

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ASOCIACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LOS ALELOS HLA DE CLASE I
Y LEUCEMIA EN PACIENTES DEL NORTE DE MÉXICO**

Por

MICHELLE DE JESÚS ZAMUDIO OSUNA

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

Diciembre, 2010

**ASOCIACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LOS ALELOS HLA DE CLASE I
Y LEUCEMIA EN PACIENTES DEL NORTE DE MÉXICO**

Comité de tesis

Dra. Diana Reséndez Pérez
Director de Tesis

Dra. Rocio Ortiz López
Director externo

Dra. María Cristina Rodríguez Padilla
Secretario

Dr. Moisés Franco Molina
Vocal

Dr. Pablo Zapata Banavides
Vocal



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios..... Por darme vida y fuerzas para terminar este proyecto tan importante en mi vida.

Agradezco a mis Asesores y Tutores..... Por su apoyo, paciencia, colaboración y por ser guías en la realización de mi maestría.

Agradezco y dedico esta tesis a mi familia y amigos..... Por ser el soporte más fuerte en momentos de desesperación y angustia, por estar siempre a mi lado en las buenas y en las malas y porque sin ellos no hubiera podido seguir adelante.



LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|---|---------------|
| I. Asociación de alelos HLA-A y –B con leucemia..... | 20 |
| II. Frecuencias alélicas HLA-A en la población Mexicana..... | 21 |
| III. Condiciones de amplificación..... | 25 |
| IV. Condiciones de PCR..... | 25 |
| V. Población de estudio..... | 29 |
| VI. Concentración y calidad del ADN de las muestras..... | 30 |
| VII. Distribución de las frecuencias alélicas..... | 31 |
| VIII. Frecuencias haplotípicas estimadas para los loci HLA-A y –B..... | 34 |
| IX. Riesgo relativo de los haplotipos HLA-A/B..... | 35 |



LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|---------------|
| 1. Clasificación de las leucemias..... | 6 |
| 2. Localización y organización del complejo HLA en el cromosoma 6... 9 | |
| 3. Estructura de los antígenos HLA de clase I y II..... | 10 |
| 4. Productos de los genes del MHC..... | 12 |
| 5. Herencia de los haplotipos HLA..... | 14 |
| 6. Ejemplo de desequilibrio de ligamiento entre los alelos A1 y B1 en una población caucásica del norte de Europa..... | 15 |
| 7. Estrategia general..... | 22 |
| 8. Interpretación de bandas en el gel de agarosa al 2.5%..... | 26 |
| 9. Tipificación de los alelos HLA-A y -B mediante el software HLA visual v2.2.0 (One Lambda, Inc)..... | 27 |
| 10. Corrimiento electroforetico de la amplificación del HLA-A y -B..... | 30 |
| 11. Variabilidad alélica de la población de estudio..... | 32 |
| 12. Variabilidad haplotípica de la población de estudio..... | 35 |



RESUMEN

Los antígenos leucocitarios humanos (HLA) son el sistema más complejo y polimórfico conocido en el hombre que se encarga de la presentación de péptidos a los linfocitos T. Además de su reconocida importancia en la aceptación y rechazo de trasplantes, se ha demostrado que desempeña un papel importante en la susceptibilidad a varias enfermedades. La primera evidencia de asociación entre neoplasias hematológicas y genes HLA se observó en cepas de ratones que presentaban una alta incidencia de leucemia y poseían el mismo haplotipo H-2, lo cual sugirió la posibilidad de asociaciones entre leucemias humanas y los productos de los genes del sistema HLA. El objetivo de ésta tesis consiste en determinar la frecuencia de los alelos HLA clase I en pacientes con leucemia de la región del norte de México y su asociación con la enfermedad. Para ello, se analizaron 189 muestras de sujetos sanos no emparentados y 49 muestras de pacientes con leucemia. La extracción de ADN de las muestras se realizó usando el equipo automatizado Maxwell® 16 System y posteriormente fueron tipificadas por el método PCR-SSP. El análisis de los resultados se llevó a cabo por métodos estadísticos utilizando el software para análisis de genética de poblaciones Arlequin v3.11, con el que se estimaron las frecuencias alélicas y haplotípicas de la población en estudio. Los resultados obtenidos mostraron que los alelos más frecuentes fueron el A*02 (0.2875) y B*35 (0.1719), seguido por los alelos A*24 (0.1419), B*39 (0.1190), y A*68 (0.0980), B*44 (0.0952). En cuanto a los haplotipos HLA-A/B en asociación con leucemia, encontramos que el haplotipo HLA-A*02-B*52 podría ser un marcador de riesgo ($RR > 1$) y el haplotipo HLA-A*29-B*44 podría ser un marcador de protección para el desarrollo de leucemia ($RR > 1$). Estos resultados muestran una asociación de leucemia con los antígenos HLA-A y -B, similar a lo encontrado en otros estudios caso-control a nivel mundial. Estos hallazgos tienen profundas implicaciones en los estudios de asociación de enfermedades genéticas en poblaciones mestizas mexicanas.



TABLA DE CONTENIDO

| Sección | Página |
|--|---------------|
| AGRADECIMIENTOS..... | i |
| LISTA DE TABLAS..... | ii |
| LISTA DE FIGURAS..... | iii |
| RESUMEN..... | iv |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. HIPÓTESIS..... | 3 |
| 3. OBJETIVOS..... | 4 |
| 3.1 Objetivo general..... | 4 |
| 3.2 Objetivos particulares..... | 4 |
| 4. ANTECEDENTES..... | 5 |
| 4.1 Leucemias..... | 5 |
| 4.1.1 Epidemiología de las leucemias en México..... | 5 |
| 4.2 Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)..... | 8 |
| 4.2.1 Estructura de los antígenos del MHC..... | 8 |
| 4.2.2 Estructura genética de los antígenos HLA..... | 11 |
| 4.2.3 Herencia de los antígenos HLA..... | 13 |
| 4.2.4 Desequilibrio de ligamiento del sistema HLA..... | 14 |
| 4.2.5 Nomenclatura del sistema HLA..... | 16 |
| 4.3 HLA y su asociación a enfermedades..... | 17 |
| 4.3.1 HLA y leucemias..... | 19 |



| | |
|--|----|
| 5. MÉTODOS..... | 22 |
| 5.1 Estrategia general..... | 22 |
| 5.2 Diseño del estudio..... | 23 |
| 5.3 Pacientes y origen de las muestras..... | 23 |
| 5.4 Extracción de ácidos nucleicos..... | 23 |
| 5.5 Tipificación de los alelos HLA-A y –B (Técnica Micro-SSP™). 24 | |
| 5.6 Métodos estadísticos..... | 28 |
| 6. RESULTADOS..... | 29 |
| 7. DISCUSIÓN..... | 37 |
| 8. CONCLUSIONES..... | 40 |
| LITERATURA CITADA..... | 41 |
| RESUMEN BIOGRÁFICO..... | 45 |



1. INTRODUCCIÓN

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés de Major Histocompatibility Antigens) se encarga de presentar los antígenos relacionados con células presentadoras de antígenos para ser reconocidos por los linfocitos T, en el humano estas células se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA, por sus siglas en inglés de Human Leukocyte Antigen).

Los genes del MHC implicados en la respuesta inmunitaria se catalogan en clases I y II, que son estructural y funcionalmente similares. Las moléculas de clase I presentan los péptidos a los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y las de clase II lo hacen a los linfocitos T cooperadores CD4⁺ (Morales *et al.*, 2006).

Los estudios del sistema HLA y la determinación de sus correspondientes antígenos realizados, en África, Asia, Europa, América y especialmente en México, han tenido diversas aplicaciones y se consideran herramientas fundamentales en estudios de evolución, diversidad humana, asociación a enfermedades y genética de poblaciones. Estos estudios también han mejorado el conocimiento de las frecuencias haplotípicas, útiles en el diseño de programas de trasplante de órganos, para la selección adecuada de la pareja donador-receptor (Barquera *et al.*, 2008).

A nivel mundial se han realizado diversos estudios en los que se observa que existen alelos específicos o haplotipos HLA que confieren susceptibilidad o



resistencia a leucemia. A pesar de que diversos grupos de investigación han podido identificar ciertos marcadores HLA como positivos o negativos, el gran polimorfismo de dicho sistema y la disparidad de las frecuencias en las diferentes poblaciones étnicas, ha hecho imposible unificar los resultados.

En México los estudios de asociación de HLA a enfermedades se han centrado en enfermedades autoinmunes o infecciosas y son escasos los estudios de asociación a leucemias. Por tal motivo, este trabajo se enfoca en el estudio de la región más polimórfica del sistema HLA; la clase I (HLA-A y -B) que pudiera generar una pauta de estudio para la asociación de esta enfermedad con la frecuencia de alelos y haplotipos HLA-A y -B, en una población Mexicana.



2. HIPÓTESIS

La presencia de ciertos alelos y haplotipos pertenecientes al HLA de clase I, determinan la susceptibilidad o protección al desarrollo de leucemia.



3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación de la frecuencia de los alelos HLA de clase I y leucemia en pacientes del Norte de México.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Tipificar los alelos HLA clase I en sujetos sanos.
- 2) Tipificar los alelos HLA clase I en pacientes con leucemia.
- 3) Determinar la frecuencia de los haplotipos HLA clase I y su asociación con leucemia.



4. ANTECEDENTES

4.1 Leucemias

Las leucemias son consideradas como un proceso hematopoyético aberrante, iniciado por una célula madre (CM) modificada ó célula madre leucémica (CML) que ha adquirido la capacidad de proliferación infinita, cuya acumulación se acompaña de una disminución del tejido hematopoyético normal en médula ósea y posterior invasión en sangre periférica y otros tejidos. En las leucemias agudas la población celular predominante está formada por células inmaduras (blastos) y en las crónicas las células presentan un mayor estadio celular madurativo y se clasifican como se muestra en la Figura 1 (Rosell, 2007).

4.1.1 Epidemiología de las leucemias en México

El cáncer constituye la segunda causa de muerte en niños mexicanos, entre 1 y 14 años de edad, siendo la leucemia la más frecuente al representar casi la mitad de los casos. Datos publicados por el INEGI indican que hasta el 2007, a nivel nacional se registró una mortalidad del 2% de la población a causa de tumores malignos del tejido linfático, de los órganos hematopoyéticos o tejidos afines, siendo de este total el 1% a causa de leucemias.



Clasificación de las leucemias:

Agudas:

- Leucemia mieloblástica aguda
- Leucemia linfoblástica aguda

Crónicas:

- Leucemia mieloblástica crónica
- Leucemia linfoblástica aguda

Figura 1. Clasificación de las leucemias. Los diferentes tipos de leucemias se clasifican de acuerdo al estado madurativo de las células en agudas y crónicas.

Por otra parte, de acuerdo a un comunicado publicado por el IMSS en el 2008, en promedio mueren entre 600 y 650 infantes al año, por enfermedades graves, de las cuales, entre 50 y 55% se deben a cáncer en el tejido hematopoyético. Se han desarrollado diversos estudios en el ámbito clínico, epidemiológico y básico a nivel nacional, que establecen que se ha incrementado la incidencia de estas enfermedades malignas y, anualmente, en el país se presentan de 4000 a 4500 nuevos casos en niños (IMSS, 2008; Rizo *et al.*, 2007).

Su etiología es pobremente entendida; algunos casos surgen como parte de un síndrome genético, como alteraciones citogenéticas y cambios moleculares (translocaciones), y otros pueden atribuirse a factores de riesgo ambientales, como la exposición a campos electromagnéticos (vivir cerca de líneas eléctricas de alta tensión), los pesticidas y el tabaquismo. A pesar de los importantes avances en el entendimiento de los aspectos biológicos, moleculares y citogenéticos de las leucemias, así como su diagnóstico y terapia, una gran parte de la población mundial sigue muriendo a causa de esta enfermedad (IMSS, 2008).



Obviamente es imperativo el entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos de las leucemias para de esta manera proporcionar nuevas y mejores estrategias terapéuticas.

La manera en que los cambios o variaciones de los genes pueden determinar que un organismo sea susceptible a desarrollar una enfermedad, o por el contrario, sea resistente a ella, ha sido objeto de numerosos estudios en diversas especies de organismos, principalmente en humanos.

Hasta la fecha muchos estudios genéticos se han basado en la detección de translocaciones cromosómicas las cuales generan un gen híbrido con propiedades oncogénicas, la mayoría de estos oncogenes estudiados hasta la fecha están estrechamente relacionados con el desarrollo o la progresión a leucemia, como por el ejemplo la translocación $t(9;22)(q34;q11)$ también conocida como cromosoma filadelfia que está presente en más del 90% de los casos de leucemia mieloide crónica (LMC) o la translocación $t(12;21)$ que genera el gen fusión TEL-AML1 presente en aproximadamente el 25% de los pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA). Así como estos oncogenes muchos otros se encuentran continuamente en estudio y son característicos de diferentes subtipos de leucemias, su estudio nos permite tener marcadores genéticos de la enfermedad, ayudando en su diagnóstico, monitoreo de la progresión de la enfermedad o recaídas. A pesar de que estos oncogenes son importantes marcadores de susceptibilidad a leucemia, es de igual importancia lograr identificar genes que generen protección a esta enfermedad, como es el caso de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad que se han identificados como marcadores de susceptibilidad o protección a muchas enfermedades infecciosas o autoinmunes (Smith *et al.*, 2005).



4.2 Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés de Major Histocompatibility Antigens) se encarga de presentar los antígenos relacionados con células presentadoras de antígenos para ser reconocidos por los linfocitos T, en el humano estas células se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA, por sus siglas en inglés de Human Leukocyte Antigen). El sistema HLA, se refiere a glicoproteínas de superficie celular presentes en leucocitos y muchos otros tipos celulares, encargadas de la presentación de antígenos asociados a células para que sean reconocidos por los linfocitos T (Baines and Ebringer, 1992).

4.2.1 Estructura de los antígenos del MHC

El complejo MHC está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3), tiene una longitud de 4,100 kb y está dividido en las familias HLA de clase I, II y III, con más de 200 genes (Fig. 2). Las familias más estudiadas del MHC comprenden los antígenos de clase I (A, B y C) y II (DP, DQ y DR), también conocidos como moléculas clásicas, los cuales son estructural y funcionalmente similares (Taylor *et al.*, 2009).

Los genes del HLA clase I se ubican en el locus 11 y codifican para la cadena polipeptídica α de la molécula de clase I y la cadena β es codificada por un gen localizado en el cromosoma 15 (gen beta₂-microglobulina). La cadena α tiene cinco dominios: dos dominios de unión a péptido ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), un dominio como



inmunoglobulina ($\alpha 3$), una región transmembrana, y una cola citoplasmática (Fig. 3; Glenn, 2000). La asociación de las cadenas α y β es requerida para la expresión antigénica del complejo molecular sobre la membrana de la superficie celular. La región más polimórfica de la molécula de clase I, reside en los dominios 1 y 2 de la cadena α , siendo la región $\alpha 3$ la más conservada (Baines and Ebringer, 1992).

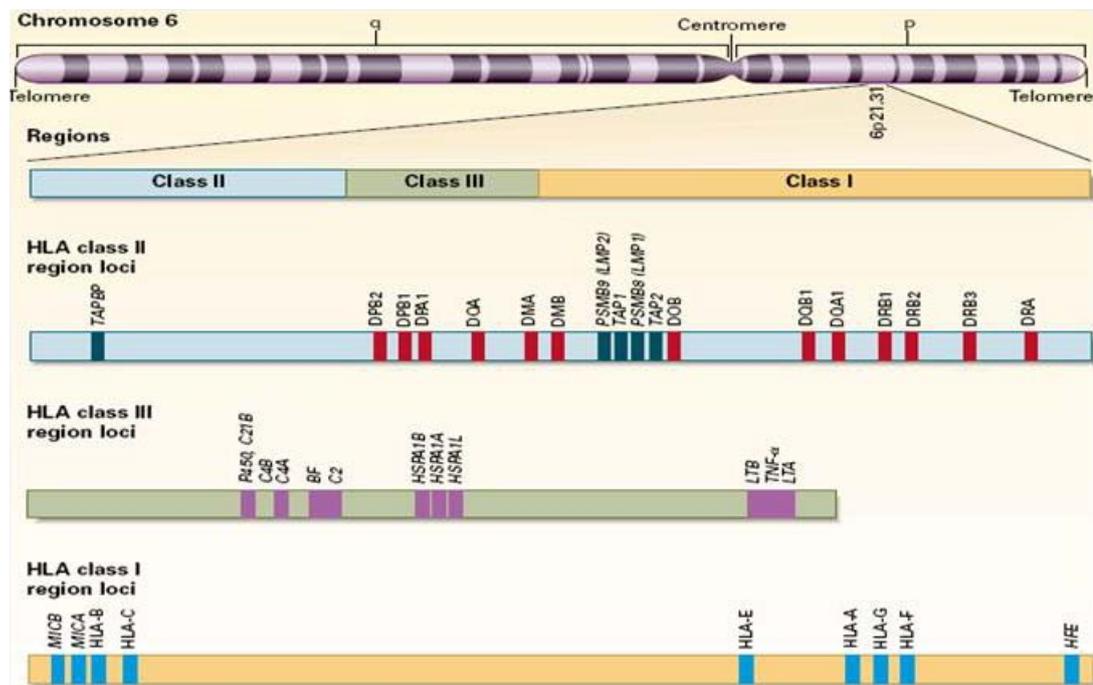


Figura 2. Localización y organización del complejo HLA en el cromosoma 6. Los genes del complejo principal de histocompatibilidad se catalogan en tres clases de nominadas HLA de clase I, II y III.

Los genes del HLA clase II se localizan en el locus 5 y codifican para las cadenas α y β de las moléculas de clase II, estas cadenas tienen cuatro dominios: un dominio de unión a péptido ($\alpha 1$ o $\beta 1$), un dominio como inmunoglobulina ($\alpha 2$ o $\beta 2$), una región transmembrana y dos colas citoplasmáticas (Fig. 3; Glenn, 2000). Los antígenos de la clase II son producto de los genes del locus HLA-D, región dividida en al menos tres subregiones (DR, DP y DQ). Estas



tres familias de la clase II han sido ampliamente estudiadas dada la naturaleza polimórfica del dominio β , siendo el dominio α el más conservado (Baines M and Ebringer A, 1992).

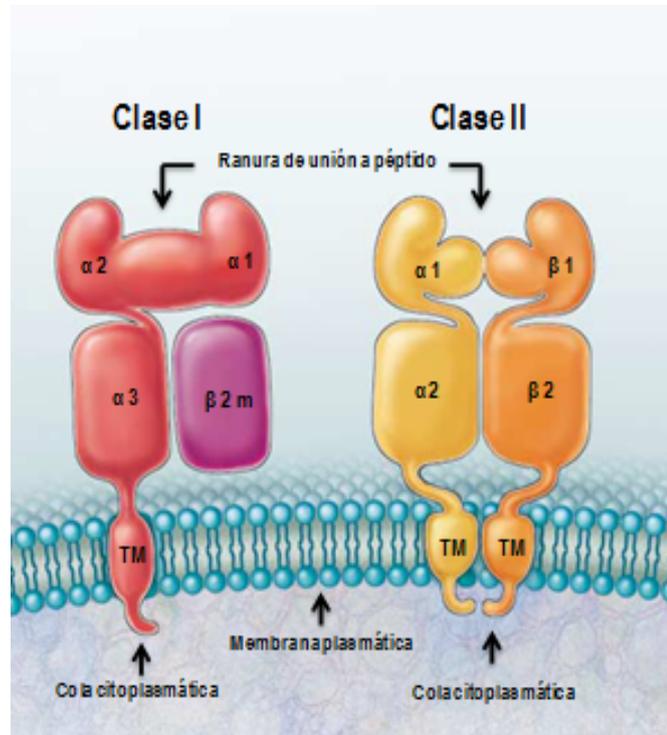


Figura 3. Estructura de los antígenos HLA de clase I y II. Estructura de las moléculas HLA, donde se esquematizan las cadenas α y β , la ranura de unión a péptido y las colas citoplasmáticas de ambas moléculas.

Los genes de clase I se expresan en la mayoría de las células somáticas, aunque el nivel de expresión varía dependiendo del tejido. Los genes de la clase II se expresan normalmente en un subgrupo de células inmunes que incluyen las células B, células T activadas, macrófagos, células dendríticas y células del epitelio del timo (Jan, 2000).



4.2.2 Estructura genética de los antígenos HLA

La región del MHC mide aproximadamente cuatro Mb, ocupando el 0.13% del genoma humano (3×10^9 pb), pero contiene aproximadamente 0.5% (> 150) de los 32000 genes que codifican para proteínas conocidos en el hombre. Muchos de los productos de los genes del MHC son ligandos, receptores, proteínas de interacción, factores de señalización y transcripción que están involucrados en la respuesta inflamatoria, en el procesamiento y presentación de antígenos como parte de la respuesta inmune adaptativa y en interacciones con células asesinas naturales y citocinas como parte de la respuesta inmune innata (Fig. 4). El contenido genético del MHC está compuesto de muchos genes, retrotransposones, transposones, elementos regulatorios, pseudogenes y muchos otros genes que tienen secuencias no conocidas. La región genómica del MHC es una de las regiones que más genes contienen y de las regiones mejor definidas del genoma humano, las secuencias no conocidas son solo un pequeño porcentaje de la región del MHC (Takashi *et al.*, 2009).

La región HLA de clase I contiene 19 genes, tres son conocidos como clásicos (HLA-A, -B y -C) por su gran polimorfismo e importancia en trasplantes médicos, tres llamados no clásicos (HLA-E, -F y -G) cuya distribución en los tejidos es restringida y su papel en el área de trasplantes no ha sido bien definida y 12 pseudogenes cuyo polimorfismo y funciones no han sido bien establecidas.

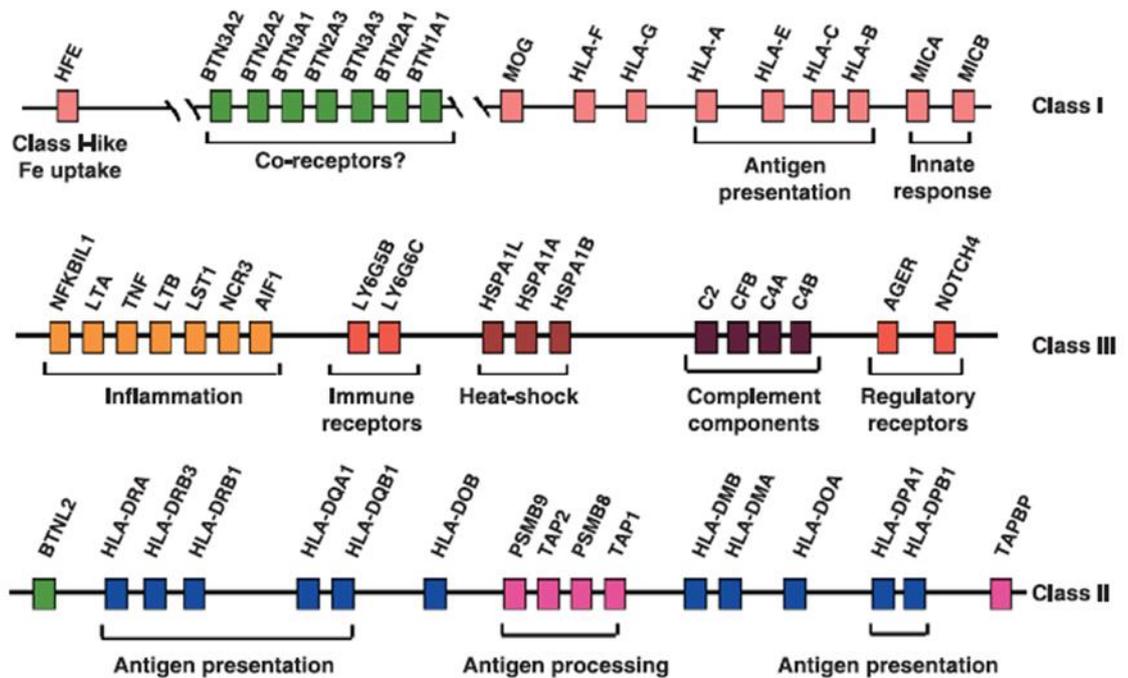


Figura 4. Productos de los genes del MHC. Muchos de los productos de los genes del MHC son ligandos, receptores, proteínas de interacción, factores de señalización y transcripción.

La región HLA de clase II se expande en 0.7 Mb de ADN y contiene los genes que codifican para las cadenas clásicas α y β . HLA-DP, -DQ y -DR se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígenos para presentar péptidos a las células T cooperadoras. Existen 27 locus identificados dentro de la región de clase II desde HLA-DRA a HLA-DPA3, con 17 genes que codifican para proteínas, siete genes candidatos y cinco pseudogenes. Se conoce que las proteínas codificadas por los 17 genes son funcionales.

La región de los genes HLA de clase III, también están implicadas en aspectos de la respuesta inmune (complemento), pero su homología estructural y funcional es diferente que los genes HLA de clase I y II.



De las 3864 secuencias alélicas de las clases I, II y III, 1633 codifican para las moléculas clásicas de clase I y se distribuyen de la siguiente manera: HLA-A 506, HLA-B 851 y HLA-C 276. A este tipo de diversidad se le conoce como polimorfismo alélico y el HLA es el sistema más polimórfico conocido, lo cual confiere una ventaja antigénica a los individuos (Morales *et al.*, 2006).

4.2.3 Herencia de los antígenos HLA

Los individuos normalmente heredan un conjunto de cromosomas y, por tanto, un conjunto de genes de cada progenitor. Los genes que forman el sistema HLA son codominantes, por lo tanto, cada individuo expresa dos alelos por cada loci, uno procede del padre y otro de la madre. Debido a su estrecha vinculación física, los genes HLA son normalmente heredados de los padres en bloque, a menos que ocurran eventos de recombinación. Al final existen seis loci de clase I y seis de clase II en cada individuo. Al conjunto de alelos del sistema HLA que se encuentra en un mismo cromosoma se le denomina haplotipo.

A pesar de la complejidad de los grupos de genes, normalmente hay sólo cuatro genotipos que pueden transmitirse a la descendencia, y la probabilidad de identidad HLA genotípica de cualquiera de los dos hermanos es del 25%. Cuando los genotipos HLA se obtienen tipificando familias completas, aproximadamente el 2% de la descendencia mostrará un genotipo HLA recombinante. Los haplotipos recombinantes HLA se crean durante la meiosis de las células germinales. Durante la replicación de los cromosomas, a menudo se superponen, formando quiasmas en forma de X (Fig. 5). Cuando se separan los cromosomas durante la meiosis, roturas



cromosómicas pueden ocurrir en los lugares de cruce, lo que resulta en un cambio en el material genético. La frecuencia de recombinación entre dos loci HLA se relaciona con la distancia entre los loci. Por ejemplo, la recombinación entre los locus HLA-A y HLA-DP es frecuente, aunque son relativamente distantes dentro del complejo HLA.

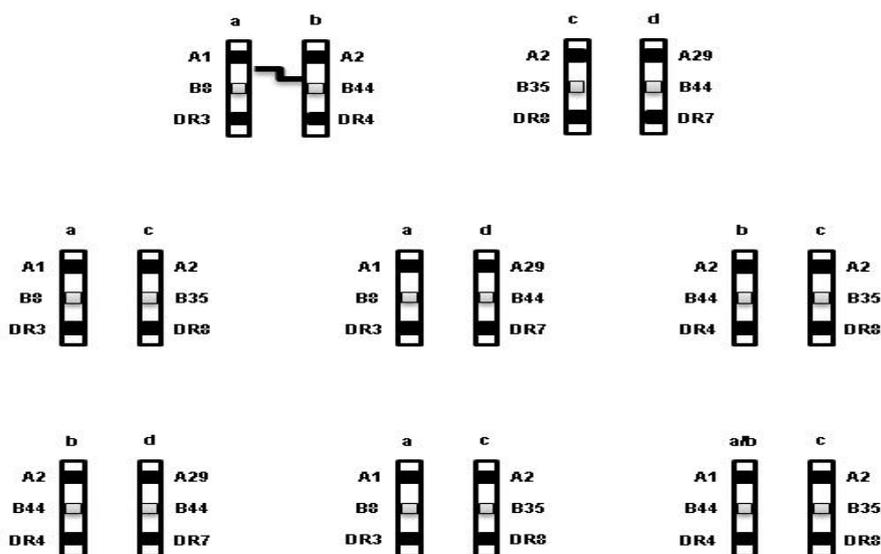


Figura 5. Herencia de los haplotipos HLA. El diagrama muestran la recombinación del haplotipo a/b de un evento de recombinación ocurrido entre el cromosoma 6 de los padres durante la meiosis.

Por el contrario, la recombinación entre los locus HLA-DQ y HLA-DR es un acontecimiento raro, aunque son adyacentes (Glenn, 2000).

4.2.4 Desequilibrio de ligamiento del sistema HLA

En poblaciones al azar que han alcanzado el equilibrio genético, la frecuencia con que dos alelos se encuentran juntos debe ser igual al producto de las frecuencias de cada alelo por separado. Esta es una consecuencia lógica de la ley de Mendel de la segregación independiente de los genes. Si este no es el caso, entonces los alelos se dice que están en desequilibrio de ligamiento (Fernández *et*



al., 1991). Por ejemplo, si las frecuencias génicas de HLA-A1 y HLA-B1 son de 0.16 y 0.1 respectivamente en la población, la ocurrencia esperada del haplotipo HLA que producen ambos A1 y B1 debería ser $0.16 \times 0.1 \times 100 = 1.6\%$ (Fig. 6). En algunas poblaciones caucásicas con orígenes en el norte de Europa, la actual ocurrencia de este haplotipo puede ser más alta de 8%, muy por encima de la frecuencia esperada, por lo tanto A1 y B1 se encuentran en desequilibrio de ligamiento entre sí. Este fenómeno suele expresarse como la diferencia entre las frecuencias esperadas y las observadas. Efectos de desequilibrio de ligamiento a menudo puede ser visto a través de un haplotipo entero, involucrando los genes codificados por el MHC; clase III, así como clase I y II. El desequilibrio de ligamiento es especialmente alto en las moléculas de clase II. Aunque la base evolutiva del desequilibrio de ligamiento es especulativa, algunas combinaciones de genes HLA pueden proveer una ventaja selectiva de sobrevivencia en algunas poblaciones étnicas.

| | Gen | Frecuencia | Frecuencia de Haplotipos esperada | Frecuencia de Haplotipos Observada |
|---|------------|-------------------|---|---|
|  | A1 | 0.10 | | |
| | B1 | 0.16 | 1.6% | 7.2% |
| | | | Delta = Observada - Esperada = 5.6 | |

Figura 6. Ejemplo de desequilibrio de ligamiento. El diagrama muestra la frecuencia de haplotipos esperada y observada entre los alelos A1 y B1 en una población caucásica del norte de Europa.

El desequilibrio de ligamiento varía mientras más grande sea la población, y tiene importantes aplicaciones clínicas, especialmente en la selección de donadores



para trasplantes. Donadores para pacientes con algún haplotipo HLA, como A1, B8 o A3, B7, son más comunes porque estos antígenos están en fuerte desequilibrio de ligamiento en la población blanca. En contraste, donadores para pacientes, con fenotipo HLA que no muestran desequilibrio de ligamiento, como es HLA-A24, B13, son proporcionalmente difíciles de encontrar (Glenn, 2000).

4.2.5 Nomenclatura del sistema HLA

El utilizar un código de cuatro dígitos para distinguir los alelos HLA que difieren en las proteínas que se codifican por estos genes, se estableció en un informe de nomenclatura en 1987 por el comité de Nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud. Desde entonces dígitos adicionales se han añadido, y en la actualidad el nombre de un alelo puede estar compuesto por cuatro, seis u ocho dígitos dependiendo de su secuencia.

Los primeros dos dígitos describen el alelo de la familia, que a menudo corresponde con el antígeno serológico que lleva el alotipo. El tercer y cuarto dígitos se asignan en el orden en que las secuencias se han determinado. Alelos cuyos números difieren en los cuatro primeros dígitos pueden diferir en una o más sustituciones de nucleótidos que cambian la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. Los alelos que se diferencian sólo por sustituciones de nucleótidos sinónimo dentro de la secuencia de codificación se distinguen por el uso de los dígitos quinto y sexto. Alelos que sólo se diferencian por polimorfismos de secuencia en los intrones o en las regiones 5' y 3' no traducidas, que flanquean los exones e intrones, se distinguen por el uso de los dígitos séptimo y octavo.



En el 2002 surgieron cuestionamientos de que los alelos de las familias A*02 y B*15 que contienen más de 100 alelos. En ese momento la decisión fue nombrar a los alelos de más, en estas familias como A y B*92, *95, respectivamente, debido a que el número de alelos de ciertos genes HLA se estaban acercando rápidamente al máximo posible. Por tal motivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS), y el Comité de Nomenclatura de los factores del sistema HLA decidió introducir cambios en la manera en que los alelos son designados y nombrados. Estos cambios entraron en vigor el 1 de abril de 2010 (HLA Nomenclature, 2010).

4.3 HLA y su asociación a enfermedades

Los primeros estudios sobre el sistema HLA en humanos, iniciaron aproximadamente en 1954 cuando se descubrió que después de transfusiones sanguíneas se desarrollaban anticuerpos contra leucocitos, los cuales reaccionaban selectivamente con las células de los individuos donadores. De estos estudios surgió la descripción de la primera especificidad antigénica del sistema HLA identificada como MAC (HLA-A2). En 1958 se detectaron anticuerpos en sueros de mujeres embarazadas, los cuales aglutinaban los leucocitos de sus esposos y de otras personas no relacionadas; entonces, se supuso que esos anticuerpos habían surgido de la sensibilidad de la madre a los antígenos del feto (Fernández *et al.*, 1991). Diversos estudios surgieron a partir de estos hallazgos, llevando en 1963 al agrupamiento de los genes que codifican para los antígenos HLA dentro de un sistema di-alélico llamado “grupo cuatro”. Posteriormente la elucidación del MHC tuvo un rápido progreso, llevando estos descubrimientos a los primeros talleres internacionales de histocompatibilidad en 1964 y 1965 (Baines and Ebringer,



1992). 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 (Pérez, 2005). Lo cual permitió que en 1968 el Comité de Nomenclatura de la OMS introdujera el término HLA, (H por Humano, L por leucocito y A para describir el primer sistema). Posteriormente se reconoció la relevancia del sistema HLA en la aceptación y rechazo de injertos. En un estudio realizado por Snell y cols., en donde observaron que los tumores y tejidos trasplantados entre cepas de ratones consanguíneas no eran usualmente rechazados por el ratón receptor, y los injertos entre animales de diferente cepa eran rechazados. A través de los años 70's los talleres Internacionales de histocompatibilidad, se dedicaron a establecer la existencia de los locus A, B, C y D y a realizar un sin número de estudios antropológicos en el HLA (Baines and Ebringer, 1992).

Por tal motivo, las décadas de los sesenta y setenta se definieron por la participación crucial del MHC en la presentación de antígenos a los linfocitos T, junto con el reconocimiento de lo propio y lo extraño (Glenn, 2000).

Amiel en 1967, reportó un aumento débil en la frecuencia del antígeno HLA "4C" (ahora HLAB5, -B35, -B18) en pacientes con enfermedad de Hodgkin (51 %), al compararse con la frecuencia obtenida en testigos sanos (27 %). Desde entonces, diferentes estudios han demostrado la asociación entre antígenos del sistema HLA clases I y II con diferentes enfermedades hematológicas malignas, especialmente leucemias (Glenn, 2000).



4.3.1 HLA y leucemias

La principal función biológica de los genes HLA es la dirigir la respuesta inmune a patógenos a través de la formación del complejo TCR-péptido-HLA. El hecho de que los genes HLA estén más asociados con una gran variedad de enfermedades que cualquier otra región del genoma puede reflejar una ruta patogénica común en la cual la subversión de la respuesta inmune puede surgir como una consecuencia de la interacción entre la enfermedad y moléculas HLA (Baines and Ebringer, 1992). La leucemia fue una de las primeras enfermedades humanas en ser investigadas por su asociación con antígenos HLA. El primer estudio en leucemias en humanos realizado por serología reportó una frecuencia aumentada del antígeno HLA-A2 en Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) (Villalobos *et al.*, 2003).

La asociación entre alelos individuales y haplotipos HLA de clase I (HLA-A y – B) con leucemia han sido blanco de un creciente interés en los recientes años, con un gran número de estudios epidemiológicos que muestran asociación protectora o de riesgo en diferentes poblaciones del mundo como China, España, Norteamérica, Canadá, etc. (Tabla I; Haugler and Liwski, 2010).

En México, los estudios se han centrado en la frecuencia alélica y haplotípica del sistema HLA de clase I en poblaciones sanas (Tabla II) o en asociación a enfermedades autoinmunes o infecciosas, sin embargo, hasta la fecha no se tiene ningún reporte de asociación con leucemias.



A pesar de que se han realizado diversos estudios de frecuencias alélicas y haplotípicas a nivel mundial, en poblaciones sanas y en estudios de casos-control, falta recopilar bastante información de cómo el sistema inmune a nivel HLA está relacionado con diversas enfermedades. Dado que el sistema HLA de clase I es el más polimórfico del complejo, esta tesis presenta un estudio de su papel en la etiología de la leucemia, mediante la tipificación de alelos y haplotipos de clase I, por técnicas moleculares, en pacientes con leucemia y en individuos sanos, no emparentados de la población del norte de México, con el fin de estudiar la posible asociación entre ambos.

Tabla I. Asociación de alelos HLA-A y –B con leucemia

| alelo | asociación | autor (referencia) | población | Tipo de Leucemia |
|-------|--------------------|--|--------------|------------------|
| A*24 | Protección | Wein L <i>et al.</i> (Wei L <i>et al.</i> , 2008) | China | LMA |
| A*30 | Protección | Miao KR <i>et al.</i> (Miao KR <i>et al.</i> , 2007) | China | LMA |
| A*11 | Protección | Chhaya SU <i>et al.</i> (Chhaya SU, 2006) | India | LMA |
| A*32 | Marcador de riesgo | Li D <i>et al.</i> (Li D <i>et al.</i> , 2005) | China | LMA |
| A*29 | Riesgo a recaída | Margaret H.L.Ng <i>et al.</i> (Margaret H.L.Ng <i>et al.</i> , 2006) | China | LLA |
| A*32 | | | | |
| A*26 | Marcador de riesgo | Gao SQ <i>et al.</i> (Gao SQ <i>et al.</i> , 2005) | China | LLA |
| A*30 | Protección | | | |
| A*33 | | | | |
| A*58 | | | | |
| A*11 | Marcador de riesgo | Orgad S <i>et al.</i> (Orgad S <i>et al.</i> , 1988) | Israel | LLA |
| A*19 | Marcador de riesgo | Mortimer M <i>et al.</i> (Mortimer M <i>et al.</i> , 1987) | Norteamérica | Leukemia |
| A*19 | Protección | Navarrete C <i>et al.</i> (Navarrete C <i>et al.</i> , 1986) | España | LLA |
| B*55 | Marcador de riesgo | Naugler C and Liwski R. (Naugler C and Liwski R, 2009) | Canada | LMA |
| | | Naugler C and Liwski R. (Naugler C and Liwski R, 2009) | | |
| B*13 | Marcador de riesgo | Wein L <i>et al.</i> (Wei L <i>et al.</i> , 2008) | China | LMA |
| B*81 | Marcador de riesgo | Miao KR <i>et al.</i> (Miao KR <i>et al.</i> , 2007) | China | LMA |
| B*67 | Riesgo a recaída | Margaret H.L.Ng <i>et al.</i> (Margaret H.L.Ng <i>et al.</i> , 2006) | China | LLA |
| B*56 | Marcador de riesgo | | China | LLA |
| B*27 | Marcador de riesgo | Li D <i>et al.</i> (Li D <i>et al.</i> , 2005) | China | LMC |
| B*44 | Marcador de riesgo | Li D <i>et al.</i> (Li D <i>et al.</i> , 2005) | China | LMC |
| B*54 | Marcador de riesgo | Li D <i>et al.</i> (Li D <i>et al.</i> , 2005) | China | LMC |
| B*55 | Marcador de riesgo | Li D <i>et al.</i> (Li D <i>et al.</i> , 2005) | China | LMC |
| B*35 | Protección | Fatma Savran Oguz <i>et al.</i> (Fatma SO <i>et al.</i> , 2003) | Turkia | LMA |
| | | Fatma Savran Oguz <i>et al.</i> (Fatma SO <i>et al.</i> , 2003) | | |
| B*37 | Marcador de riesgo | | Turkia | LMA |
| B*39 | Protección | Carmen Villalobos <i>et al.</i> (Villalobos C <i>et al.</i> , 2003) | Venezuela | LM |
| | | | | |
| B*27 | Marcador de riesgo | W.Y.Au <i>et al.</i> (Au WY <i>et al.</i> , 2001) | China | Leukemia |
| B*08 | Protección | E.F.M. Posthuma <i>et al.</i> (Posthuma EFM <i>et al.</i> , 1999) | Europa | LMA |
| B*40 | Marcador de riesgo | Cameron ES <i>et al.</i> (Cameron ES <i>et al.</i> , 1990) | España | LLA |
| B*18 | Protección | Navarrete C <i>et al.</i> (Navarrete C <i>et al.</i> , 1986) | España | LMA |
| B*40 | Marcador de riesgo | P. Ruuska <i>et al.</i> (Ruuska P <i>et al.</i> , 1984) | Finlandia | LMA |



En ésta tesis nos centramos en el estudio del HLA de clase I (HLA-A y –B) y su asociación con leucemia, ya que se cuenta con escasa información al respecto en nuestra población, de manera que nos brinde una pauta para establecer asociaciones directas entre dicha enfermedad y el sistema HLA.

Tabla II. Frecuencias alélicas HLA-A en la población Mexicana

| Ciudad de México, Puebla y Sinaloa n = 381 | | Monterrey n= 151 | Guadalajara n= 103 | Distrito Federal n= 381 |
|---|--------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------|
| HLA-A | Frecuencia alélica | Frecuencia alélica | Frecuencia alélica | Frecuencia alélica |
| A02 | 0.322 | 0.301 | 0.216 | 0.322 |
| A24 | 0.164 | 0.142 | 0.156 | 0.164 |
| A68 | 0.115 | 0.071 | 0.073 | 0.059 |
| A01 | 0.059 | 0.029 | 0.068 | 0.059 |
| A31 | 0.059 | 0.018 | 0.027 | 0.026 |
| A03 | 0.036 | 0.067 | 0.063 | 0.035 |
| A30 | 0.036 | 0.019 | 0.049 | 0.036 |
| A11 | 0.034 | 0.067 | 0.063 | 0.035 |
| A29 | 0.031 | 0.043 | 0.068 | 0.031 |
| A26 | 0.030 | 0.016 | 0.029 | 0.301 |
| A33 | 0.027 | 0.013 | 0.026 | 0.022 |
| A23 | 0.024 | 0 | 0 | 0.024 |
| A32 | 0.015 | 0.018 | 0.027 | 0.026 |
| A25 | 0.013 | 0 | 0 | 0.013 |
| A66 | 0.009 | 0.016 | 0.026 | 0.022 |
| A34 | 0.005 | 0 | 0 | 0.005 |
| A74 | 0.005 | 0.018 | 0.027 | 0.026 |
| A69 | 0.003 | 0.071 | 0.073 | 0.059 |
| A36 | 0.002 | 0 | 0 | 0.002 |



5. MÉTODOS

5.1 Estrategia Experimental

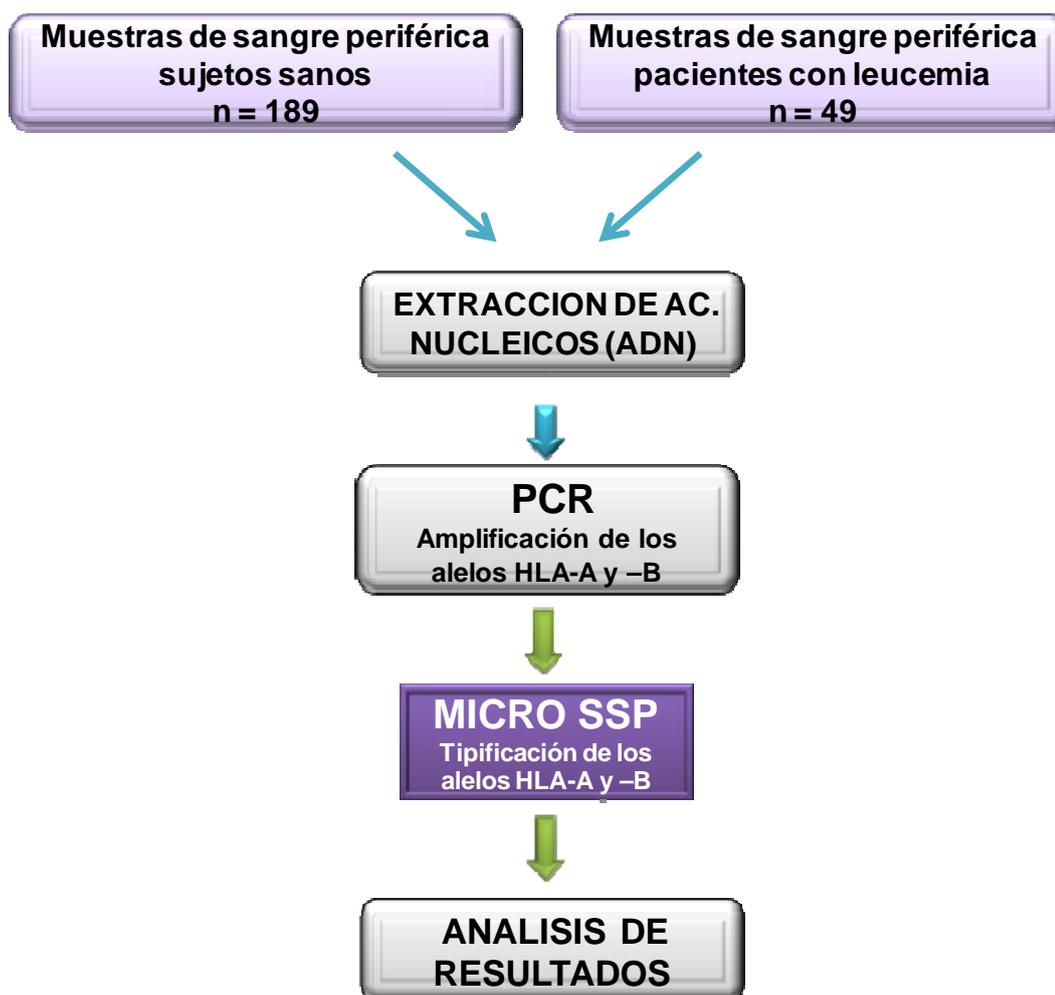


Figura 7. Estrategia general. A partir de la muestra obtenida se extrae el ADN, posteriormente se realiza una PCR con el estuche comercial Micro-SSP, que amplifica los posibles alelos HLA, para finalmente ser analizados mediante el software HLA visual v2.2.0 (One Lambda, Inc.)



5.2 Diseño del estudio

Se realizó un estudio de caso-control retrospectivo, de individuos no emparentado de la población del Norte de México.

5.3 Pacientes y origen de las muestras

Casos

La colecta de las muestras biológicas incluyeron 49 pacientes originarios del norte de México, de sexo indistinto, sin importar edad, con diagnóstico clínico de leucemia, los cuales acudieron a consulta al Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Monterrey, Nuevo León, en el periodo comprendido entre el año 2006 al 2010.

Controles

Se colectaron muestras de sangre periférica de 189 sujetos sanos no emparentados, originarios de la región norte de México, de sexo indistinto, sin importar edad, que acudieron a realizarse estudios de histocompatibilidad para trasplantes al Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Monterrey, Nuevo León, en el periodo del 2006 al 2009.

5.4 Extracción de ácidos nucleicos

El ADN de las muestras de sangre total se obtuvo por medio del equipo automatizado Maxwell® 16 System (Promega Corporation, USA), que en breve consiste en el aislamiento del ADN de forma automatizada en muestras de sangre



total y capa leucocitaria humanas, mediante el principio de separación de lisis celular y la unión de los ácidos nucleicos a partículas de sílice magnetizadas.

La calidad y concentración del ADN extraído fue verificada espectrofotométricamente con el equipo NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Inc), que cuantifica ácidos nucleicos (A260) y proteínas (280) para medir la concentración y la pureza de las muestras, con una relación A260/A280 entre 1,65 – 1,80 y una concentración final de 100 ng/μl por muestra.

5.5 Tipificación de los alelos HLA-A y -B (Técnica Micro-SSP™)

La tipificación del HLA se realizó por la técnica PCR-SSP (Micro SSP™ HLA ADN Typing Trays, ONE LAMBDA, INC, Canoga Park, CA), a partir de 100 ng/μl de ADN. Las placas de tipificación Micro SSP™ proporcionan los oligonucleótidos específicos para la amplificación por medio la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los alelos HLA-A y -B y del gen de la β-globina humana, como control interno de reacción. Los primers se presentan (liofilizados) en distintos pocillos en una placa para PCR de 96 pocillos, lista para añadir las muestra de ADN, enzima *Taq* polimerasa, y la mezcla D-Mix (dNTPs).

Momentos antes de realizar la PCR los reactivos se llevaron a temperatura ambiente y se agregó 1 μl de H₂O miliQ en el pocillo marcado con un punto rojo de la placa de reacción, que correspondía al control negativo. Posteriormente, se preparó la mezcla de reacción con el volumen apropiado de ADN y *Taq* polimerasa, dependiendo del volumen de la mezcla, como se señala en la Tabla III.

**Tabla III. Condiciones de amplificación**

| Mix (volumen del vial) | ADN 100 ng/ μ l (volumen) | Taq polimerasa 5 U/ μ l (volumen) |
|------------------------------|-------------------------------------|--|
| 1000 μ l | 111 μ l | 6.6 μ l |
| 540 μ l | 59 μ l | 4.0 μ l |
| 360 μ l | 39 μ l | 3.0 μ l |
| 270 μ l | 29 μ l | 2.5 μ l |
| 180 μ l | 19 μ l | 2.0 μ l |

Una vez identificado el vial a utilizar, se agregó la enzima Taq polimerasa con una concentración de 5 U/ μ l al tubo de la mezcla de reacción y se mezcló ligeramente de 5 – 10 segundos con vortex. Posteriormente se adicionaron 9 μ l de la mezcla al pozo del control negativo. Al resto de la mezcla se le adicionó el ADN con una concentración de 100 ng/ μ l, se agitó mediante vortex por 20 seg. y se agregaron 10 μ l de la mezcla de reacción a cada pozo de la placa menos al control negativo. Al terminar de llenarse todos los pozos con sus respectivos volúmenes, se selló la placa con la etiqueta previamente rotulada. La PCR se llevó a cabo en el termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) con el programa de PCR indicado en la Tabla IV.

Tabla IV. Condiciones de PCR

| N° de ciclos | Pasos | Temp. (°C) | Tiempo (seg) |
|-----------------|-------|------------|-----------------|
| 1 | 1 | 96 | 130 |
| | 2 | 63 | 60 |
| 9 | 1 | 96 | 10 |
| | 2 | 63 | 60 |
| 20 | 1 | 96 | 10 |
| | 2 | 59 | 50 |
| | 3 | 72 | 30 |
| Fin | 1 | 4 | ∞ |



Para determinar la presencia del producto amplificado, se preparó un gel de agarosa al 2.5% en el sistema de gel de Micro-SSP™. Una vez polimerizada la agarosa, se retiraron los peines y se agregaron 10 ml de TBE 1X con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio a la cámara de electroforesis. Se transfirieron 10 µl de cada reacción de PCR por orden al gel con una pipeta Research® multicanal (Eppendorf). Posteriormente, se realizó la electroforesis de las muestras a 140–150 voltios hasta que el colorante guía azul haya migrado 0.5 cm en el gel (unos 3–5 minutos, aproximadamente). Para la visualización de los productos amplificados el gel se transfirió a un transiluminador (VWR) de luz UV.

Para la interpretación de los resultados, en el gel se observó la amplificación del control interno β-globina (de migración más lenta) en todos los pocillos de la placa, con excepción del control negativo. Se observó una banda de tipificación positiva en el gel de electroforesis en las muestras que amplificaron un gen HLA específico durante la PCR, lo que indicó un resultado positivo de la prueba (Fig. 8).

| | Reacción Positiva | Reacción Negativa | Ausencia de Amplificación |
|---------------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| Pocillo | | | |
| Banda de Control interno | | | |
| Banda de tipificación positiva | | | |
| Banda de dímeros de primer | | | |

Figura 8. Interpretación de bandas en el gel de agarosa al 2.5%. Para la interpretación de resultados se tomó como una reacción positiva la presencia de dos bandas en el gel de agarosa, como negativa la presencia de una sola banda y como ausencia de amplificación la ausencia de bandas, tal como se ejemplifica en la figura.



5.6 Métodos estadísticos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software para análisis de genética de poblaciones Arlequin v3.11, con el que se estimaron las frecuencias alélicas de la población en estudio. Posteriormente, se realizó una prueba de componentes principales mediante el paquete SPSS v17.0, para sintetizar la información de las frecuencias alélicas y haplotípicas y darle una dimensión a los grupos de manera esquemática en las diferentes poblaciones.



6. RESULTADOS

Se analizaron un total de 238 muestras de individuos no emparentados (Tabla V), de las cuales 189 conformaron el grupo de controles y 49 el grupo de casos, de estos 49 se clasificaron 29 como LLA; Leucemia linfoblástica aguda, 11 como LMA; Leucemia mieloblástica aguda, 6 como LGC; Leucemia granulocítica crónica y 3 como LB; Leucemia bifenotípica, tal como se muestra en la Tabla V. El ADN se extrajo de las muestras como se describió en materiales y métodos, en la Tabla VI se muestran las concentraciones y la calidad de los ADN's utilizados para la amplificación por PCR de los alelos HLA-A y -B. Una vez obtenidos los ADN's con la concentración y calidad optimas, todas las muestras fueron amplificadas por PCR para su tipificación (Fig. 10).

Tabla V. Población de estudio

| CONTROLES | | CASOS | | | |
|------------------|------------|--------------|-----|-----|----|
| | | LLA | LMA | LGC | LB |
| | | 29 | 11 | 6 | 3 |
| n = | 189 | 49 | | | |

LLA; Leucemia Linfoblástica Aguda, LMA; Leucemia Mieloblástica Aguda, LGC; Leucemia Granulocítica Crónica, LB; Leucemia Bifenotípica.



Tabla VI. Concentración y calidad del ADN de las muestras

| Identificación de las muestras | Concentración de ADN | Calidad del ADN relación 260/280 |
|--------------------------------|----------------------|----------------------------------|
| 1 | 100 ng/ μ l | 1.80 |
| 2 | 100 ng/ μ l | 1.74 |
| 3 | 100 ng/ μ l | 1.89 |
| 4 | 100 ng/ μ l | 1.68 |
| 5 | 100 ng/ μ l | 1.73 |
| 6 | 100 ng/ μ l | 1.69 |
| 7 | 100 ng/ μ l | 1.77 |
| 8 | 100 ng/ μ l | 1.67 |
| 9 | 100 ng/ μ l | 1.74 |
| 10 | 100 ng/ μ l | 1.76 |

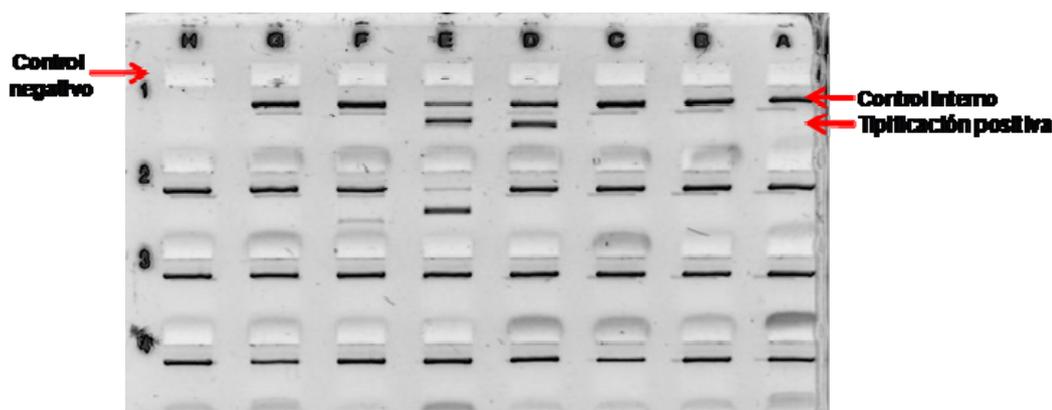


Figura 10. Corrimiento electroforético de la amplificación del HLA-A y -B. Gel de agarosa al 2.5%. Pocillo H1: control negativo; pocillos D1, E1 y E2: tipificaciones positivas; los pocillos restantes fueron tipificaciones negativas, ya que solo amplifican los controles internos de reacción.

Una vez obtenidas las reacciones positivas los resultados fueron analizados en el software HLA visual v2.2.0 (One Lambda, Inc.), para obtener los alelos HLA-A y -B específicos de cada muestra. Posteriormente, por medio del software para análisis de genética de poblaciones Arlequin v3.11, se estimaron las frecuencias alélicas de la población en estudio (Tabla VII). Los alelos HLA-A y -B que se encontraron incrementados significativamente en casos fueron HLA-A*02 (0.408), -A*24



(0.163), -A*68 (0.091), -B*35 (0.224), -B*39 (0.081) y -B*44 (0.061), identificados en color rojo en la Tabla VII y en controles se encontraron con más alta frecuencia los alelos HLA-A*02 (0.287), -A*24 (0.141), -A*68 (0.098), -B*35 (0.171), -B*39 (0.119) y -B*44 (0.095), marcados en color verde en la Tabla VII.

Tabla VII. Distribución de las frecuencias alélicas

| CASOS | | | | CONTROLES | | | |
|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| ALELO HLA-A | FRECUENCIA | ALELO HLA-B | FRECUENCIA | ALELO HLA-A | FRECUENCIA | ALELO HLA-B | FRECUENCIA |
| A*02 | 0.408163 | B*35 | 0.224490 | A*02 | 0.287534 | B*35 | 0.171958 |
| A*24 | 0.163265 | B*39 | 0.081633 | A*24 | 0.141941 | B*39 | 0.119048 |
| A*68 | 0.091837 | B*44 | 0.061224 | A*68 | 0.098067 | B*44 | 0.095238 |
| A*03 | 0.091837 | B*51 | 0.051020 | A*03 | 0.075975 | B*51 | 0.082011 |
| A*01 | 0.081633 | B*07 | 0.061224 | A*01 | 0.075975 | B*07 | 0.060847 |
| A*31 | 0.030612 | B*40 | 0.081633 | A*31 | 0.059075 | B*40 | 0.050265 |
| A*29 | 0.010204 | B*15 | 0.091837 | A*29 | 0.044974 | B*15 | 0.047619 |
| A*11 | 0.051020 | B*14 | 0.040816 | A*11 | 0.037337 | B*14 | 0.042328 |
| A*30 | 0.020408 | B*52 | 0.081633 | A*30 | 0.037037 | B*52 | 0.029101 |
| A*33 | 0.000000 | B*48 | 0.040816 | A*33 | 0.031746 | B*48 | 0.026455 |
| A*23 | 0.010204 | B*62 | 0.000000 | A*23 | 0.021164 | B*62 | 0.023810 |
| A*26 | 0.020408 | B*65 | 0.000000 | A*26 | 0.018519 | B*65 | 0.023810 |
| A*32 | 0.010204 | B*18 | 0.010204 | A*32 | 0.015873 | B*18 | 0.023810 |
| A*25 | 0.000000 | B*08 | 0.040816 | A*25 | 0.007937 | B*08 | 0.021164 |
| A*34 | 0.000000 | B*38 | 0.010204 | A*34 | 0.007937 | B*38 | 0.018519 |
| A*66 | 0.000000 | B*58 | 0.010204 | A*66 | 0.005291 | B*58 | 0.018519 |
| A*74 | 0.010204 | B*49 | 0.010204 | A*74 | 0.005291 | B*49 | 0.015873 |
| A*38 | 0.000000 | B*41 | 0.020408 | A*38 | 0.002879 | B*41 | 0.013228 |
| A*18 | 0.000000 | B*50 | 0.010204 | A*18 | 0.002646 | B*50 | 0.013228 |
| A*22 | 0.000000 | B*57 | 0.020408 | A*22 | 0.002646 | B*57 | 0.013228 |
| A*28 | 0.000000 | B*27 | 0.020408 | A*28 | 0.002646 | B*27 | 0.010582 |
| A*35 | 0.000000 | B*53 | 0.000000 | A*35 | 0.002646 | B*53 | 0.010582 |
| | | B*56 | 0.000000 | | | B*56 | 0.010582 |
| | | B*61 | 0.000000 | | | B*61 | 0.010582 |
| | | B*13 | 0.000000 | | | B*13 | 0.007937 |
| | | B*37 | 0.000000 | | | B*37 | 0.005291 |
| | | B*45 | 0.020408 | | | B*45 | 0.005291 |
| | | B*55 | 0.000000 | | | B*55 | 0.005291 |
| | | B*60 | 0.000000 | | | B*60 | 0.005291 |
| | | B*02 | 0.000000 | | | B*02 | 0.002646 |
| | | B*11 | 0.000000 | | | B*11 | 0.002646 |
| | | B*16 | 0.000000 | | | B*16 | 0.002646 |
| | | B*34 | 0.000000 | | | B*34 | 0.002646 |
| | | B*63 | 0.000000 | | | B*63 | 0.002646 |
| | | B*72 | 0.000000 | | | B*72 | 0.002646 |
| | | B*76 | 0.000000 | | | B*76 | 0.002646 |
| | | B*42 | 0.010204 | | | B*42 | 0.000000 |



Mediante el análisis de componentes principales (análisis multivariado) utilizando las frecuencias alélicas de nuestra población de estudio (casos y controles) podemos apreciar una variabilidad del 97.41% entre los controles y los casos (Fig. 11).

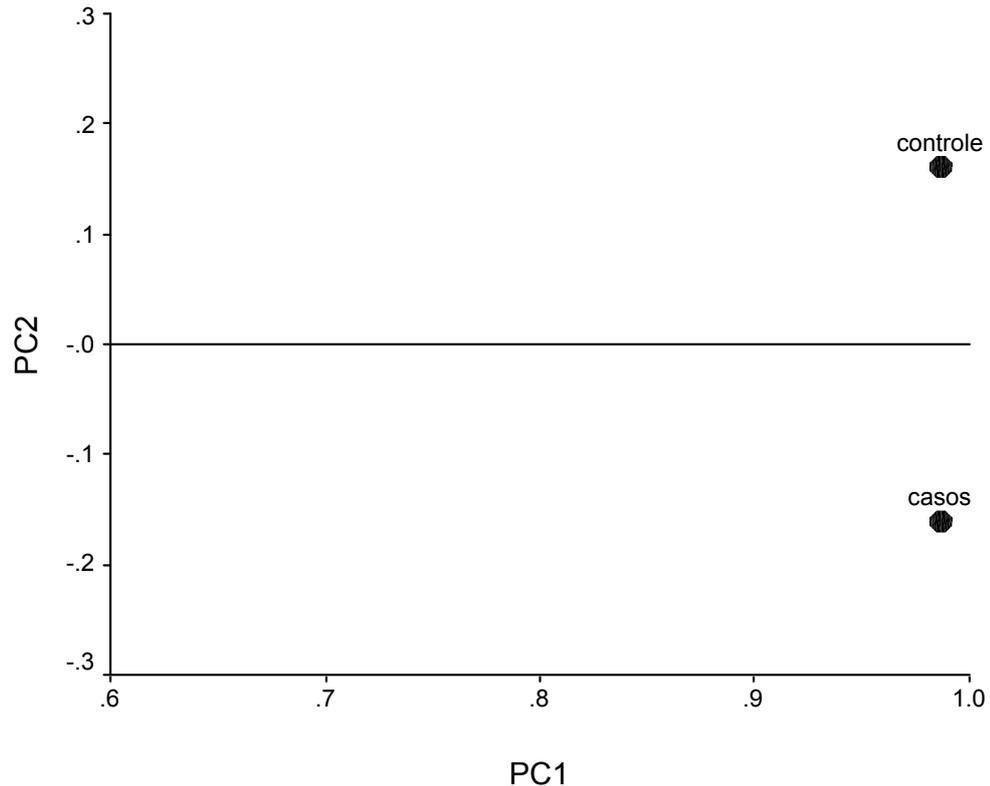


Figura 11. Variabilidad alélica de la población de estudio. Análisis de componentes principales mediante el paquete SPSS v17.0, para representar de manera esquemática la variabilidad alélica de la población de estudio.

Se estimaron las frecuencias haplotípicas mediante el software para análisis de genética de poblaciones Arlequin v3.11, para casos y controles y se encontró que ambos grupos estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P > 0.05$). Para los



controles se encontraron 137 haplotipos y para los casos se encontraron 49 haplotipos (Tabla VIII). El haplotipo más frecuente tanto en casos y controles fue el HLA-A*02/HLA-B*35 con una frecuencia de 0.069 y 0.086, respectivamente. La frecuencia absoluta de este haplotipo para controles fue de 24 que equivale a un 12.7% y para casos fue de 8 equivalente al 16.3%. Dentro de los haplotipos más frecuentes en controles encontramos: a)HLA-A*24/-B*39 con una frecuencia absoluta de 21 (11.1%), el cual se encuentra solo en 3 (6.1%) casos, b)HLA-A*02/-B*51 con una frecuencia absoluta de 16 (8.5%) y 5 (10.5%) en casos, c)HLA-A*29/-B*44 con una frecuencia absoluta de 12 (6.3%), y en casos se encuentra ausente, d)HLA-A*31/-B*35 con una frecuencia absoluta de 15 (7.9%), que en casos se encuentra solo en 2 (4.1%). Dentro de los haplotipos más frecuentes encontrados en casos están: a)HLA-A*02/HLA-B*52, b)HLA-A*02/HLA-B*15, c)HLA-A*24/HLA-B*35 todos con una frecuencia absoluta de 6 (12.2%), haplotipos que en controles se encuentran en muy baja frecuencia ($> 5\%$), como se muestra en la Tabla IX.

Un análisis de componentes principales (Fig. 12), nos representa de manera esquemática, la desviación existente entre el grupo control y el grupo de casos, donde se aprecia que las frecuencias haplotípicas presentan una variabilidad del 80.38%. Lo que indica que las frecuencias haplotípicas de los dos grupos son más variables que las frecuencias alélicas.

**Tabla VIII. Frecuencias haplotípicas estimadas para los loci HLA-A y -B**

| CONTROLES | | | | CASOS | | | |
|-----------|------|------------|---------------------|---------|------|------------|---------------------|
| HLA-A/B | | FRECUENCIA | FRECUENCIA ABSOLUTA | HLA-A/B | | FRECUENCIA | FRECUENCIA ABSOLUTA |
| A*02 | B*35 | 0.069252 | 24 | A*02 | B*35 | 0.086682 | 8 |
| a)A*24 | B*39 | 0.051140 | 21 | a)A*02 | B*52 | 0.057143 | 6 |
| b)A*02 | B*51 | 0.044410 | 16 | b)A*02 | B*15 | 0.056175 | 6 |
| c)A*29 | B*44 | 0.031487 | 12 | c)A*24 | B*35 | 0.056175 | 6 |
| d)A*31 | B*35 | 0.038421 | 15 | A*02 | B*51 | 0.051020 | 5 |
| A*02 | B*39 | 0.024294 | 7 | A*02 | B*40 | 0.040816 | 4 |
| A*02 | B*62 | 0.023810 | 9 | A*68 | B*39 | 0.040816 | 2 |
| A*03 | B*07 | 0.023162 | 9 | A*24 | B*15 | 0.035662 | 3 |
| A*02 | B*15 | 0.023074 | 9 | A*01 | B*08 | 0.030612 | 3 |
| A*68 | B*39 | 0.021765 | 9 | A*02 | B*44 | 0.030612 | 3 |
| A*24 | B*35 | 0.016650 | 5 | A*02 | B*48 | 0.030612 | 3 |
| A*33 | B*65 | 0.015873 | 6 | A*03 | B*35 | 0.030612 | 3 |
| A*02 | B*52 | 0.015662 | 7 | A*24 | B*39 | 0.030612 | 3 |
| A*68 | B*44 | 0.015532 | 6 | A*01 | B*07 | 0.020408 | 2 |
| A*02 | B*40 | 0.015283 | 7 | A*01 | B*44 | 0.020408 | 2 |
| A*24 | B*40 | 0.014903 | 5 | A*03 | B*07 | 0.020408 | 2 |
| A*68 | B*40 | 0.013821 | 5 | A*24 | B*40 | 0.020408 | 2 |
| A*02 | B*18 | 0.013228 | 5 | A*31 | B*35 | 0.020408 | 2 |
| A*24 | B*48 | 0.013228 | 5 | A*68 | B*14 | 0.020408 | 2 |
| A*24 | B*07 | 0.012190 | 5 | A*68 | B*35 | 0.020408 | 2 |
| A*03 | B*44 | 0.011950 | 5 | null | B*52 | 0.014286 | 0 |
| A*01 | B*35 | 0.011666 | 4 | A*01 | B*14 | 0.010204 | 0 |
| A*68 | B*35 | 0.011467 | 6 | A*02 | B*07 | 0.010204 | 1 |
| A*24 | B*51 | 0.011146 | 4 | A*02 | B*38 | 0.010204 | 0 |
| A*02 | B*41 | 0.010582 | 5 | A*02 | B*41 | 0.010204 | 1 |
| A*11 | B*39 | 0.010582 | 4 | A*02 | B*58 | 0.010204 | 1 |
| A*68 | B*48 | 0.010582 | 4 | A*03 | B*42 | 0.010204 | 1 |
| A*01 | B*08 | 0.010241 | 4 | A*03 | B*45 | 0.010204 | 1 |
| A*03 | B*51 | 0.010170 | 4 | A*03 | B*50 | 0.010204 | 1 |
| A*03 | B*14 | 0.009047 | 3 | A*03 | B*57 | 0.010204 | 1 |
| A*31 | B*15 | 0.008576 | 3 | A*11 | B*14 | 0.010204 | 1 |

a, b, c, d) Haplotipos más frecuentes en controles y casos.

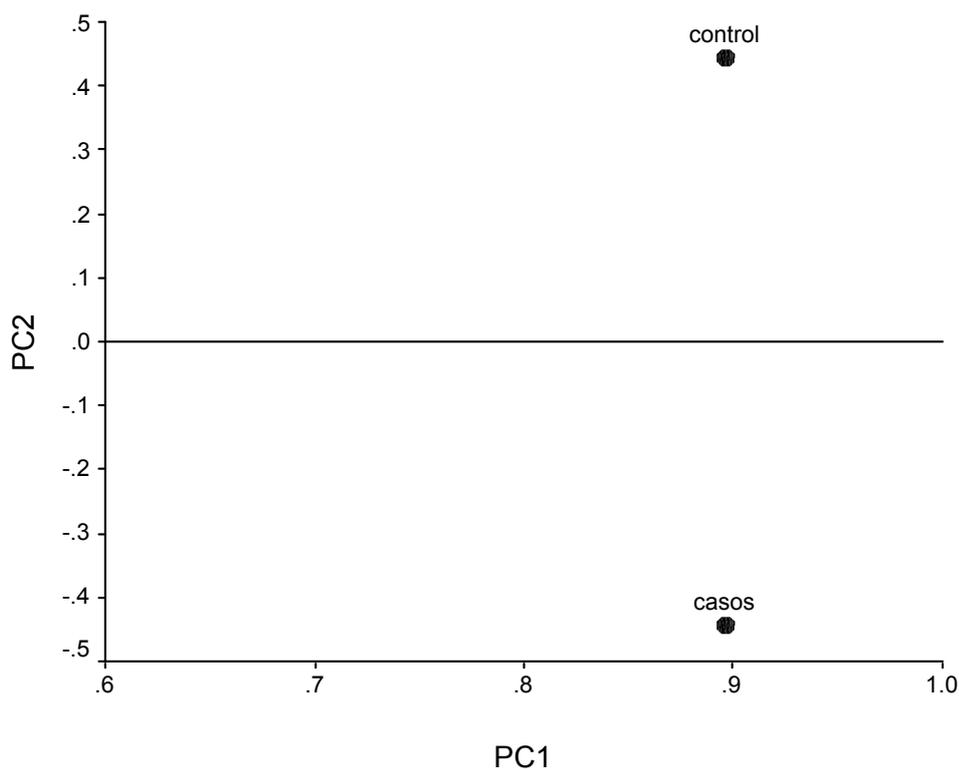


Figura 12. Variabilidad haplotípica de la población de estudio. Análisis de componentes principales mediante el paquete SPSS v17.0, para representar de manera esquemática la distribución HLA-A y -B haplotípica de la población de estudio.

En la tabla IX se presenta el riesgo relativo para los haplotipos HLA-A/B, cuyas frecuencias se encontraron incrementadas significativamente en casos y controles. En este estudio encontramos que el haplotipo HLA-A*02/B*35 es el más frecuente en ambos grupos, pero los haplotipos: HLA-A*02/HLA-B*52 y HLA-A*29-B*44 podrían ser considerados como, un marcador de riesgo ($RR > 1$) para leucemia y un marcador de protección para leucemia ($RR < 1$), respectivamente, dado que el primer haplotipo se encuentra con una frecuencia elevada en casos y en controles lo encontramos en muy baja frecuencia, lo que genera un riesgo relativo mayor a uno y el segundo haplotipo se encuentra en controles pero está ausente en los casos, con un riesgo relativo mayor a uno.



Tabla IX. Riesgo relativo de los haplotipos HLA-A/B

| Haplotipo | Controles n= 189 | Casos n= 49 | χ^2 | P | Riesgo Relativo |
|-------------|---------------------|----------------|----------|-------|---------------------|
| A*02 - B*35 | 24 | 8 | 0.184 | 0.668 | 1.256 (0.573;2.414) |
| A*24 - B*39 | 21 | 3 | 0.589 | 0.443 | 0.582 (0.148;1.653) |
| A*02 - B*51 | 16 | 5 | 0.010 | 0.921 | 1.174 (0.429;2.535) |
| A*31 - B*35 | 15 | 2 | 0.387 | 0.533 | 0.553 (0.094;1.877) |
| A*29 - B*44 | 12 | 0 | 2.084 | 0.149 | 0.000 (1.000;1.440) |
| A*02 - B*52 | 7 | 6 | 3.968 | 0.046 | 2.415 (1.014;4.171) |
| A*02 - B*15 | 9 | 6 | 2.531 | 0.111 | 2.074 (0.859;3.773) |
| A*24 - B*35 | 5 | 6 | 2.913 | 0.087 | 2.345 (0.893;4.169) |
| A*02 - B*40 | 7 | 4 | 0.890 | 0.346 | 1.834 (0.598;3.694) |



7. DISCUSIÓN

Los antígenos leucocitarios humanos (HLA) han sido empleados durante varias décadas como marcadores genéticos para diversos estudios como diversidad genética, en el área de transplantes de tejidos y estudios de susceptibilidad o resistencia a enfermedades. En el presente estudio las frecuencias de haplotipos y alelos HLA-A y -B de sujetos sanos y pacientes con leucemia fueron estudiadas para establecer una correlación entre estos marcadores y la susceptibilidad o protección a esta enfermedad en una población del norte de México.

En este trabajo encontramos que los alelos HLA-A*02 y -B*35 son los más frecuentes tanto en casos como en controles de la población del norte de México, esto concuerda con los resultados obtenidos por Barquera y colaboradores en un estudio con sujetos sanos de la Ciudad de México, de Puebla y Sinaloa, lo que nos indica que la población mexicana es probablemente genéticamente homogénea en cuanto a la frecuencia de los alelos HLA-A y -B. En relación a la frecuencia haplotípica de nuestra población de estudio encontramos que el haplotipo más frecuente tanto en casos y controles fue el HLA-A*02/HLA-B*35, el cual no se encuentra reportado en ningún otro trabajo. Por otra parte encontramos que el haplotipo HLA-A*02/HLA-B*52 podría ser considerado como un marcador de riesgo para el desarrollo de leucemia debido a que se encuentra en alta frecuencia en casos y en muy baja frecuencia en controles con un riesgo relativo mayor a uno



y el haplotipo HLA-A*29/B*44, podría ser un marcador de protección dado que se encuentra presente en controles y ausente en casos con un riesgo relativo mayor a uno, estos son datos de asociación de los antígenos HLA-A y –B con leucemia que no han sido reportados en México.

Cuando comparamos los resultados obtenidos en este estudio de los antígenos del sistema HLA de clase I (-A y –B) asociados a leucemia con los reportados internacionalmente, encontramos un incremento en la frecuencia de los alelos HLA-A*11 y –A*26 en los pacientes con leucemia, lo cual coincide con lo publicado por Orgad S. y cols., para poblaciones de Israel y Gao y cols., en una población China, donde dichos alelos fueron indicados como marcadores de riesgo para leucemia en ambas poblaciones.

En este estudio también determinamos que el alelo HLA-A*33 está presente en la población control y ausente en los casos, lo cual concuerda con lo publicado por Gao y col., en China donde se reporta como un alelo de protección para leucemia.

Con respecto a los alelos HLA-B, nosotros encontramos un incremento en la frecuencia del alelo HLA-B*40 en los pacientes con leucemia con respecto a los sujetos sanos, lo cual correlaciona con los estudios de Ruuska y cols., en Finlandia y el de Cameron y cols., en España en donde determinaron que el alelo HLA-B*40 es un marcador de riesgo para el desarrollo de leucemia.

En este trabajo encontramos la frecuencia del alelo HLA-B*27 incrementada en los pacientes con respecto a los sujetos sanos, lo que concuerda con lo obtenido por W.Y.Au y cols. en China en un estudio de asociación de los alelos HLA de clase I y



leucemia donde reportaron que el alelo HLA-B*27 a pesar de ser uno de los marcadores de riesgo para enfermedades autoinmunes también puede serlo para leucemia.

Por otra parte nosotros encontramos que la frecuencia del alelo HLA-B*39, disminuyó en pacientes con leucemia comparada con los sujetos sanos, lo cual coincide con los resultados de Villalobos C. y cols, en Venezuela donde este alelo es considerado como un marcador de protección al desarrollo de esta enfermedad.



8. CONCLUSIONES

- Los alelos más frecuentes encontrados en nuestros casos y controles fueron el HLA-A*02 y el HLA-B*35.
- El haplotipo más frecuente encontrado en ambos grupos de estudio fue el HLA-A*02/HLA-B*35.
- Encontramos que el haplotipo HLA-A*02-B*52, podría ser un marcador de riesgo ($RR > 1$) para leucemia y el haplotipo HLA-A*29-B*44, podría ser un marcador de protección a esta enfermedad ($RR > 1$).
- De acuerdo a los datos de asociación de alelos HLA-A y -B reportados internacionalmente, se sugiere que los alelos HLA-A*11 HLA-A*26, HLA-B*40 y HLA-B*27 son alelos que pueden ser empleados como marcadores de riesgo para el desarrollo de leucemia y los alelos HLA-A*33 y HLA-B*39 pueden ser alelos protectores para el desarrollo de leucemia.



LITERATURA CITADA

1. Au WY, Hawkins BR, Cheng N, Lie AKW, Liang R and Kwong YL, 2001. Risk of haematological malignancies in HLA-B27 carriers. *British Journal of Haematology* 115; 320-322.
2. Baines M and Ebringer A, 1992. HLA AND DISEASE. *Molec Aspects Med* 13; 263-378.
3. Barquera R, Zuñiga J, Hernández-Díaz R, Acuña-Alonzo V, Montoya-Gama K, Moscoso J, Torres-García D, García-Salas C, Silva B, Cruz-Robles D, Arnaiz-Villena A, Vargas-Alarcón G, Granados J, 2008. HLA class I and class II haplotypes in admixed families from several regions of Mexico. *Molecular Immunology* 45; 1171–1178.
4. Cameron ES, Labastide WB, Wilson V, Charles W, Holder Y, Reid HF, 1990. Immunophenotypic and HLA studies in childhood acute lymphoblastic leukemia in Trinidad, West Indies. *Leukemia* 4; 615-9.
5. Chhaya SU, 2006. Human leukocyte antigens in Indian patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 47; 291-5.
6. Fatma SO *et al.*, 2003. HLA Systemm Affects the Age-at-Onset in Chronic Myeloid Leukemia. *American Journal of Hematology* 73; 256-262.
7. Fernández J *et al.*, 1991. HLA y enfermedades. *Revista Medica Hondureña*. 59; 151-154.
8. Flores A, Kalayoglu S, A. Diler AS, Tozki H, Sargin D, Carin M, and Dorak MT, 2009. Estructura genética de tres poblaciones mexicanas en base al sistema HLA-A. *Respyn* vol. 10(4).
9. Gao SQ, Deng ZH, Jin SZ, Zhang SY, Zhang X, Wu GG, 2005. Study on the correlation between acute lymphoblastic leukemia and HLA genes in southern China Han population. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 13; 439.



10. Glenn ER, 2000. HLA beyond Tears. De Novo, Inc. pp. 1-20.
11. Haugler C and Liwski R, 2010. Human leukocyte antigen class I alleles and the risk of chronic myelogenous leukemia: a meta-analysis. *Leukemia & Lymphoma* 1-5.
12. HLA Nomenclature
http://hla.alleles.org/nomenclature/nomenclature_2009.html [Revisado el 27 de Abril de 2010].
13. IMSS, 2008. El cáncer, segunda causa de muerte en niños mexicanos, después de los accidentes. México.
14. Jan K, 2000. The HLA System First of Two Parts. *Massachusetts Medical Society* 343; 702-709.
15. Li D, Xi B, Liu HY, Yu Y, 2005. Association of gene HLA-class I with leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 13; 563-6.
16. Margaret HLNG, Lau KM, Hawkins BR, Chik KW, Chan NPH, Wong WS, Tsang KS, Shing MMK, Li CK, 2006. HLA-B67 may be a male-specific HLA marker of susceptibility to relapsed childhood ALL in Hong Kong Chinese and HLA-A33 or HLA-B17 signifies a higher presentation leukocytosis: a retrospective analysis on 53 transplant candidates (1989-2003). *Ann Hematol* 85; 535-541.
17. Miao KR, Pan QQ, Xue M, Fan S, Wang XY, Pan M, Zhou XY, Fei XM, Zhao X, Wang CY, 2007. Human leukocyte antigens in 295 Chinese patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 48; 2152-6.
18. Morales JA, Pérez JCJ, Guerra CM, Rojas MRS, Almaguer DG, 2006. Diversidad de antígenos leucocitarios humanos A, B, DQB1 y DRB1 en células de sangre de cordón umbilical criopreservadas en el Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González. *Med Univer* 8(33): 212-219.
19. Mortimer M *et al.*, 1987. HLA Associations With Leukemia. *Blood* 70; 227-232.
20. Naugler C and Liwski R, 2009. HLA risk markers for chronic myelogenous leukemia in Eastern Canada. *Leuk Lymphoma* 50; 254-9.
21. Navarrete C, Alonso A, Awad J, McCloskey D, Ganesan TS, Amess J, Lister TA, Festenstein H, 1986. HLA class I and class II antigen associations in acute leukaemias. *J Immunogenet* 13; 77-84.



22. Orgad S, Cohen IJ, Neumann Y, Vogel R, Kende G, Ramot B, Zaizov R, Gazit E, 1988. HLA-A11 is associated with poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leukemia* 2; 79S-87S.
23. Pérez M, 2005. HLA y enfermedad. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 43; 91-93.
24. Posthuma EFM, Falkenburg JHF, Apperley JF, Gratwohl A, Roosnek E, Hertenstein B, Schipper RF, Schreuder GMT, D'Amato J, Oudshoorn M, Biezen JH, Hermans J, Willemze R and Niederwieser D, 1999. HLA-B8 and HLA-A3 Coexpressed With HLA-B8 Are Associated With a Reduced Risk of the Development of Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* 11; 3863-3865.
25. Rizo RP, 2007. Registro Hospitalario de Cáncer: Compendio de Cáncer 2000-2004. *Cancerología* 2; 203-287
26. Rosell AI. Leucemias. Disponible en el sitio web: <http://www.scribd.com/doc/31435074/LEUCEMIAS>.
27. Ruuska P, Silvennoinen-Kassinen S, Timonen T and Tiilikainen A, 1984. Chronic myelocytic leukaemia: HLA association and decreased erythrocyte C3b receptor expression. *Clin exp. Immunol* 59; 300-304.
28. Smith MT, McHale CM, Wiemels JL, Zhang L, Wiencke JK, Zheng S, Gunn L, Skibola CF, Ma X and Buffler PA, 2005. Molecular biomarkers for the study of childhood leukemia. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206; 237-245.
29. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H and Kulski JK, 2009. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *Journal of Human Genetics* 54; 15-39.
30. Taylor M, Hussain A, Urayama K, Chokkalingam A, Thompson P, Trachtenberg E and Buffler P, 2009. The human major histocompatibility complex and childhood leukemia: An etiological hypothesis based on molecular mimicry. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 42; 129-135.
31. Villalobos C, Rivera S, Weir-Medina J, Hassanhi M, Montiel M and González R, 2003. HLA class I and leukemia association in mestizo patients from Zulia state, Venezuela. *Invest Clín* 44(4): 283 – 289.
32. Wei L, Xiao LL, Wu XY, Lin Q, Dong M, Wen JY, Ma XK, Chong F, 2008. Expression and analysis of HLA-A, B and DRB1 genes in patients



with chronic myelogenous leukemia in Guangdong area. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 16; 915-8.



RESUMEN BIOGRÁFICO

Michelle de Jesús Zamudio Osuna

Candidato para el grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Inmunobiología

Tesis: ASOCIACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LOS ALELOS HLA DE CLASE I Y LEUCEMIA EN PACIENTES DEL NORTE DE MÉXICO.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en Mazatlán, Sinaloa el 16 de Junio de 1981.

Educación: Egresada de la Facultad de Biología, de la Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán Rosales, Sinaloa. Grado obtenido Bióloga con especialidad en Biología Experimental en 2004.

Experiencia Profesional: 1998, Prácticas Profesionales en Laboratorios Químicos “Benitez Torres”, Mazatlán, Sinaloa. 1999, Servicio Profesional en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), Mazatlán, Sinaloa. 2003, Seminario de Investigación “Caracterización del genotipo NAT2 en una pequeña muestra estudiantil de diferentes partes de México” en el Lab. de Biología Celular del depto. de bioquímica, Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, Nuevo León. 2004, Servicio Social elaboración del “Manual de métodos ecológicos de muestreo y análisis de vegetación” Escuela de Biología y Facultad de Ingeniería, U.A.S., Culiacán Rosales, Sinaloa. 2005, Tesis de Licenciatura “Frecuencia del polimorfismo C3435T en el gen MDR 1 y su relación con la actividad de la glicoproteína-P en linfocitos de sujetos voluntarios sanos” en el Lab. de Biología Celular del depto. de bioquímica, Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, Nuevo León. 2005, Técnico de Laboratorio, encargada del área de Secuenciación en el Lab. de Biología Molecular, del depto. de Bioquímica, de la Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, Nuevo León. 2006, Bióloga analista del la Unidad de Diagnostico Molecular, del depto. de Bioquímica, de la Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, Nuevo León. 2006, Bióloga analista del lab. de Medicina Molecular, del Servicio de Hematología, Hospital Universitario, U.A.N.L., Monterrey, Nuevo León.