02:01	12	12,52	9	9,38
02:02	2	2,08	1	1,04
03:01	6	6,26	6	6,26
04:01	16	16,67	16	16,67
04:02	14	14,59	11	11,46
05:01	2	2,08	0	0
06:01	2	2,08	0	0
09:01	1	1,04	0	0
10:01	0	0	2	2,08
11:01	1	1,04	2	2,08
13:01	1	1,04	2	2,08
14:01	4	4,17	4	4,17
15:01	0	0	1	1,04
17:01	3	3,13	2	2,08
18:01	0	0	1	1,04
21:01	0	0	1	1,04
23:01	1	1,04	0	0
24:01	0	0	2	2,08
26:01	0	0	1	1,04
27:01	0	0	3	3,13
32:01	1	1,04	0	0
33:01	0	0	1	1,04
38:01	1	1,04	0	0
39:01	0	0	1	1,04
40:01	0	0	1	1,04
41:01	2	2,08	0	0
46:01	0	0	2	2,08
48:01	2	2,08	0	0
49:01	1	1,04	2	2,08
55:01	0	0	1	1,04
56:01	1	1,04	1	1,04
60:01	1	1,04	0	0
63:01	0	0	2	2,08
68:01	0	0	1	1,04
76:01	1	1,04	1	1,04
77:01	1	1,04	0	0
85:01	1	1,04	0	0
86:01	1	1,04	1	1,04
89:01	0	0	1	1,04
94:01	1	1,04	0	0
95:01	2	2,08	1	1,04
99:01	0	0	5	5,21
104:01	1	1,04	0	0
105:01	1	1,04	0	0
107:01	1	1,04	0	0
116:01	1	1,04	0	0
119:01	0	0	2	2,08
121:01	1	1,04	1	1,04
124:01	3	3,13	0	0
Total	96	100	96	100

IV.10. Genotipos HLA-DPA1* en pacientes con LLA y LMC.

El genotipo HLA-DPA1*01:03:01-01:03:02/02:01:01-02:02:06 presentó frecuencias significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en el los controles (40,4 %) comparado con los pacientes LLA (8,5%) y los pacientes LMC (64,6%) entre otras notables variaciones.

Los genotipos DPA1*01:05/01:08 (RR = 13,8; $p \leq 0,005$) y DPA1*01:05/01:08 (RR = 13,8; $p \leq 0,005$) mostraron asociaciones positivas con la LLA, resultando el genotipo DPA1*01:03:01-01:03:02/02:01:01-02:01:06 (RR = 0,137; $p \leq 0,05$) asociado negativamente. En los pacientes con LMC los genotipos DPA1* 01:03:01-01:03:02/*01:05 (RR = 0,085; $p \leq 0,05$) y DPA1*01:03:01-01:03:02/*02:01:01-02:01:06 (RR = 2,692; $p \leq 0,05$) mostraron asociaciones positivas, ver Tabla 17.

Tabla 17. Distribución de genotipos HLA-DPA1*/100 en pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA) y leucemia mieloide crónica (LMC)

DPA1*genotipos	Controles	Pacientes	
		LLA (n = 48)	LMC (n=48)
01:03:01-01:03:02/01:03:01-01:03:02	4,3	8,5	6,3
01:03:01-01:03:02/01:05	10,6	8,5	0*
01:03:01-01:03:02/01:06	0	0	6,3
01:03:01-01:03:02/02:01:01-02:02:06	40,4	8,5*	64,6
01:03:01-01:03:02/02:02:01-02:02:03	4,3	6,4	2,08
01:03:01-01:03:02/02:03	2,12	0	0
01:03:01-01:03:02/02:04	0	0	2,08
01:03:01-01:03:02/03:01	2,12	2,12	2,08
01:03:01-01:03:02/04:01	4,3	0	0
01:03:03/01:08	2,12	0	0
01:03:03-02:01:01/02:01:06	0	0	2,08
01:04/01:04	2,12	0	0
01:04/02:03 0 2,12 0	0	2,12	0
01:04/02:04	0	0	2,08
01:05/01:07	0	2,12	0
01:05/01:08	0	12,8	* 0
01:05/02:02:01-02:02:03	0	2,12	0
01:06/01:05	0	8,5	0
01:06/01:06	0	0	2,08
01:07/01:08	2,12	8,5	0
01:07/02:01:01-02:02:03	0	6,4	0
01:07/04:01	0	2,12	0
01:08/01:06	0	4,3	0
01:08/03:01	0	2,12	0
01:08/03:02	4,3	0	0
01:08/04:01	4,2	0	0
01:09/01:03:01-01:03:02	2,12	0	0
01:09/01:08	0	4,3	0
01:09/01:09	2,12	0	0
02:01:01-02:01:06/02:01:01-02:01:06	6,4	4,3	6,2
02:01:01-02:01:06/02:02:01-02:02:03	0	0	2,08
02:02:01-02:02:06/03:01	2,12	0	0
02:04/02:01:01-02:01:06	2,12	4,2	0
03:01/01:08	2,12	0	0
03:01/02:02:01-02:02:03	0	2,12	0
03:01/04:01	0	0	2,08
Total	100	100	100

LLA: DPA1*01:05/01:08 (RR = 13,8; p ≤ 0,005); LLA: DPA1*01:05/01:08 (RR = 13,8; p ≤ 0,005); DPA1*01:03:01-01:03:02/02:01:01-02:01:06 (RR = 0,137; p ≤ 0,05). LMC: DPA1* 01:03:01-01:03:02/*01:05 (RR = 0,08; p ≤ 0,05); DPA1*01:03:01-01:03:02/*02:01:01-02:01:06 (RR = 2,69; p ≤ 0,05).

IV.11. Comparación de los haplotipos DRB1*/DPA1* y DPA1*/DPB1* de pacientes con LMC y controles mestizos venezolanos.

Haplotipos DRB1*/DPA1*

Los resultados de la comparación de los haplotipos DRB1*/DPA1* demuestran que existen por lo menos dos asociaciones positivas de estos haplotipos con las LMC, ver Tabla 18.

TABLA 18. Comparación de haplotipos DRB1*/ DPA1* en pacientes con LMC y controles de mestizos venezolanos

Haplotipos DRB1*/DPA1*	Controles	LMC	RR	X ²	p≤
14 / 01:03	3	23	12,6	18,287	0,0005
15 / 01:03	1	7	13	6,3	0,025

RR= riesgo relativo

Haplotipos DPA1*/DPB1*

El haplotipo DPA1*01:03/DPB1*04:01 (RR=3,26, p≤4,85) resultó de riesgo para la LMC. Otros dos haplotipos DPA1*/DPB1* mostraron asociación negativa con las estas leucemias, ver Tabla 19.

TABLA 19. Comparación de haplotipos DPA1* / DPB1* en pacientes con LMC y controles de mestizos venezolanos.

Haplotipos DPA1*/DPB1*	Controles	LMC	RR	X ²	p≤
01:03 - 04:01	5	16	3,26	4,85	0,05
01:09 - 02:01	6	0	0,07	7,046	0,01
01:09 - 04:01	6	0	0,07	7,046	0,01

RR= riesgo relativo

IV.12. Evaluación de la respuesta humoral y celular de los pacientes leucémicos frente a diferentes dianas (adenovirales, celulares o posibles secuencias peptídicas) que pudieran estar relacionadas con la asociación HLA-DRB1*14 - LMC.

IV.12.1. Respuesta humoral de los controles y pacientes leucémicos frente al adenovirus.

Del grupo de individuos sanos el 80% (4/5) resultó positivo a IgM. Los pacientes con LLA mostraron un 90% (9/10) positivos para IgM, mientras que de los pacientes con LMC solo el 37,5% (3/8) fueron positivos a IgM. No obstante uno de los pacientes con LMC negativo para IgM también fue positivo para IgG, ver Tabla 20.

TABLA 20. Resultados de la serología del plasma de controles, pacientes LLA y pacientes LMC, IgM e IgG frente al adenovirus utilizando ELISA Indirecto. La tipificación HLA-DRB1* se especifica solamente en los grupos controles y pacientes LMC.

Control	HLA DRB1	IgM	IgG	Grupo LLA	IgM	IgG	Grupo LMC	HLA DRB1	IgM	IgG
1	11-07	+	ND	1	+	ND	1	07-14	+	ND
2	07-03	+	ND	2	+	ND	2	13-14	-	+
3	13-14	+	ND	3	+	ND	3	14-04	-	-
4	13-15	+	ND	4	+	ND	4	14-04	-	-
5	08-11	-	-	5	+	ND	5	13-14	-	-
				6	+	ND	6	16-03	-	-
				7	+	ND	7	16-03	+	ND
				8	-	-	8	13-07	+	ND
				9	+	ND				
				10	+	ND				

IV.12.2. Respuesta celular de los pacientes con LMC en cultivo mixto

En la Tabla 21, se puede observar los porcentajes de positividad CD3, CD4, CD8 y los índices CD4/CD8, a tiempo 0 (T0) y 48 horas más tarde (T48), obtenidas de los linfocitos de controles y pacientes LMC, estimulados en cultivo mixto con linfocitos mitomizados (estimulantes). Solamente el paciente con LMC tipificado HLA-DRB1*14-04, enfrentado al control sano, igualmente tipificado HLA-DRB1*14-13 mostró un incremento de las células TCD8+, el cual pasó de 5,54% a T0, a 18,9% a T48. Igualmente, el índice CD4/CD8 en ese cultivo, disminuyó de 6,95 a 1,52.

Otro paciente LMC tipificado HLA-DRB1*14-13, se encontraba en estado blástico al momento de la toma de la muestra y no fue incluido en el cultivo. Sin embargo, al examen citofluorométrico mostró 25% de células marcadas con el CD4 y 41,3% marcadas con el CD8, y un índice CD4/CD8 de 0,61, totalmente diferente al observado en controles.

TABLA 21. Porcentaje de positividad en citofluorometría para los marcadores linfocitarios CD3, CD4, CD8 e índices CD4/CD8 de controles y un paciente LMC en cultivo mixto de linfocitos frente a dianas HLA-DRB1* y citometría de flujo en pacientes con LMC y controles sanos

Cultivo Marcador	1-3M/T0	2-3M/T0	1-3M/T48	2-3M/T48
CD3	38,2	44,6	ND	ND
CD4	28,5	38,5	26,1	28,8
CD8	6,58	5,54	6,76	18,9
CD4/CD8	4,3	6,95	3,86	1,52

1 = Control DRB1*08-11

2 = Paciente LMC DRB1*14-13

3M = Control DRB1*14-04 tratado con mitomicina (Estimulante)

T0 = Tiempo de 0 horas

T48= Tiempo de 48 horas.

Los índices CD4/CD8 fueron expresados en valores absolutos.

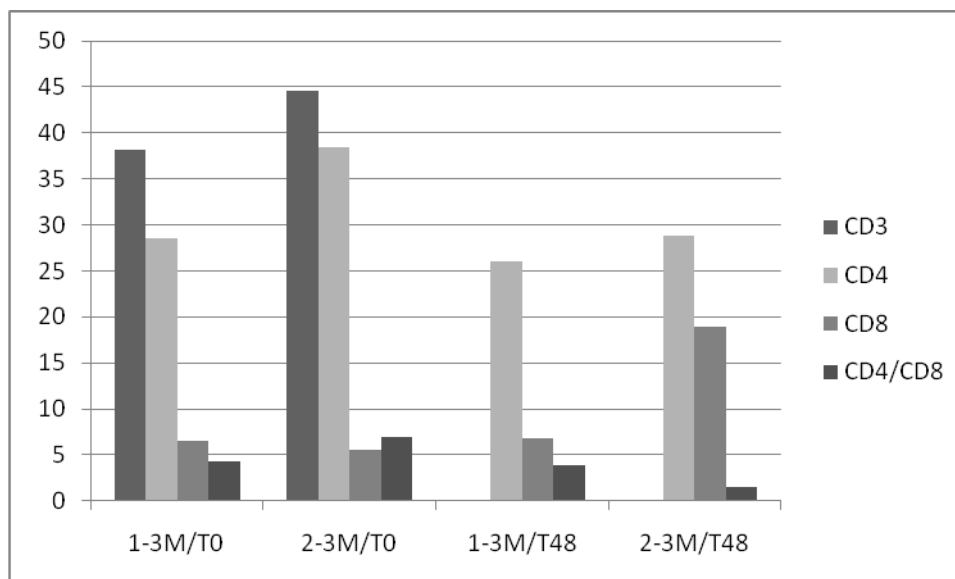


Figura 13. Representación gráfica de los porcentajes de marcadores CD3, CD4 y CD8 por citofluorometría de flujo de linfocitos estimulados en cultivo mixto linfocitario de 1: Control HLA-DRB1*08-11, 2: Paciente LMC HLA-DRB1*14-04, 3M: Control HLA-DRB1*13-14 tratado con mitomicina (estimulante), T0: Valores al inicio del cultivo mixto, T48: Valores a 48 horas del cultivo mixto, ND: Valor no determinado

IV.12.3. Curva dosis respuesta de la estimulación linfocitaria frente al péptido de secuencia LLERRRA del adenovirus:

Los linfocitos de dos individuos controles sanos, uno positivo y otro negativo serológicamente al adenovirus se enfrentaron en cultivo linfocitario durante 5 días (120 horas) al péptido de secuencia LLERRRA del adenovirus o albúmina sérica humana (SAH), en concentraciones de 0, 5, 25 y 50 $\mu\text{g/ml}$. La estimulación medida por Densidad Óptica, posterior a la inclusión de la 5- Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) durante 24 horas, mostró una proliferación linfocitaria mayor en presencia del péptido LLERRRA del adenovirus a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$. Como control de estimulación se utilizó la Fitohemaglutinina (PHA Sigma) a concentración recomendada, ver figura 14.

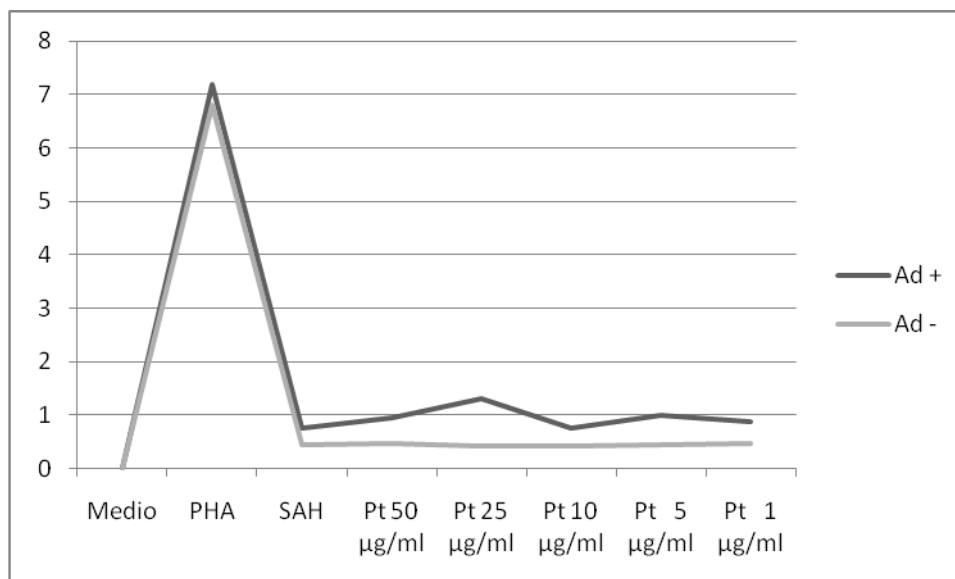


Figura 14. Representación gráfica de la citometría de flujo del cultivo mixto linfocitario de individuos controles sanos positivo y negativo respectivamente, a la serología IgM de adenovirus, enfrentados a la fitohemaglutinina (PHA), albúmina sérica humana (SAH) y concentraciones ascendentes del péptido de secuencia LLERRRA del adenovirus (Pt: rango 1-50 µg/ml).

IV.12.4. Citofluorimetría de flujo de los marcadores linfocitarios CD3, CD4 y CD8 de linfocitos de controles y pacientes LMC, cultivados en presencia del péptido de secuencia LLERRRA de adenovirus:

Los estudios por citometría de flujo de los marcadores CD3, CD4 y CD8 de las suspensiones linfocitarias de controles y pacientes sometidos a la estimulación con el péptido viral secuencia LLERRRA de adenovirus en cultivo de 120 horas, permitieron observar un aumento moderado del porcentaje celular de los cultivos estimulados con el péptido viral con respecto a la estimulación con SAH de linfocitos de un control 1, individuo sano HLA DRB1*08-11, IgG e IgM adenovirus negativo; un control 2, individuo sano HLA DRB1*14-13, IgM adenovirus positivo; un paciente 1, individuo con LMC HLA DRB1*16-03, IgM e IgG adenovirus negativo y un paciente 2, individuo con LMC HLA DRB1*14-04, IgG e IgM adenovirus negativo. El porcentaje de CD3+ aumento en ambos controles; de 49% pasó a 64% para el control 1 y de 31% a 57% para el control 2. Para los pacientes, el aumento fue de 46% a 80% para el paciente 1 y de un 34% a 57% para el paciente 2. En cuanto al marcador CD8, los controles 1 y 2 se mostraron levemente disminuidos; para el control 1 los porcentajes variaron de

18% a 16,7% y para el control 2 esta variación fue de 10% a 9%. En los pacientes 1 y 2, el marcador CD8 aumento de 17% a 24% en P1 y de 8% a 14% en P2. La mayor proliferación se observó en la población CD4 tanto para los controles como para los pacientes. El aumento fue del 25% al 42% para el control 1, de 17% a 48% en el control 2, de 23% a 55% en el paciente 1 y de 19 a 42% en el paciente 2. El marcador CD32 mostró un 80% de estimulación en el paciente 1 frente a la estimulación con el péptido adenoviral superior al paciente 2 y al resto de los controles, ver figura 15.

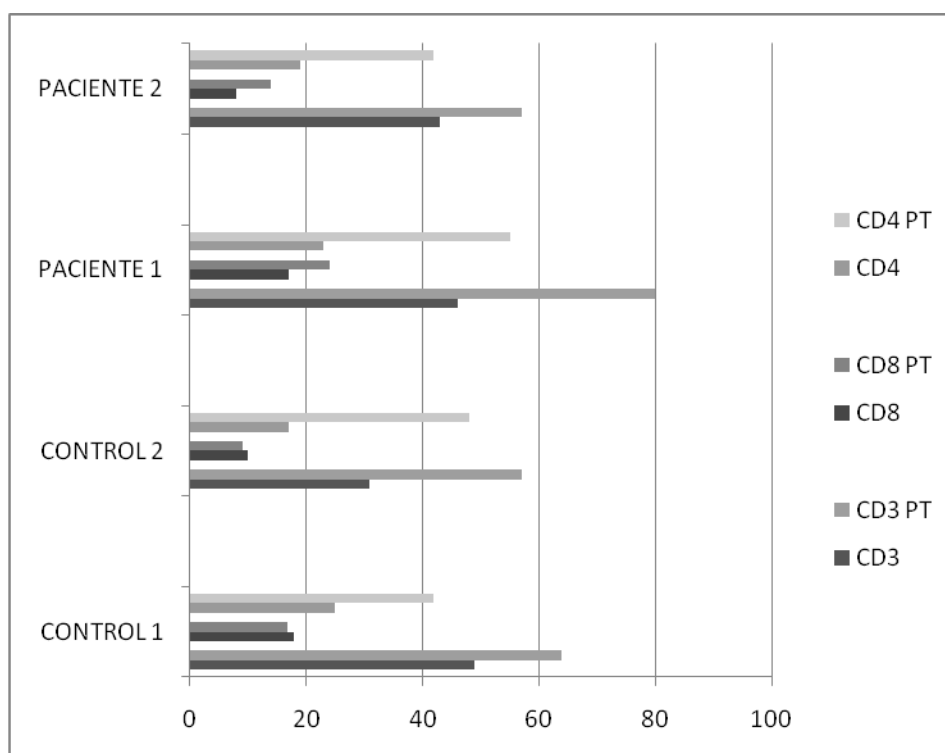


Figura 15. Representación gráfica de la citometría de flujo de cultivo linfocitario de controles y paciente LMC estimulados con el péptido viral de secuencia LLERRRA del adenovirus. Las columnas marcadas con "pt" representan la estimulación frente al péptido. Los resultados se expresan en porcentajes para cada uno de los marcadores CD3, CD4 y CD8 medidos en citometría de flujo.

- Control 1: HLA DRB1*08-11, IgG e IgM adenovirus negativo
- Control 2: HLA DRB1*14-13, IgM adenovirus positivo
- Paciente 1: LMC HLA DRB1*16-03, IgM e IgG adenovirus negativo
- Paciente 2: LMC HLA DRB1*14-04, IgG e IgM adenovirus negativo

V. DISCUSIÓN

Sustentado en el estudio de las frecuencias de los alelos HLA clase II (HLA-DRB1*, HLA-DQB1*, HLA-DPA1* y HLA-DPB1* de la población zuliana de tres generaciones se pudo determinar el carácter mestizo de la misma, producto de la contribución de alelos amerindios, negroides, caucasoides y asiáticos que conforman dicha población y que semejan a la distribución alélica de la población venezolana en general puesto que, según publicaciones previas no existen diferencias significativas con la población del estado Zulia. El estudio comparativo ampliado de esta población con los pacientes leucémicos permitió establecer o corroborar una serie de asociaciones positivas y negativas exclusivas de los pacientes LLA y LMC zulianos y otras que confirman resultados semejantes reportados por diversos autores alrededor del mundo. Centramos la atención en esta discusión sobre la posible implicación de la asociación positiva HLA-DRB1*14 y la patogénesis de la LMC animados por los reportes del mimetismo de ciertos virus oncogénicos y en especial del adenovirus con varias secuencias representadas por subtipos del DRB1*14, probablemente implicadas en respuestas inmunitarias desencadenantes del cuadro leucémico, debatiendo entre los postulados de falta de respuesta o respuesta autoinmunitaria frente a estos estímulos que finalmente pudieran dar luces sobre la posible implicación de la asociación HLA y las leucemias.

V.1. Alelos HLA en la población mestiza venezolana sana.

La tipificación de las moléculas HLA de clase II en la población venezolana, revela en su constitución genética la presencia de los alelos DRB1*13, DRB1*04 y DRB1*07 como los de mayor frecuencia, mientras que para el locus DQB1*, los de mayor frecuencia fueron los alelos *03 y *02. Estos alelos también se han reportado en las poblaciones caucásicas, negra e indígenas (Vicario et al.1996, Louzada et al., 2001, Echeverría et al., 2008), revelando la contribución de los genes de estos diversos grupos étnicos en la conformación genética de esta población.

No existen diferencias significativas entre la población venezolana, la caucásica de Madrid y la negra de Sao Paulo como se demostró en estudios

previos (Vicario et al., 1996; Louzada et al., 2001). Es relevante en los venezolanos la elevada presencia del alelo DRB1*13, mientras que en las poblaciones indígenas venezolanas como los Wayúu está disminuido y ausente en los Yucpa, Barí y Warao.

Los alelos DRB1*04, DRB1*08, DRB1*14 y DRB1*16 lo comparten todas las poblaciones. No obstante se puede observar que el alelo DRB1*14 está presente con baja frecuencia en la mayoría de las poblaciones, excepto en los Warao donde se encuentra elevado mostrando una frecuencia de 29,5%, al igual que en otras poblaciones amerindias del continente (Olivo et al., 1996). De igual manera el alelo DRB1*04 con una frecuencia de 11,7% en la población venezolana, se puede observar presente en las poblaciones caucásica y negra con una frecuencias de 12,75% y 5.4% respectivamente a diferencia de las poblaciones Wayúu con un 62% (Echeverría et al., 2008), Yucpa 74% (Layrisse et al., 2001), Bari 55% (Layrisse et al., 1995) y Warao 16% (Olivo et al., 1996), en las cuales este alelo muestra una frecuencia aumentada con respecto a la población venezolana, frecuencias que son testigos de su contribución al mestizaje de la población venezolana.

El alelo DRB1*07 muestra una frecuencia del 9.38% en la población venezolana semejante a las frecuencias observadas en las poblaciones caucásicas y negras, muy reducida en Wayúu y el resto de las poblaciones indígenas venezolanas (Yucpa, Bari y Warao).

En el locus DQB1 se observa que no hay diferencias significativas entre las frecuencias mostradas por la población venezolana y los caucásicos de Madrid a diferencia los negros e indígenas Wayúu, Barí, Yucpa y Warao. El alelo DQB1*03 es el más elevado en la población venezolana, también se encontró presente con una frecuencia alta en las poblaciones Wayúu, Yucpa, Bari y Warao y en menor proporción en la caucásicas y negras. No se observaron diferencias significativas de los alelos DQB1* 02, DQB1* 05, y DQB1*06 en la población venezolana con los mismos alelos en caucásicos y negros; pero sí con los Yucpa, Barí y Warao donde están ausentes y disminuidos en los Wayúu.

De acuerdo al grado de mezclas puede decir que la población indígena Wayúu contribuye a conformar la población mestiza venezolana en un 33,70%; de igual manera, se puede reflejar que la presencia de genes negros en esta población sigue siendo la más alta en su proporción genética con un grado de mezcla de 42,77%, mantenida en el tiempo, si comparamos con los estudios serológicos HLA- A, B, C, DR y DQ realizados años atrás, cuando el grado de mezcla con la población negra se ubicó en 49,22% (Rivera et al., 1998). El aporte de la población caucásica también se mantienen en 23.49%, muy similar (27%) al reportado por serología en estudios previos (Rivera et al., 1998). Es decir; que los venezolanos han conservado su acervo genético original, lo que implica que la confluencia de genes producto de la mezcla se ha mantenido.

Es importante destacar que las poblaciones indígenas Yucpa, Barí y Warao no presentan el alelo HLA-DRB*13 (Layrisse et al., 1995; Layrisse et al., 2001; Olivo et al., 1996), sin embargo los Wayúu sí lo poseen, aunque en bajas proporciones debido a que precisamente estos indígenas no constituyen una población cerrada, sino que por el contrario, conviven cotidianamente con el resto de la población venezolana, produciendo un intercambio de flujo de genes entre ambas poblaciones.

Con referencia a los alelos del locus DPA1*, se pudo observar que la mayor frecuencia en la población estudiada resultó ser la de los alelos *02:01 y *01:03. Para la región DPB1*, el alelo *04:01 fue el de mayor proporción, coincidiendo estos resultados con los reportados en una población Vasca de España (Pérez-Miranda et al 2004) y concuerdan con los alelos que predominan en poblaciones caucasoides (Al-DaccaK et al. 1991). Aunque los Amerindios muestran un número limitado de alelos DPB1*; no obstante llama poderosamente la atención que el alelo HLA-DPB1*04:02 está presente en la mayoría de los indígenas venezolanos (Barí, Yucpa, Warao y otros) (Olivo et al 1996) y que también se encuentra en alta proporción en la población venezolana.

Considerando la contribución de cada una de las poblaciones: caucasoides, negroides e indígena Wayúu, como fundadoras de la población venezolana y no habiéndose encontrado diferencias significativas entre los alelos de la región

clase II de la población venezolana (Vicario et al., 1996; Louzada et al., 2001; Echeverría et al., 2008), se determinó que en adelante se definirá la población control como **mestiza venezolana**.

Estos hallazgos tienen profundas implicaciones en los estudios de asociación de enfermedad genéticas en poblaciones mestizas sanas de Venezuela. Debido al alto polimorfismo génico alcanzado, producto del poligenismo aportado por la mezcla con los diversos grupos étnicos que refuerza el estatus general de protección frente al ataque de diversos patógenos. Los mestizos venezolanos se ubican en una situación más favorable que la de las poblaciones indígenas de la región. Esta última población no presenta esa amplia variabilidad genética que les permita el reconocimiento y defensa ante los microorganismos propios de la región, haciéndolos más susceptibles al padecimiento de esas enfermedades. En este contexto, el hallazgo de asociaciones positivas o negativas con enfermedades en la población venezolana cobra un enorme valor por la gran diversidad genética existente en las poblaciones mestizas.

V.2. Asociación de los alelos HLA con LLA

Al estudiar los alelos de histocompatibilidad clase II DRB1* en los pacientes con LLA y compararlos con los controles de mestizos sanos, no se observaron asociaciones positivas o negativas que pudieran determinar la presencia de alelos de protección ni de susceptibilidad asociados a la LLA en esta región.

Al analizar la región DQB1* se encontró una asociación positiva con el alelo DQB1*04 y una asociación negativa con el alelo DQB1*05. Estos resultados difieren de lo reportado por otros autores quienes señalan al DQB1*05:01 como un alelo de susceptibilidad para la LLA y aún más como un fenotipo patogénico que tiene una participación importante en el proceso inmunológico de esa enfermedad tanto en niños como en adultos (Dearden S.T. et al. 1996 y Orouji et al., 2012). La evaluación de los subtipos del DQB1* en estas poblaciones podría

arrojar resultados más concluyentes sobre las asociaciones de esta región con las LLA.

No se encontraron diferencias significativa entre la homocigocis observada en pacientes LLA y los controles para los marcadores genéticos DRB3*/DRB4*/DRB5*. Sin embargo, la homocigocis del alelo DRB4* (DR53) representa el mayor porcentaje en controles y pacientes LLA en comparación con los pacientes LMC. De acuerdo a los datos publicados por otros autores, la homocigocis del alelo DRB4* (DR53) constituye un alelo de riesgo para la LLA especialmente en la población infantil de varones con LLA. (Dorak et al., 2002).

En el locus DPA1*, los alelos DPA1*01:07, DPA1*01:08 y DPA1*01:06 se mostraron como alelos de riesgo para la LLA en esa población de estudio. Por el contrario, los alelos DPA1*01:09 y el DPA1*02:01 reflejan una asociación negativa que actuarían como protección en este grupo, frente a esta patología. Pocos resultados de asociación HLA-DPA1* y leucemias han sido reportados por la literatura. Las diferencias observadas en el presente estudio comparado con reportes de asociaciones HLA-DP con las LLA, podrían estar relacionadas con las diferentes técnicas utilizadas en ambas investigaciones, aunado también, a las diferencias poblacionales. El HLA-DPw1 ha sido asociado con resistencia en LLA, mientras que los HLA-DPw2 y DPw5 se reportan incrementados en los pacientes con LLA (De Jongh et al., 1984). La asociación negativa entre el haplotipo DRB1*04/DPA1*02:01 en pacientes con LLA refuerza su condición de haplotipo protector para esta enfermedad sin que hasta el momento se hayan encontrado reportes que permitan cotejar estos resultados.

El genotipo HLA-DPA1*01:03:01-01:03:02/02:01:01-02:02:06 presentó frecuencias significativamente diferentes ($p \geq 0,05$) en los controles (40,4%) comparado con los pacientes LLA (8,5%) y los pacientes LMC (64,6%), entre otras notables variaciones mostrando un patrón de distribución muy elevado en los pacientes LMC sobre todo en comparación con los pacientes LLA, según datos recientemente reportados por Echeverría et al., (2010). Las marcadas discrepancias en la distribución de las frecuencias de los alelos y genotipos DPA1* en pacientes con LLA y el escaso polimorfismo mostrado por la región

DPA1* en pacientes LMC probablemente revelan diferencias notables en la patogenia de ambos tipos de leucemia. (Echeverría et al., 2010)

En el presente estudio no se evidenciaron alelos de la región HLA-DPB1* asociados positiva o negativamente con las leucemias. Sin embargo, **Taylor et al. (2002)** señalan una asociación positiva con el alelo DPB1*02:01 y la LLA común y LLA-T; pero no con LLA-B ni la LLA, indicando que la susceptibilidad en niños con LLA común, pudiera ser influenciada por antígenos codificados por DPB1*02:01 y otros alelos DPB1*. En esta serie de pacientes leucémicos, los haplotipos DPA1*01:03/ DPB1*04:02 y DPA1* 01:09/ DPB1*02:01 resultaron asociados negativamente con las LLA.

En líneas generales, los hallazgos de asociaciones positiva y negativas de los alelos clase II y las LLA indican que estos pacientes, en la población mestiza venezolana adolecen de un gran número de alelos DRB1*, DQB1*, DPA1* y DPB1* imprescindibles, necesarios para completar de manera exitosa una efectiva presentación antigénica de un posible agente causal.

V.3. Asociación de los alelos HLA con LMC

En referencia a la LMC, los resultados indican que el alelo DRB1*13 presenta una asociación negativa con la LMC coincidiendo con lo reportado previamente por **Dorak M.T. et al. (2002)**. El alelo HLA-DRB1*13 puede considerarse un marcador de resistencia a leucogénesis, por lo tanto de protección para LMC. Mientras que el alelo DRB1*14 resultó de riesgo para esta enfermedad, confirmando la asociación positiva reportada previamente en mestizos mexicanos (**Rosas-Cabral et al, 2003**). Es importante resaltar que los alelos DRB1*13 y DRB1*14, observados como alelos de protección y riesgo respectivamente para las leucemias, formaban parte o estaban incluidos en el antiguamente definido HLA-DRw6 (**Dorak et al., 1996 y 1999**). Es posible que la presión de selección frente a este alelo diera paso al establecimiento del DRB1*13 en la población sana el cual se muestra como alelo de protección en varios reportes de HLA y leucemias. Así individuos portadores de ciertos alelos HLA capaces de unirse a péptidos derivados de los transcritos de fusión *bcr-abl* presentarían una ventaja biológica cierta para enfrentar esta enfermedad en

comparación con aquellos individuos que carecen de estos alelos. El alelo HLA-DRB1*14 puede considerarse en la serie LMC como un gen de susceptibilidad a la leucogénesis.

Los subtipos DRB1*14:21, 14:26, 14:33, 14:35, 14:45 y 14:51 presentes en esta serie de pacientes LMC DRB1*14, difieren radicalmente de los subtipos DRB1*14:22, 14:34, 14:52, 14:62 y 14:64 que identifican los controles. Solo el DRB1*14:22 es compartido por ambas poblaciones pero en proporciones muy desiguales 25% controles, 9% pacientes LMC. Dos de los asociados positivos (DRB1*14:26 y el 14:35) fueron reportados como portadores de mimetismo molecular en pacientes LMC. Esta observación es de particular interés debido al mimetismo mostrado por varios virus oncogénicos para el epítipo HVR3 del DR53 el cual se extiende a los alelos DRB1*01, DRB1*10 y DRB1*14 (**Dorak et al., 1994 y Schlehofer y et al., 1996**). En este caso en particular, interesa el mimetismo molecular entre el adenovirus y los subtipos del alelo DRB1*14 (14:01, 14:07, 14:08, 14:10, 14:11, 14:14, 14:18, 14:23, 14:26, 14:28, 14:31, 14:32, 14:34, 14:35, 14:36, 14:38 y 14:39), los cuales presentan el mismo cambio de posición observado en el aminoácido del epítipo DR53 (**Matsuoka et al., 1995 y Dorak et al., 1996**). Este segmento mimetizado ha sido identificado como un poli péptido de 7 aminoácidos de secuencia LLERRRA de acuerdo a trabajos realizados por **MT Dorak y Matsuoka en 1996**. El alelo HLA-DRB1*14 pudiera ser el blanco de células T citotóxicas generando reacciones autoinmunes implicadas en el desarrollo de las leucemias (**Tevfik Dorak, 1969**).

En pacientes con LMC de Turquía se reportó una asociación negativa del DRB1*11 con la LMC. Igualmente se publicó la homocigocis DRB4* como marcador de riesgo y la DRB3* de protección en la LMC (**Oguz et al.,**). En esta serie de pacientes LMC en estudio, a pesar de no haberse encontrado asociación con la homocigocis DRB4*, el mayor porcentaje de homocigocis se observó en controles y pacientes LMC a diferencia de lo encontrado en los paciente LLA.

En general, los antígenos exógenos son procesados y presentados por moléculas clase II a las células TCD4+. Por otra parte, péptidos endógenos resultados del clivaje de proteínas que son transferidas por las proteínas de

transporte asociados a retículo endoplasmático se unen a moléculas de clase I y los complejos resultantes son transportados a la superficie celular para ser reconocidos por linfocitos T CD8+. Se ha demostrado sin embargo, que los antígenos endógenos pueden ser procesados tanto por moléculas clase I como por clase II. (Nuchtern et al., 1990; Weiss et al 1996; Mainati et al 1992). Se han estudiado asociaciones HLA con diferentes tipos de transcriptos bcr-abl. Dicha asociación pudiera predecir la presentación de péptidos bcr-abl por algunas moléculas HLA en particular. Los resultados muestran asociaciones negativas con ($p < 0.05$) con HLA-A*02 (b2a2, e1a2), -A*68 (b2a2, b3a2, e1a2), -B*14 (b2a2, b3a2, e1a2), -B*15 (b2a2, b3a2), -B*40 (b2a2), -DQB1*03:03 (b2a2, b3a2), -DQB1*06:03 (b2a2), -DRB1*04:01 (e1a2), -DRB1*07:01 (b3a2), and -DRB1*11:01(b2a2) lo cual sugiere que estos alelos de clase I y clase II, juegan un papel primordial en la presentación de péptidos derivados de la proteína quimérica y promueven una exitosa respuesta de células T citotóxicas (Mundhada et al., 2004).

El oncogén BCR-ABL juega un papel central en la patogénesis de la LMC. Usando espectrometría de masas se puede demostrar la expresión del péptido BCR-ABL de secuencia KQSSKALQR asociado a la molécula HLA en la superficie de células HLA clase I negativas transfectadas con el HLA-A*03:01 o en células de paciente LMC HLA-A*0301 positivas. Estos pacientes son capaces de montar una respuesta celular T citotóxica específica del péptido de secuencia KQSSKALQR capaz de reconocer y eliminar células autólogas LMC. Los tetrámeros marcados demuestran la presencia de células T específicas de péptido de secuencia KQSSKALQR circulantes. Esta es una de las primeras demostraciones de que las células de LMC expresan péptidos inmunogénicos específicos de leucemia asociados al HLA sentando las bases para los futuros estudios de inmunización contra BCR-ABL. (Clark et al. 2001).

Casi todos los pacientes LMC Ph+ positivos expresan transcripciones de fusión b3a2 o b2a2, dependiendo de si está incluido el exón b3. Cuando traduce, b2a2 y b3a2 cada RNAm genera una proteína BCR-ABL de 210 kDa (p210), que es necesaria y suficiente para la transformación leucogénica. (McLaughlin et al., 1987). En los pacientes LMC mestizos venezolanos se observaron 6 pacientes Ph+

y 7 Ph-. En la serie evaluada, 3/6 pacientes LMC Ph+ resultaron DRB1*14 positivos y 3/6 Ph + no mostraron este alelo. Sin embargo 6/7 Ph- fueron igualmente DRB1*14 negativos mostrando un ligero paralelismo entre la presencia del cromosoma Ph y el alelo LMC asociado positivo DRB1*14. Se hace necesario aumentar la serie de pacientes para poder corroborar esta observación.

La proteína de fusión p210 codificada por la alteración genética t (9,22) (q34; q11) puede ser reconocida por el sistema inmune como se explicó anteriormente como una proteína endógena. La asociación positiva y negativa del transcripto bcr-abl con HLA clase I y II sugiere esa capacidad de presentación de los péptidos leucogénicos. La asociación negativa del alelo DQB1*02 con la LMC revela su carácter protector, sin embargo otros autores han reportado otras asociaciones diferentes a las encontradas en la población mestiza venezolana, se reportan asociaciones positivas del b2a2 con los alelos DQB1* 04:02,*06:09 y *02:01 y el DQB1*06:09 con (b3a2). Igualmente se reportan asociaciones negativas del b2a2 con los DQB1*06:03 y *03:03. (Mundhada et al., 2004). Otros autores (Amirzargar et al. 2007) encontraron asociaciones positivas con el DQB1*03011 y negativa con el DQB1*03032. Estos resultados sugieren que los alelos HLA-DQB1* tienen diferentes capacidades para presentar la proteína de fusión P210.

Los alelos DPA1* *01:03 y el 02:01 están asociados significativamente con susceptibilidad en el desarrollo con LMC, mientras que los alelos DPA1*01:09 y *01:05 resultaron de protección. No se encontraron asociación de los alelos DPB1* y las LMC. Poco se conoce acerca de la participación de las moléculas HLA-DP en la respuesta inmunitaria sin embargo se han asociado algunos alelos HLA-DP con ciertas patologías. Curiosamente el genotipo HLA DPA1* 01:03:01-01:03/02:01:01-02:06 presentó frecuencias significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) en los pacientes con LLA y LMC.

Se establecieron asociaciones positivas y negativas entre los alelos y genotipos HLA-DPA1* con las LLA y LMC. No se detectaron asociaciones positivas entre alelos HLA-DPA1* y las LMC. El polimorfismo de los alelos y genotipos HLA-DPA1* varía considerablemente comparando los controles y

pacientes LLA con los pacientes LMC, en los que es bastante restringido. Estas diferencias en los patrones de distribución del HLA-DPA1* en ambos tipos de leucemia indican, probablemente, que las patogenias de estas enfermedades son diferentes, y apunta en las LMC hacia deficiencias en la presentación antigénica. Los haplotipos de riesgo DRB1*14/DPA1*01:03 y DRB1*15 /DPA1*0103 para las LMC refuerzan esta hipótesis.

V.4. Respuesta humoral para adenovirus en pacientes LMC HLA-DRB1*14

Al evaluar serológicamente por ELISA indirecto, al azar, algunos individuos de esta serie mestiza de controles, pacientes LLA y pacientes LMC frente al adenovirus, observamos que los controles y los pacientes LLA se comportaron de manera similar, resultando casi todos positivos a IgM de adenovirus. Por el contrario, la serie de pacientes LMC mostro un porcentaje muy reducido de individuos positivos a IgM y uno solo positivo a IgG. Esto nos indicaría primero, que el Adenovirus estuvo presente circulando en las poblaciones evaluadas y mostrando una respuesta serológica diferente en los pacientes LMC quienes podrían estar expresando una ausencia de respuesta serológica o posiblemente un patrón de respuesta Th1 (celular) frente al adenovirus. Las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) causadas por adenovirus ocurren en todo el mundo pudiendo, un solo serotipo, causar enfermedades diferentes e, inversamente, más de un serotipo, causar la misma enfermedad. Se presentan en brotes epidémicos y en casos esporádicos. (Pumariega et al., 2000).

En relación a las distintas subpoblaciones linfocitarias presente en paciente con leucemia, la revisión de la literatura muestra datos discrepantes. La mayoría de los investigadores coinciden en reseñar un aumento de los linfocitos TCD8+ y un descenso del cociente CD4/CD8 en leucemias linfoides crónicas a células B (LLC-B) (Tötterman et al., 1989), aunque otros hallan un incremento de los linfocitos T CD4+ con normalidad o aumento del cociente CD4/CD8 (Kimby et al., 1989; Vuiller et al., 1988). Otros resultados muestran un porcentaje de linfocitos TCD4+ significativamente menor en los pacientes leucémicos respecto a los controles, por el contrario, los linfocitos TCD8+ están aumentados y el valor absoluto de los

mismos en la población leucémica duplica el hallado en los controles. En consecuencia, el cociente CD4/CD8 está significativamente descendido en los casos respecto a los controles (**Dianzani et al., 1994; Podhorecka et al., 2001**). El porcentaje de linfocitos TCD8+ fue reportado significativamente mayor en estadios clínicos avanzados respecto a estadios precoces. Estos hallazgos confirman lo publicado por otros autores y, aunque su participación en la patogenia de la leucemia es desconocida, se podría pensar que la inmunidad celular pudiera estar relacionada con la severidad clínica de la enfermedad. (**Aguilar-Santelises et al., 1995; Geisler et al., 1991; Zaknoen - Kay, 1990**). El análisis de otros indicadores de carga tumoral mostró además, que la elevación de los linfocitos TCD8+ por encima de la media del grupo control, se relacionan con una mayor carga tumoral. Estos autores concluyen que estas alteraciones de la inmunidad celular en la LLC-B podrían ser debidas a una respuesta inmunitaria específica frente al proceso leucémico.

Los linfocitos TCD8+ reconocen péptidos unidos a moléculas HLA de clase I y se comportan como linfocitos T citotóxicos frente a determinadas proteínas sintetizadas por las células, como los antígenos tumorales. Por ello, los linfocitos T CD8+ podrían jugar un papel relevante frente a los procesos tumorales. Todo ello sugiere que un determinado patrón inmunofenotípico en la célula leucémica, con expresión de un mayor número de moléculas antigénicas y cambios en el patrón de dispersión, podría ir asociado a un aumento de linfocitos TCD8+. Una explicación de este hallazgo podría ser que, esta expresión antigénica favorecería el reconocimiento, en la célula leucémica, de determinantes péptidos que supondrían una señal de activación del mecanismo citotóxico mediado por los linfocitos TCD8+ (**Pérez-Fernández**). Este reconocimiento estaría al origen de la destrucción y/o transformación celular periférica acentuada, acompañada con una alta demanda medular generadora del cuadro leucémico.

El hallazgo fortuito de un paciente LMC de esta serie mestiza, en estadio blástico, con predominio de células TCD8+, nos estaría indicando que un mecanismo parecido pudiera estar operando en estos pacientes LMC. El hallazgo de células TCD8+, previamente activadas (células TCD8+ memoria), relacionadas con la presencia del alelo HLA-DRB1*14, sugiere, de alguna manera, que la secuencia peptídica de subtipos de este alelo, sobre todo, aquellos que semejan

secuencias peptídicas de patógenos asociados con leucogénesis, pudieran estar al origen de esta patología. Un paciente LMC de esta serie mestiza, tipificado HLA-DRB1*14-04, respondió en cultivo mixto de 48 horas frente a un control mitomizado, tipificado HLA-DRB1*13-14, mostrando un incremento exclusivo de células TCD8+ y una disminución del índice CD4/CD8, con relación a la suspensión examinada a tiempo 0. El mismo no reaccionó frente a un control mitomizado, tipificado HLA-DRB1*13. Por tal motivo, suponemos que, de alguna manera, el alelo HLA-DRB1*14, mimetizando la secuencia peptídica adenoviral pudiera ser el responsable de dicha activación.

El ensayo de proliferación linfocitaria de controles y pacientes frente a la péptida viral secuencia LLERRRA de adenovirus durante 120 horas, demostró que la respuesta de los controles sanos, serológicamente positivos al adenovirus era exclusivamente TCD4+ mientras que la respuesta de pacientes leucémicos LMC estimuló además, a la población TCD8+. El aumento en el marcador CD4+ en la población control manteniéndose el CD8 sin variación nos estaría indicando una respuesta de tipo Th2. Por el contrario la elevación de TCD4 y TCD8 en los pacientes LMC, estaría revelando una respuesta con predominio celular, Th1 frente al adenovirus.

Por lo antes expuesto, cabría esperar que, si un virus escapa a la vigilancia inmunológica por mimetismo de uno de sus epítomos con el alelo HLA DRB1*14 u otros mecanismos de evasión inmunitaria que acompañen a este, no habría un cambio en la respuesta inmunitaria que medir o cuantificar. Sin embargo, podría esperarse que, en aquellos individuos sanos, que no poseen el alelo HLA DRB1*14, el virus no pudiera evitar la acción inmunitaria (al menos por este mecanismo) y por lo tanto desarrollar una repuesta efectiva cuantificable. Un escenario alternativo sería la posibilidad de una respuesta contra el epítome HVR3 del virus, que podría conducir, por reactividad cruzada, a una respuesta auto inmunitaria contra el DRB1*14. En ambos casos, la determinación serológica de anticuerpos contra adenovirus y la determinación de linfocitos T CD8+ contra el epítome HVR3 permitiría valorar los mecanismos inmunitarios antivirales de los pacientes con LMC. Además de la posibilidad de contribuir al planteamiento ulterior de una asociación entre la infección viral, presencia de alelos HLA asociados y una enfermedad neoplásica. Todo ello sugiere que un determinado

patrón inmunofenotípico en la célula leucémica, con expresión de un mayor número de moléculas antigénicas y cambios en el patrón de dispersión, podría ir asociado a un aumento de linfocitos T CD8+. Una explicación de este hallazgo podría ser, que esta expresión antigénica HLA-DRB1*14, favorecería el reconocimiento en la célula leucémica de determinada secuencia peptídica y supondrían una señal de activación del mecanismo citotóxico mediado por los linfocitos CD8+, responsable de una continua y sostenida eliminación de poblaciones leucocitarias DRB1*14+, con exacerbación de la demanda celular en médula ósea, mantenida de manera constante en hematopoyesis inducida, al origen del cuadro leucémico.

VI.CONCLUSIONES

De este trabajo traslacional de investigación de la asociación de alelos HLA clase II con LLA y LMC en población mestiza venezolana se concluye que:

1. Existen asociaciones positivas entre los alelos DQB1*04*, DPA1*01:07, *01:08, *01:06 con la LLA y los alelos DRB1*14, DPA1*02:01 con la LMC.
2. Las asociaciones alélicas de HLA clase II encontradas en la LLA y LMC son diferentes
3. La frecuencia alélica del DRB1*13 en la población venezolana no inmigrante reciente demuestra un elevado nivel de mestizaje con presencia de genes caucásicos, afrodescendiente e indígenas.
4. El patrón de positividad de respuesta serológica IgM a adenovirus en pacientes con LLA es similar al encontrado en los controles sanos y, por el contrario fue negativo en la mayoría de los enfermos con LMC.
5. La utilización de alelos de HLA DRB1*13 y 14 relacionados con la respuesta a adenovirus es diferente en pacientes con LMC y en la población control. El patrón de respuesta del compartimento linfocitario T a antígenos del adenovirus es distinta en pacientes con LMC y controles.

Tomados en conjunto, estos resultados indican, que existen factores genéticos del sistema HLA asociados a la LLA y LMC. Además, el patrón diferente de utilización de estos genes y la respuesta al adenovirus, sugieren que los mecanismos celulares implicados en la patogenia de ambas entidades, son diferentes.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Citoquinas en: Inmunología celular y molecular. Elsevier. 2009. 267 – 301.
2. Aguilar-Santelises M., Loftenius A, Ljungh C, Svenson B, Andersson B, Mellstedt H, et al. Serum levels of helper factors (IL-1 α , IL-1 β and IL-6), T-cell products (sCD4 and sCD8), sIL-2R and β 2-microglobulin in patients with B-CLL and benign B lymphocytosis
3. . **Leuk Res.** 1995; 16 (6): 607– 13.
4. Aguirre MV, Vázquez Domingues E, Barquera Lozano R, Vallejo Flores C, Mestanza Peralta M, Zurita Salinas C. Study of Class I and II HLA alleles in 30 Ecuadorian patients with rheumatoid arthritis compared with alleles from healthy and affected subjects with other rheumatic diseases. **Rheumatol.** 2011; 50(4): 423 – 433.
5. Al-Daccak R., Wang F.Q., Theophile D., Lethielleux P., Colombani J., Loseau P. Gene polymorphism of HLA-DPB1 and DPA1 loci in Caucoid population: frequencies and DPB1-DPA1 associations. **Hum Immunol.** 1991; 31(4): 277 – 85
6. Amirzargar A., Khosravi F., Dianat S., Alimoghadam K., Ghavamzadeh F., Ansari-pour B., Moradi B., Nikbin B. Association of HLA Class II Allele and Haplotype Frequencies with Chronic Myelogenous Leukemia and Age-at-Onset of the Disease. **Pathol Oncol Res.** 2007; 13(1):47 – 51.
7. Arrazola García MA. Tipificación de los alelos HLA clase II. **Rev. Med Inst Mes Seguro Soc.** 2005,43 (Supl 1): 95 – 97
8. Balducci-Silano P.L., Layrisse Z.L. HLA-DP and susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus in an ethnically mixed population. Association with other HLA-alleles. **J Autoimmun.** 1995; 8: 425 – 37
9. Beer M., Porter R. – Editores -. El manual Merck. Undécima octava edición. Rahway, N.J. EEUU. Editorial Harcourt, Elsieve 2007. 1233 –1252.
10. Benacerraf B. Role of MHC gene products in immune regulation. **Science.** 1981; 212: 1229 – 1238.
11. Bennett J.M., Catavsky D.M.T., Fladrin G., Galton D.A., Gralnick H.R., Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French – American – British. (FAB) cooperative Group. **Br J Haematol.** 1976; 33: 451 – 458.
12. Bodmer J., Marsh S., Parham P., Erlich H., Albert E., Bodmer W., Dupont B., Mach B., Mayr W., Sasuki T., Schreuder G., Strominger J., Svejgaard and Terasaki P. Nomenclature for factors of the HLA system. **Tissue Antigens.** 1989; 35: 1 – 8.
13. Bortin M.M., D'Amaro J., Bach F.H., Rimm A.A., van Rood J.J. HLA associations with leukemia. **Blood.** 1987; 70: 227 –232.
14. Boyse E.A., Old L.J., Stockert E. The relation of linkage group IX to leukemogenesis in the mouse. In: Emmelot P, Bentvelzen P, eds. RNA Viruses and Host Genome in Oncogenesis, Amsterdam: North Holland Publishers Co., 1972: 171 – 185

15. Brandan, N, Aquino EJ, Fortuny L. Complejo principal de histocompatibilidad. Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional del Nordeste (UNNE). Argentina. 2011. Disponible en: <http://www.med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/hla.htm>. (Consultado en diciembre 2011).
16. Briceño E., Suárez E., Michelangeli C., Feliciangeli D., Otaiza E., Mendible J.C., Villalón M.E., Aguilera M., Ceballo H., Godoy J., Camilloni C. Código de Biotética y bioseguridad. Ministerio de Ciencia y Tecnología (FONACIT). Segunda Edición. 2002. Disponible en: <http://www.miproyecto.gov.ve/anexos/bioetica.pdf> (Consultado en febrero 20 del 2011).
17. Capote Negrin, L.G. Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. *Rev. Venez. Oncol.* 2006; 18 (4): 269 – 281.
18. Chávez González, M.A. Células troncales hematopoyéticas en la Leucemia Mieloide Crónica (LMC). *Rev Hematol.* 2010; 11(Supl. 1): 54 – 55
19. Cifuentes R, Rojas Villarraga A, Botello Corzo D, Anaya JM. 2010. Influencia del HLA- Clase II en diabetes tipo 1 en Latinoamérica. *Revista Médica Universidad de Antioquía.* 2010; 23(4-s). Disponible en: <http://www.iatreia.udea.edu.co/index.php/iatreia/issue/view/94>. (Consultado en Noviembre 2011).
20. Clark R.E., Dodi A., Hill S.C., Lill J.R., Aubert G., Macintyre A.R., Bourdon A., Bonner P.I.R., Wang L., Christman S.T. Direct evidence that leukemic cell present HLA-associated immunogenic peptides derived from the *bcr-abl* b3a2 fusion protein. *Blood.* 2001; 98(10): 2887 – 2893.
21. Colin D.M., Boschi-Pinto C., Lopez A.D., Murray C.J.L. Cancer incidence, mortality and survival by site for 14 regions of the world". Global Programme on Evidence for Health Policy Discussion Paper No. 13 (World Health Organization). 2001. Disponible en: <http://www.who.int/entity/healthinfo/paper13.pdf>. (Consultado en Octubre 2011).
22. D'Amato J., Bach F.H., van Rood J.J., Rimm A.A., Bortin M.M. HLA C associations with acute leukemia. *Lancet.* 1984; 2: 1176 –1178.
23. Dausset J. Iso-Leuko-antibodies. *J Acta Hematol.* 1958; 20: 156 –166.
24. De Jongh B.M., Termijtelen A., Bruining G.J., De Vries R.R.P., Van Rood J.J. Relation of insulin-dependent diabetes mellitus (IDD) and the HLA-linked SB system. *Tissue Antigens.* 1984; 23: 87 – 93.
25. De Vries R.R. HLA and disease: past, present and future. *Neth J Med.* 1994; 45(6):302 – 308.
26. Dianzani U., Omedè P, Marmont F, Difranco D, Fusaro A, Bragardo M. Expansion of T cells expressing low CD4 or CD8 levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with disease status and neoplastic phenotype. *Blood.* 1994; 83: 2198 – 2205
27. Dorak M.T., Burnett A.K. Molecular mimicry of an HLA-DR53 epitope by viruses [letter]. *Immunol Today.* 1994; 15: 138 – 9.

28. Dorak M.T. The implications for childhood leukaemia of infection with adenovirus. *Trends Microbiol.* 1996; 4: 60– 3
29. Dorak M.T., Lawson T., Machulla H.K.G., Darke C., Mills K.I., Burnett A.K. Unravelling an HLA-DR Association in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood.* 1999; 94: 694 – 700
30. Dorak M.T., Oguz F.S., Yalman N., Diler A.S., Kalayoglus S., Anak S., Sargin D., Carin M. A male-specific increase in the HLA-DRB4 (DR53) frequency in high-risk and relapsed childhood ALL. *Leuk Res.* 2002; 26(7): 651–656.
31. Dorak M. Childhood leukaemias. 2004. Disponible en: <http://dorakmt.tripod.com/hla/chleuk.html>. (Consultado el 10 de marzo del 2007).
32. Dorak M.T. MHC and Leukemia. 2007. Disponible en: <http://www.dorak.info/mhc/mhcleuk.html>. (Consultado en enero 2012).
33. Essex M. Viral a etiology for naturally occurring leukaemia and lymphomas, in Magrath IT, O'Conor GT, Ramot B (Eds): Pathogenesis of Leukaemia and Lymphomas: Environmental Influences, New York, *Raven Press*, 1984, p 315
34. Echeverría M., Rivera S., Hassanhi M., Fuenmayor A., Márquez G., González M., Zabala W. Alelos del complejo principal de histocompatibilidad clase II DRB1*/DQB1* de la población Wayúu de la Guajira venezolana. *OPCION.* 2008; 24(56): 44 – 66
35. Echeverría M., Rivera S., Márquez G., Carrillo, Z., Parra Y., Villalobos C., Patrones diferenciales de distribución de los alelos y genotipos HLA-DPA1* en asociación con leucemias linfoides agudas y leucemias mieloides crónica *Inmunología.* 2010; 29 (4):115 – 118
36. Excoffier L., Laval G., Schneider S. Arlequin ver 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online.* 2005;1: 47 – 50
37. Fernández-Viña M.A., Shumway W., Stastny P. DNA typing for class II HLA antigen S with allele specific or group specific amplification II. Typing for allele of the drw52 associated group. *Hum Immunol.* 1990; 28: 51 – 64.
38. Fernando M.M.A., Stevens Ch.R., Walsh E.C., De Jager P.L., Goyette P., Plenge R.M., Vyse T.J., Rioux J.D. Defining the role of the MHC in autoimmunity: A review and Pooled analysis. *Plos Genet.* 2008; 4(4):e1000024doi:10.1371/journal.pgen.1000024. Disponible en: <http://www.plosgenetics.org>
39. Gallo R.C. Research and discovery of the first human cancer virus HTLV. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011; 24(4): 559 – 65.
40. Gao X., Fernandez-Viña M.A., Shumway W., Stastny P. DNA typing for class II HLA antigen S with allele specific or group specific amplification I. typing for subsets of HLA DR4. *Hum Immunol.* 1990; 27: 40 – 50
41. Gao X., Moraes J.R., Miller S., Stastny P. DNA typing for class II HLA antigen S with allele specific or group specific amplification v. typing for subsets of HLA DR1 and

- "DRBR". *Hum Immunol.* 1991; 30: 147 – 154
42. Geisler CH., Larsen JK, Hansen NE, Hansen MM, Christensen BE, Lund B, et al. Prognostic importance of flow cytometric immunophenotyping of 540 consecutive patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1991; 78: 1795 – 1802
43. Goldsby R.A., Kindt T.J., Osborne B.A., Kuby J. Inmunología. Segunda Edición, Editorial McGraw-Hill. 2004; 663 p.p.
44. Gómez-Casado E. Relaciones entre cretenses y otros pueblos Mediterráneos según los genes HLA y las Culturas. 2002. Disponible en: <http://www.eprints.ucm.es/tesis/quiu/cm-t25623.pdf>. (Consultado en enero de 2012).
45. González L; Frajman M; Sáenz E., Boza R., Bolanos H. Effect of tinidazole on the cellular immune response. *J Antimicrob Chemother.* 1986; 18 (4): 499 – 502
46. Gorer P.A. Some recent work on tumor immunity. *Adv Cancer Res.* 1956; 4: 149 -186.
47. Gorodezky C: Genetic difference between Europeans and Indians. *AllergyProc.* 1992; 13(5):243 – 250
48. Gregersen P.K., Silver J., Winchester R.J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1987; 30: 1205.
49. Gross L. Viral etiology of mouse leukemia. *Adv Cancer Res* 1961; 6: 149 –180.
50. Harris N L., Jaffe E S., Diebold J Flandrina G, Muller-Hermelink H K., Vardiman J., Lister T A., & Bloomfield C D. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Histopathology.* 2000; 36: 69 – 86.
51. Heim S., Mitelman F. Cancer cytogenetics. Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells (2.a Ed.). Nueva York: Wiley-Liss. 1995. p. 181.
52. Hunt H., Kelly K., Vorburgers S.A., Swisher S.G. (Eds). Gene Therapy for Cancer. 2007. Humana Press Inc.
53. Jersild C., Svejgaard A, Fog T. HL-A class Antigens and Multiple Sclerosis. 1972; *Lancet* 1: 1240 – 1241.
54. Kamatani Y., Wattanapokayakit S., Ochi H., Kawaguchi T., Takahashi A., Hosono N. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in *Asians Nature Genet.* 2009; 41: 591 – 595.
55. Kasper D.L., Braunwald E., Fauci A., Hauser S., Longo D., Jameson J.L., Fauci A.S. Harrison's Principles of Internal Medicine 16th Edition. Publisher: McGraw-Hill Professional. 2008.
56. Kay NE, Peterson L. Heterogeneity of CD5 membrane expression on

- B-chronic lymphocytic leukemia cells. ***LeukemiaandLymphoma***. 1991; 5: 49 – 55
57. Kimby E., Mellstedt H., Nilsson B, Björkholm M, Holm G. Differences in blood T and NK cell populations between chronic lymphocytic leukemia of B cell type (B-CLL) and monoclonal B-lymphocytosis of undetermined significance (B-MLUS). ***Leukemia*** 1989; 3: 501– 4.
58. Knowles RW., Flomemberg N., Horibe K., Winchester R., Radka SF., Dupont B: Complexity of the supertypic HLA-DRw53 specificity: two distinct epitopes differentially expressed on one or all of the DR beta-chains depending on the HLA-DR allotype. ***J Immunol***.1986; 137: 2618– 26
59. Kovacsovics-Bankowski M., Rock KL. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. ***Science***. 1995; 267: 243– 46.
60. Laferte J., Savon C., Goyenechea A., Vazquez V. Estimación del título de anticuerpos IgG a Adenovirus utilizando una curva patrón y un ensayo de ultramicro ELISA indirecto. ***Rev. Cubana MedTrop***.1996; 48 (2):102 – 8
61. Layrisse Z., Guédez Y., Dominguez E., Rodriguez-Larralde J., Scorza. Extended HLA Haplotype among the Barí Amerindians of the Perijá range relationship to other tribes based on four-locus haplotype Frequencies. ***Hum Immunol***. 1995; 44:228 – 35
62. Layrisse Z., Guédez Y., Dominguez E., Paz N. Extended HLA Haplotype in a Carib Amerindian population: the Yucpa of the Perijá range. ***Hum Immunol***. 2001; 63: 992 – 9
63. Leen MP., Goroski J. DRB4 promotor polymorphism in DR7 individuals: Correlation with DRB4 pre-mRNA and RNAm levels. ***Immunogenetics***. 1997; 45(6):371–8
64. Lilly F., Boyse E.A., Old L.J. Genetic basis of susceptibility to viral leukemogenesis. ***Lancet***. 1964;ii: 1207 – 9
65. Lilly F., Pincus T. Genetic control of murine viral leukemogenesis. ***Adv Cancer Res***. 1973; 17: 231– 77.
66. Lilly F. The inheritance of susceptibility to the Gross leukemia virus in mice. ***Genetics***. 1966; 53: 529 – 39.
67. Lindel N., Achino B., Pando M., Satz L. Manual de Técnicas. Curso Teórico-Práctico “Recientes Avances en Histocompatibilidad e Inmunogenética”. 1997. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Medicina. Buenos Aires Argentina. p. 26.
68. Lonai P., Katz E., Haran Ghera N. Role of the major histocompatibility complex in resistance to viral leukemia; its effect on the preleukemic stage of leukemogenesis. ***Springer Semin Immunopathol*** 1982; 4: 373 – 96.
69. López-Martínez A., Chávez-Muñoz C., Granados J. Función biológica del Complejo Principal de Histocompatibilidad. ***Rev Invest Clin***. 2005; 57(2): 132 – 41.
70. Louzada –Junior P., Smith A. G., Hansen J.A. Donadi E.A. HLA-

- DRB1 and HLA-DQB1 alleles in the Brazilian Population of the northeastern region of the state of Sao Paulo. *Brief Com. Tissue Antigens*. 2001; 57:158 – 62
71. Manchilla H., Müller L., Schaaf A., Kujat G. (2003). Association of chronic lymphocytic leukemia with specific alleles of the HLA-DR4:DR53:DQ8 haplotype in German patients. *Inter Science*. 2000; 92(2): 203 – 7.
72. Mainati MS., Marti M., La Vaute T. Processing pathway for presentation of cytosolic antigen to M restricted T cell. *Nature*. 1992; 357:702 – 4
73. Manzanares B., González R., Peña J, Solana R y Jaraquemada D. Moléculas de histocompatibilidad. 2009. Disponible en: http://www.uco.es/grupos/inmunologiamolecular/temas_nuevos_pdf/tema05.pdf
74. Marti M., Jaraquemada D. Inmunología online. Capítulo 6. Procesamiento de antígenos. Coordinador José Peña-Martínez. 2003. Disponible en: <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/>. Accesado en 15 enero 2012.
75. Matsuoka M., Hattori T., Nishimura Y., Takatsuki K. ATL cells recognize self class II HLA antigens: Implication to leukemogenesis. *Leukemia*. 1995; 8: 1338 – 43.
76. MacDonald, George A. Atlas de hematología. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 5ª Edición. 1991.
77. Miller S.A., Dkys D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human cell. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16 (3): 1215
78. Ministerio de Salud. 2007. Guía Clínica Leucemia del Adulto. Santiago: Minsal. No. 45. Disponible en: <http://www.redsalud.gov.cl/archivos/guiasges/leucemia.pdf>.
79. McLaughlin J., Chianese E., Wittte ON. In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the p210 bcr/abl oncogen product of the Philadelphia chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84:6558 – 62
80. Moent T., Stien R., Bratlie A., Bondevik E. Distribution of HLA-SB antigens in multiple sclerosis. *Tiss Antig*. 1984; 24:126 – 27
81. Mundhada S., Rajyalakshmi L., Cano P. Association of HLA Class II genes with bcr-at transcripts in leukemia patient with t(9;22) (q34;q11). *BMC Cancer*. 2004; 4: 2407– 25
82. Murphy K., Travers P., Walport, M. Immunobiology Janeway's. Octava edición. Editado por McGraw Hill Interamericana Editores S.A. México DF. México. 2010. 887 pp.
83. Navarrete C., Alonso A., Awad J, et al. HLA class I and class II antigen associations in acute leukemias. *J Immunogenet*. 1986; 13: 77 – 84.
84. Norbury CC., Hewlett L J., Prescott AR., Shastri N., Watts C. Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow

- macrophages. *Immunity*. 1995; 3: 783 – 91
85. Nuchterm JG., Biddison WE. Klausner RD. Class II MHC molecules can use the endogenous pathway presentation. *Nature*. 1990; 343:74 – 76
86. Oguz F.S., Kalayoglu S., Diler A.S., Tozkir H., Sargin D., Carin M., Dorak M.T. HLA System Affects the Age-at-Onset in Chronic Myeloid Leukemia Fatma Savran American. *J Hematol*. 2003; 73:256 –62.
87. Olivo A., Debaz H., De La Rosa G., Moreno M., Juarez V., Gorodezky C., Guédez Y., Dominguez E. et al. Alelos y haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad en tres poblaciones indígenas americanas. *Rev. Real Acad Cs Exact, Fís y Natur*. 1996: 197– 210
88. Orouiji E., Tavakkol Afshari J., Badiie Z., Shirdel A., Alipour A. Association between HLA-DQB1 gene and patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Int J Hematol*. 2012; 95(5):551 – 5
89. Ovsyannikova I., Jacobson R., Vierkant R., Pankratz S., Jacobson S., Poland G. Association between human leukocyte antigen (HLA) alleles and very high levels of measles antibody following vaccination. *Vaccine*. 2004; 22: 1914 – 20.
90. Parslow T.G., Stites D.P., Terr A.I., Imboden J.B. Inmunología básica y Clínica. 10ma edición. Editorial manual Moderno. 2002. 917 p.
91. Pavón Moran V., Ramírez P., Martínez G., Agramonte L.I., Jaime C., Braco J. Leucemia mieloide crónica. Actualización en Citogenética y Biología Molecular. *Rev Cubana Hematol*. 2005; 21(2): 1 – 11.
92. Pawelec G., Ehninger G., Müller C., Blaurock M., Schneider E.M., Wernet P. Human Leucocyte antigen-DP in leukemia. *Cancer*. 1988; 61: 475 – 77.
93. Pawelec G., Max H., Halder T., Bruserud O., Merl A., Da Silva P., Kalbacher H. BCR/ABL leukemia oncogene fusion peptides selectively bind to certain HLA-DR alleles and can be recognized by T cells found at low frequency in the repertoire of normal donors. *Blood*. 1996; 88 (6) 2118 – 24.
94. Paztor L.M., Hu F., McNulty W.P. 5-Bromodeoxyuridine-tolerant melanoma cells in vitro and in vivo. *Yale J Bio Med*. 1973; 46 (5): 397 – 410
95. Pérez Fernández I. Estudio inmunológico de la leucemia linfática crónica de estirpe B. Análisis de la población linfocítica T. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga. Facultad De Medicina. Disponible en: <http://www.biblioteca.uma.es/bbl/doc/tesisuma/16698769.pdf>
96. Pérez González E., Vela Casas F., Sánchez Calero J. Leucemia Linfocítica Aguda: Sintomatología de inicio orientativo a su diagnóstico. *Vox Paediatric*. 1999; 7 (2): 162 – 165.
97. Pérez-Miranda A.M., Alfonso-Sánchez M.A., Vidales M.C., Calderón R., Pena J.A. Genetic Polymorphism and linkage disequilibrium of the HLA-DP región in Basques from Navarre (Spain).

- Tissue Antigens*. 2004; 64:264 – 75
98. Pérez-Requejo J.L. Hematología Básica. Segunda edición. Tomo II Capítulo XXIII. Leucemia. Caracas, Editorial Coclusa. 1987; 315 – 49
99. Pérez-Rodríguez M. HLA y enfermedad. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2005; 43 (Supl 1): 91 – 3.
100. Podhorecka M., Rolinski J, Wasik-Szczepanek E. Intracellular interleukin-2 expression by T-cell subsets in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Hematologica*. 2001; 86: 549 – 52
101. Posthuma E., Falkenburg H., Apperley F., Gralwohl A. (2002). HLA-DR4 is associated with a diminished risk of the development of chronic myeloid leukemia (CML). Chronic Leukemia Working Party of the European Blood and Marrow Transplant Registry. *Leukemia*. 2000; 14: 859 – 62
102. Pumariaga T., Savón C, Muné M, Cancio R, González G, Valdivia A, González Z, Goyenechea A. Isolation and Identification of Adenovirus in Hospitalized Children, under Five Years, with Acute Respiratory Disease, in Havana, Cuba. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000. 95(6): 859 – 61.
103. Ramiro G.FJ. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 2005. (Declaración de Helsinki 1964, Tokyo 1975, Venecia 1983, Hong Kong 1989, Somerset West 1996, Edimburgo 2000). Disponible en: <http://www.bioeticawe> b.com/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=896 (citado en abril del 2011).
104. Raymond M., Rousset F., GENEPOP (version 1.2) population genetics software for exact test and ecumerism. *J Hered*. 1995; 86: 248– 49
105. Rezaieyazdi Z., Tavakkol-Afshari J., Esmaili E., Orouji E., Pezeshkpour F., Khodadoost M., Mazhani M., Sandooghi M. Association of HLA-DQB1 Allelic Sequence Variation with Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2008; 7(2): 91 – 95.
106. Rivera Pirela S., Weir J.M., Echeverría M., Márquez G., Fuenmayor A., Hassanhi M., González M., Balbas O., Layrisse Z. HLA en la población zuliana de Venezuela. *Inmunología*. 1998; 17:137 – 45
107. Rivera Pirela S., Hernández R., Hassanhi M. Caracterización Molecular de los Alelos HLA Clase I de la población mestiza del estado Zulia - Venezuela. *Ciencia*. 2004; 12(3):132 – 47
108. Rodríguez M., Cardona A.F., Grajales M.A., Enciso L., Ruiz G., Yepes A., Ospino V., Gálvez K., García J., Rosales J., Rosales M., Quintero G, Rosales C, Timana JL, Casas C.P., Combariza J.F., Vargas E., Molano E. Leucemia Mieloide Crónica en crisis blástica bases moleculares y diagnóstico. *Rev Venez Oncol*. 2007; 19(4): 1 – 7.
109. Rosas-Cabral A, Irigoyen L, Alvarado L, Vela-Ojeda J, Ayala-Sanchez M, Tripp-Villanueva F,

- Sánchez E, Gonzalez-Llaven J, Gariglio P. HLA CW3 and HLA CW4 have a protective effect on acquisition of chronic myeloid leukemia on Mexican patients. *Rev Invest Clín.* 2003;55 (4): 423 – 28.
110. Sánchez-Pérez M., Shaw S. HLA-DP: Currents Status. In: Solheim BG, Müller E, Ferrone S, eds. HLA Class II Antigens. A Comprehensive Review of Structure and Function. Berlin: Springer-Verlag, 1986; 83 – 8.
111. Sandoughi M., Fazaeli A., Bardestani G., Hashemi M. Frequency of HLA-DRB1 alleles in rheumatoid arthritis patients in Zahedan, southeast Iran. *Annals of Saudi Medicine.* 2011; 31(2): 171 – 73.
112. Schlehofer B., Blettner M., Geletneky K. Sero-epidemiological analysis of the risk of virus infections for childhood leukaemia. *Int J Cancer.* 1996; 65: 584 – 90.
113. Shankakumar U. The Human Leukocyte Antigen (HLA) System. *Int J Hum Genet.* 2004; 4(2): 91 – 103.
114. She J.X. Susceptibility to type I diabetes: HLA-DQ and DR revisited. *Immunol Today.* 1996; 17: 323 – 329.
115. Smith KA, Griffin J.D. Following the cytokine Signaling pathway to leukemogenesis: a chronology J Clin Invest. 2008. Volumen 118. Disponible en: <http://www.jci.org>. Consultado noviembre 2011.
116. Solana R., Fernández N., González R., García M.J., Peña J. Inmunología online. Capítulo 5. Moléculas de Histocompatibilidad. 2003. Coordinador José Peña-Martínez. Disponible en: <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/>. Consultado el 15 enero 2012.
117. Stewart CC. Clinical applications of flow cytometry. Immunologic methods for measuring cell membrane and cytoplasmic antigens. *Cancer* 1992; 69: 1543 – 47.
118. Taylor M.G., Dearden S., Ravetto P., Ayres M., Watson P., Hussein A., Greaves M., Alexander F., Osborn B. Genetic susceptibility to childhood common acute lymphoblastic leukemia is associated with polymorphic peptide-binding pocket profiles IN HLA-DP*0201. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(14):1585 – 97.
119. Taylor GM., Hussain A., Verhage V., Thompson PD., Fergusson WD., Watkins G., Lightfoot T., Harrinson CJ., Birch JM. Strong association of the HLA-DP6 supertype with childhood leukaemia is due to a single allele, DPB1*0601. *Leukemia.* 2009; 23:863 – 69.
120. Taylor M., Hussain A., Urayama K., Chokkalingam A., Thompson P., Trachtenberg E., Buffier P. The human major histocompatibility complex and childhood leukemia: an etiological hypothesis based on molecular mimicry. *Blood Cells Mol Dis.* 2009; 42:129 – 35
121. Tirado-Gomez L.L., Mohar B.A. Epidemiología de las Neoplasias Hemato - Oncológicas. *Cancerología.* 2007; 2: 109 – 20

122. Tiwari J.L., Terasaki P.I. HLA and Disease Associations. New York: Springer-Verlag. 1995.
123. Totterman T.H., Carlsson M., Simonsson B., Bengtsson M., Nilsson K., T-cell activation and subset patterns are altered in B-CLL and correlate with the stage of the disease. **Blood**. 1989; 74: 786 – 792
124. Trabace, S. HLA and disease association. **J Headache Pain**. 2000; 1: S109 – S113.
125. Trigg M.E., Gayton P.S. UK F.M. Acute Lymphoblastic Leukemia in children En: Holland JF, Bast RC, Morton DL, Frei e Kufe DW, Weichsebaum RR, Eds. Cancer Medicine. 4^a ed. Baltimore: Williams &Wilkins. 1996; 2945 – 2948.
126. Tristam G., Stites P.D., Terr A. Inmunología Básica y Clínica. Editorial Manual Moderno. México DF- México. Ed. 9na. 1998. 333 – 383.
127. Turgeon, M.L. Leucemias. En: Hematología Clínica. Teoría y Procedimientos. Editorial El manual Moderno. 2006. p 257– 263
128. Uçar F., Karkucar M., Alemdaroglu E., Capkin E., Yücel B., Sönmez M., Tosun M., Karaca A. HLA-DRB1 allele distribution and its relation to rheumatoid arthritis in Eastern Black Sea Turkish population. *Rhemathol Int*. 2011. Article first published online: 4 MAR 2011. DOI: 10.1111/j.1756-185X.2011. 01604.x
129. Vandiedonck C., Knight J.C. The human Major Histocompatibility Complex as a paradigm in genomics research. **Brief Funct Genomic proteomic**. 2009; 8(5): 379 – 94.
130. Vasconelos G.M., Chistinsen C., Houseman E.A., Xiao J., Marsit C.J., Zheng S., Karagas M.R., Nelson H.H., Wrensch M.R., Kelsey K.T., Pombo-de-Oliveira M.S., Wiemels J.L. History of parvovirus B19 infection is associated with a DNA methylation signature in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Epigenetics**. 2011; 1(12): 1436 – 43.
131. Vásquez Palacio G., Ramírez Castro J.L., Posada Díaz Á., Sierra M., Botero L. O., Durango N. E., Cristancho C. M., Herrera J. C., Tabares J. G. Leucemia linfocítica aguda: estudio citogenético en niños atendidos en el Hospital Universitario san Vicente de Paúl de Medellín en el período 1998-2001. **IATREIA**. 2002; 15(4): 217 – 25
132. Vega Robledo G,B. Complejo Principal de Histocompatibilidad. **Rev Fac Med UNAM**. 2009; 52 (2): 86 – 88.
133. Vicario J.L., Balas A., Trompeta E., Barragán R., Mezquilla G., García P., Municio A. Frecuencias de antígenos y haplotipos HLA en españoles: comparación con distintas poblaciones. **Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**.1996:248 – 68.
134. Villalobos C., Rivera S., Weir-Medina J., Hassanhi M., Montiel M., Gonzales R. Association of HLA class I and leukemia in Mestizo patients of the state of Zulia, Venezuela. **Invest Clin**. 2003; 44(4): 283 – 89.

135. Vuillier F., Tortevoeye P., Binet JL., Dighiero G., CD4, CD8 and NK subsets in B-CLL. *Hematol.* 1988; 30:331 – 34
136. Vyas J.M., Van der Veen A.G., Ploegh H.L. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(8): 607 – 18.
137. Walford R.L., Finkelstein S., Neerhout R., Konrad P., Shanbrom E. Acute childhood leukemia in relation to the HL-A human transplantation genes. *Nature.* 1970; 5231: 461 – 62.
138. Wang X.J., Ai X.F., Sun H.Y., Wang F, Xu SC, Wang Z.Q. Relation of HLA-DRB1*15 with pathogenesis in 162 childhood cases of acute lymphoblastic leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2009; 17: 1507 – 10.
139. Weiss S., Bogen B. MHC class II restriction presentation of intracellular antigen. *Cell.* 1991; 64: 767 – 76.
140. Wertheimer N, Leeper E. Electrical wiring configurations and childhood cancer. *Am J Epidemiol.* 1979; 109: 273 – 84.
141. Yari F., Sobhani M., Vaziri M.Z., Bagheri N., Telebian A. Association of aplastic anemia and Fanconi's disease with HLA-DRB1 alleles. *Int J Immunogenetics.* 2008; 35(6): 453 – 56.
142. Yasukawa M., Ohminami H., Kaneko S., Yakushijin Y., Nishimura Y., Inokuchi K., Miyakuni T., Nakao S., Kishi K., Kubonishi I., Dan K., Fujita S. CD4+ cytotoxic T-cell clones specific for bcr-abl b3a2 fusion peptide augment colony formation by chronic myelogenous leukemia cells in a b3a2-specific and HLA-Dr restricted manner. *Blood.* 1998; 3355 – 61
143. Yasukawa M., Ohminami H., Kojima K., Inokuchi K., Nishimura Y., Fujita S. Analysis of HLA-DRB1 Alleles in Japanese Patients With Chronic Myelogenous Leukemia. *Am J Hematol.* 2000; 63(2): 99 –101
144. Yasukawa M., Ohminami H., Kojima K., Hato T., Hasegawa A., Takahashi T., Hirai H., Fujita S. HLA class II-restricted antigen presentation of endogenous bcr-abl fusion protein by chronic myelogenous leukemia-derived dendritic cells to CD4+ T lymphocytes. *Blood.* 2001; 98(5): 1498 – 1505.
145. Young M., Martínez A.N., Serial M.S., Melleus D. Epidemiología de la presentación y distribución geográfica de los casos de leucemias crónicas en los últimos 10 años diagnosticadas en el servicio de hematología del Hospital JC Perrando. *Rev Med Nordeste.* 2006; 8: 9 – 15.
146. Zaknoen S.L., Kay NE. Immunoregulatory cell dysfunction in chronic B-cell leukemia. *Blood Reviews* 1990; 4: 165 – 174
147. Zijlstra M., Melief C.J. Virology, genetics and immunology of murine lymphomagenesis. [Review]. *Biochim Biophys Acta.* 1986; 865: 197 – 231.

VIII. ANEXOS

Anexo 1.**Cuestionario****“Asociación HLA clase II y Leucemias en el estado Zulia de Venezuela y su significado en la patogénesis de la enfermedad”**

Nombres y Apellidos: _____
 Lugar de Nacimiento: _____ País: _____
 Fecha de Nacimiento: _____ Edad: _____ Sexo: F () M ()
 Dirección: _____
 Teléfono: _____ Procedencia: _____
 Diagnóstico por Citometría de Flujo: _____ Por Citogenética: _____
 HLA: _____
 Fecha de toma de la muestra: _____

Factores de Riesgo	SI	NO	Otras Patologías	SI	NO
Fumador			Nefropatía		
Obesidad			Arteriosclerosis		
Diabetes			Artritis		
Hiperglicemias			Uveítis		
Hipertensión arterial			Espondilitis Anquilosante		
Cardiopatía			Cáncer		
Enfermedades del Colágeno					

Antecedentes Familiares	SI / Especifique el parentesco	NO
Cáncer		
Leucemias		
Diabetes		
Hipertensión arterial		
Cardiopatía		
Enfermedades del Colágeno		
Artritis		
Uveítis		
Espondilitis		

Observaciones Generales: _____

Firma del Paciente (Consentimiento): _____

Fecha: _____

 Responsable: MgSc Miriam Echeverría
 C.I. 9711718
 Prof. Titular -Cátedra de Inmunología
 Facultad de Medicina-LUZ

Cuestionario

“Valoración de la población mestiza venezolana por alelos HLA clase II”

Nombres y Apellidos: _____

Lugar de Nacimiento: _____ País: _____

Fecha de Nacimiento: _____ Edad: _____ Sexo: F () M ()

Dirección: _____

Teléfono: _____

Madre nacida en el estado Zulia: Si ___ No ___ Donde: _____

Padre nacido en el estado Zulia: Si ___ No ___ Donde: _____

Abuelos nacidos en el estado Zulia: Si ___ No ___ Donde: _____

Factores de Riesgo	SI	NO	Otras Patologías	SI	NO
Fumador			Nefropatía		
Obesidad			Arteriosclerosis		
Diabetes			Artritis		
Hiperlipemias			Uveítis		
Hipertensión arterial			Espondilitis Anquilosante		
Cardiopatía			Cáncer		
Enfermedades del Colágeno					

Antecedentes Familiares	SI / Especifique el parentesco	NO
Cáncer		
Leucemias		
Diabetes		
Hipertensión arterial		
Cardiopatía		
Enfermedades del Colágeno		
Artritis		
Uveítis		
Espondilitis		

Fecha de toma de la muestra: _____

Observaciones Generales: _____

Firma del Paciente (Consentimiento): _____

Responsable: MgSc Miriam Echeverría

C.I. 9711718

Profa. Titular-Cátedra de Inmunología

Facultad de Medicina-LUZ

Anexo 2

CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN

En el Instituto Hematológico de Occidente en Maracaibo, Estado Zulia, conjuntamente con la Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, se está realizando el proyecto de investigación titulado "Asociación HLA Clase II y su significado en la patogénesis de la enfermedad" con el objeto de investigar la asociación de algunos alelos de HLA con la patogénesis de esta enfermedad.

Yo (voluntario o responsable del menor voluntario): _____,
 C.I.: _____ Nacionalidad: _____ Estado civil: _____
 Domiciliado en: _____

Siendo mayor de 18 años en USO pleno de mis facultades mentales y sin que medie coacción ni violencia alguna en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconveniente y riesgos relacionados con el estudio que más abajo indico, en calidad de paciente (o responsable del paciente), declaro mediante la presente:

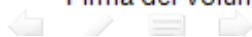
1. Haber sido informado del manera clara y sencilla, por parte del grupo de investigadores de la Sección de Inmunología del Instituto Hematológico de Occidente en Maracaibo, Estado Zulia", coordinado por el Dr. Sergio Rivera de todos los aspectos relacionados al proyecto de Investigación antes mencionado.
2. Haber sido informado de que mi participación en el proyecto consiste en facilitar de manera voluntaria una muestra de sangre, las cuales serán tomadas por un personal especializado.
3. Que las muestras tomadas que acepto facilitar, así como la información que suministre, será utilizada para realizar estudios de HLA por PCR.
4. Que de equipo de investigadores me ha garantizado absoluta confidencialidad relacionada tanto a mi identidad como de cualquier información relativa a mi persona a la que tenga acceso por concepto de mi participación en el proyecto antes mencionado y estoy de acuerdo en el UAO de los resultados obtenidos en el presente estudio y que mi participación en dicho estudio no implica riesgo ni inconveniente alguno para mi salud.
5. Que la participación en la investigación no agravará n causará efectos colaterales efectos colaterales en la patología ya existente, por el contrario, ayudará a dilucidar mi diagnóstico permitiendo una mejor terapéutica. Cualquier pregunta o duda que yo tenga en relación con este estudio, me será respondida y aclarada oportunamente por parte del equipo de investigadores antes mencionado con quienes me puedo comunicar por el teléfono 04146368923 en horario de 8:00 a.m. a 5:00 p.m.
6. Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir algún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación.

DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO

Luego de haber leído, comprendido y recibido las respuestas a mis preguntas con respecto a este formato consentimiento y por cuanto mi participación en este estudio es totalmente voluntario acuerdo: aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez, autorizar la toma de muestra para dicho trabajo de investigación.

 Firma del Voluntario

 Firma del responsable del menor



IX. PUBLICACIONES