

00377



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**POLIMORFISMO DE LOS GENES TAP EN  
POBLACIÓN MEXICANA CON NEUMONITIS  
POR HIPERSENSIBILIDAD**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A :  
**Q.C. ARNOLDO AQUINO GÁLVEZ**



DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA

MÉXICO, D.F.



COORDINACIÓN

JUNIO 2004

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FF00

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

1972



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Arnoldo Aquino Galvez  
FECHA: 16 Junio 2004  
FIRMA: [Firma manuscrita]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de la Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 19 de abril del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Aquino Galvez Arnoldo**, con número de cuenta 501093635, con la tesis titulada: **"Polimorfismo de los Genes Tap en Población Mexicana con Neumonitis por Hipersensibilidad"**, bajo la dirección del(a) **Dr. Moisés Eduardo Selman Lama**.

Presidente:	Dra. Annie Pardo Semo
Vocal:	M. en C. Teresa Imelda Fortoul Van der Goes
Secretario:	M. en C. Moisés Eduardo Selman Lama
Suplente:	M. en C. Julio Granados Arreola
Suplente:	Dr. Carlos Ramos Abraham

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 20 de mayo de 2004.

  
Dr. Juan José Morrone Lupi  
Coordinador del Programa



Sueña lo que quieras soñar;  
Ve a donde quieras ir;  
Sé lo que quieras ser,  
Porque sólo tienes una vida y una oportunidad para hacer todas las cosas que  
quieres hacer

Dedicatorias.

Deseo que sepan por este medio cuanto los aprecio y que no hay palabra que pueda definir o abarcar toda la gratitud que siento ante todas las personas que de alguna forma mencionaré en esta página, por todas las lecciones que con paciencia, amor, trabajo y dedicación he recibido de todos ustedes.

A Dios, gracias por todo lo que me has dado, por las lecciones de vida, por darme la oportunidad de vivir y disfrutar los logros y fracasos, por dejarme rodear de toda esta gente que mucho me han enseñado, por dejarme superar cada día mas, por dejarme disfrutar estos momentos.....

Mamá y Papá. Saben que la distancia me ha hecho valorarlos tanto, solo quiero decirles que este trabajo -en parte suyo- no habría sido posible; gracias por todo lo que me han dado.

Hermanos. Por todo su apoyo y comprensión en todos los momentos. A ti Hita, recuerda que te quiero mucho y reconozco tu esfuerzo y dedicación.

Paty. Por la paciencia, cariño, confianza y por estar a mi lado siempre a pesar de todo, gracias por creer en mi, por darme la oportunidad. Te Quiero..

Ángel Camarena con respeto y cariño por todo el apoyo y confianza que ha depositado en mi, muchas gracias.

Army. Gracias por los consejos, las revisiones y por la ayuda que siempre me brindó, le estaré siempre muy agradecido.

Clau. Simplemente ¡Gracias! por compartir buenos y malos momentos y por estar siempre cuando te necesito.

## Agradecimientos

A los miembros de mi comité tutorial por la paciencia que tuvieron para conducirme a lo largo de este trabajo, en donde sus invaluable enseñanzas, recomendaciones y consejos, enriquecieron -en mucho- mi persona.

Dra. Annie Pardo. Por todas las enseñanzas y comentarios en pro de mejorar.

Dr. Moisés Selman. Por su apoyo y paciencia, por motivarme a ser mejor, por haber sido mi director de tesis y guíarme en este proyecto.

Dr. Julio Granados. Por sus enseñanzas, apoyo y confianza.

A los catedráticos que tuve durante los cursos. Por trasmitirme sus conocimientos e interesarse en el aprendizaje de todos los que fuimos sus alumnos.

A mi director de tesis. Eternamente agradecido.

A los miembros del jurado en el examen de grado por todo el apoyo.

Dra. Annie Pardo.

M. en C. Teresa Imelda Fortoul Van der Goes

M. en C. Moisés Selman.

M. en C. Julio Granados.

Dr. Carlos Ramos Abraham

Amigos. Dedicado a ustedes, ya que sin sus consejos y paciencia, no lo hubiera logrado. Por todos los buenos y malos ratos que hemos pasado.

Gabriel. Por su paciencia e interés en enseñarme un poco de Biología Molecular.

Clau. Por sus valiosos consejos, compañía y tolerancia conmigo. Por ser mi mejor amiga.

Jorge y Héctor. Por brindarme su apoyo y amistad por haber compartido momentos super padres que no se olvidarán y por ser los mejores amigos que hasta el momento he tenido.

Javier. Por ser mi amigo y apoyo.

Doroteo. Por la compañía y por el gran apoyo que me has brindado en todo momento

Georgina. Por todos las recomendaciones y consejos.

Cecy, Gloria S<sup>2</sup>, Gracias!!

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunogenética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, bajo la dirección y asesoría del Dr. Moisés Selman, con la asesoría interna del Investigador Ángel Camarena, Biol. Armida Juárez y Biol. Gabriel Sandoval

El presente trabajo de investigación fue realizado con el apoyo de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Agradezco a las siguientes Instituciones por el apoyo.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)  
Sistema Nacional de Investigadores (SNI)  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)

"La imaginación es más importante que el conocimiento."

*Albert Einstein*

"El sentido común es la cosa que todos necesitan, pocos lo tienen y ninguno cree que le falte".

*Benjamín Franklin*

## ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras.....	1
Índice de tablas.....	2
Lista de abreviaturas.....	3
I. Resumen.....	6
II. Antecedentes.....	7
II.I Neumonitis por hipersensibilidad.....	7
II.II Respuesta inmune en neumonitis por hipersensibilidad.....	8
II.III Susceptibilidad genética y neumonitis por hipersensibilidad.....	9
III. Complejo principal de histocompatibilidad.....	9
III.I Organización genética.....	10
Clase I .....	11
Clase II.....	11
Clase III.....	11
Clase IV.....	11
IV. Genes TAP .....	13
IV.I Localización y estructura de TAP1 y TAP2 .....	13
IV.II Organización genómica de TAP.....	14
IV.III Función Biológica.....	16
IV.IV Vías de procesamiento antigénico.....	16
IV.IV.I Por clase I.....	16
IV.IV.II Por clase II.....	18
IV.IV.III Vías alternas de procesamiento antigénico .....	19
IV.V Polimorfismo. ....	21
IV.VI TAP y enfermedades.....	23
IV.VI.I TAP y Cáncer.....	24
IV.VI.II Síndrome de deficiencia de TAP.....	24
IV.VI.III Inhibidores virales de TAP.....	26
IV.VII Herencia.....	26
IV.VIII Análisis de enlace.....	27
IV.IX Desequilibrio de enlace.....	27
V Justificación: .....	28
VI Hipótesis.....	29
VII Objetivo general.....	30
VIII Objetivos particulares.....	30
IX Metodología. ....	31
IX.I Métodos: .....	32
IX.I.I Extracción de DNA.....	32
IX.I.II Cuantificación de DNA.....	34
IX.I.III Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	34
IX.I.IV Electroforesis.....	35
IX.I.V PCR-SSO .....	35
X. Resultados.....	38
XI. Discusión .....	42
XII. Conclusión .....	48
XIII. Bibliografía .....	56

## Índice de figuras

Mapa del MHC que incluye la región de clase IV	Figura 1
Localización genética de TAP1 y TAP2 dentro del MHC humano	Figura 2
Estructura de las proteínas TAP	Figura 3
Representación esquemática del procesamiento por clase I	Figura 4
Representación esquemática del procesamiento por clase II	Figura 5
Comparación de regiones involucradas en la determinación de polimorfismos del gen TAP1 en otros estudios	Figura 6
Comparación de regiones involucradas en la determinación de polimorfismos del gen TAP1 en nuestro estudio (población mestiza mexicana)	Figura 7
Esquema general del estudio	Figura 8
Alineación de la secuencia de aminoácidos de la base de datos del Instituto de investigación Anthony Nolan	Figura 9

## Índice de tablas

Clasificación de los genes HLA en cuatro clases	Tabla 1
Enfermedades asociadas a algunos alelos de TAP	Tabla 2
Frecuencias fenotípicas (FF) y génicas (FG) de TAP1, en 58 sujetos sanos, mestizos mexicanos	Tabla 3
Frecuencias alélicas de TAP1 en diferentes poblaciones	Tabla 4
Frecuencia de combinaciones entre alelos del locus HLA-DR y HLA-TAP1	Tabla 5
Frecuencia de combinaciones entre alelos del locus HLA-DQ y HLA-TAP1	Tabla 6
Frecuencia de combinaciones entre alelos del locus HLA-B y HLA-TAP1	Tabla 7
Frecuencias Haplotípicas HLA-B-DR-DQ-TAP1	Tabla 8
Frecuencias Haplotípicas de HLA DRB1*-DQB1* en Mestizos Mexicanos reportadas por dos grupos de Investigación	Tabla 9
Frecuencias fenotípicas (FF) y génicas (FG) de TAP1 en 73 pacientes con NH	Tabla 10
Frecuencias génicas de TAP1* en las distintas poblaciones del estudio	Tabla 11

## Lista de abreviaturas

aa	Aminoácido
ABC	ATP-Binding Cassette
ALDP	Proteína de Adenoleucodistrofia
Ag	Antígeno
Ala	Alanina
Asp	Ácido Aspartico
ATP	Adenosin-trifosfato
AIF-1 o G1	Factor Inflamatorio del Injerto -1
ARMS	Sistema de Amplificación Refractaria a la Mutación
BAT1	Trasportador de Ácidos Biliares
Bf	Factor B
B144	Trascrito específico de leucocitos
C	Complemento
C2	Factor 2 del complemento
C4	Factor 4 del complemento
CD4	Marcador de Linfocitos T cooperadores
CD8	Marcador de Linfocitos T citotóxicos
CIITA	Transactivador de Clase II
CLIP	Péptido de Cadena Invariante Asociado a clase II
CFTR	Regulador de conductancia transmembranal de la fibrosis cística
CTLA-4	Antígeno de los Linfocitos T Citotóxicos 4
dNTP's	Mezcla de desoxinucleótidos
DNA	Acido desoxiribonucleico
DP	Locus P
DQ	Locus Q
DR	Locus R
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima
FF	Frecuencia Antigénica
FG	Frecuencia Génica
FH	Frecuencia Haplotípica
Gly	Glicina
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HLA	Antígenos leucocitarios Humanos
Hrs	Horas
HSV-1	Virus del herpes simple tipo I
IC	Intervalo de Confianza
ICP47	Proteína viral del Herpes Simple
IL	Interleucinas
Ile	Isoleucina
IMG/HLA	Base de datos de Inmunogenética/HLA
INF	Interferón
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias



IkBL	IkappaB
Kb	Kilobase
KD	Kilodaltones
LBA	Lavado Bronquio-Alveolar
Li	Cadena Invariante
LMP	Proteosomas de bajo peso molecular
LMP2	polipéptido de bajo peso molecular
LMP7	polipéptido de bajo peso molecular
LTA	linfotoxina A
LTB	linfotoxina B
LST-1	Trascrito específico de leucocitos
MDR	Multidrogorresistencia
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
MICA	Genes relacionados a MHC clase I-A
MICB	Genes relacionados a MHC clase I-B
MIIC	Compartimiento de clase II
mi	Mililitros
μl	Microlitros
NH	Neumonitis por Hipersensibilidad
N.S.	No Significativo
nm	nanometros
NK	Asesinas Naturales
NBD	Dominio de Unión A Nucleotidos
NFκB	Factor de transcripción
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds Ratio
21-OH	21- Hidroxilasa
Pb	Pares de Bases
Pc	P corregida
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RNA	Acido Ribonucleico
R.E.	Retículo Endoplásmico
RFXANK	Factor de Transcripción
RFX5	Factor de Transcripción
RFXAP	Factor de Transcripción
RFLP	Polimorfismo de los Fragmentos largos de restricción
Rpm	Revoluciones por minuto
RR	Riesgo Relativo
RING 4	Trasportador involucrado en la presentación de antígenos (TAP1)
RING 11	Trasportador involucrado en la presentación de antígenos (TAP2)
SSCP	Polimorfismo Conformacional de Cadena Simple
SDS	Dodecil sulfato de Sodio
SSC	Solución Salina de Citratos
SSO	Oligonucleótido Secuencia Específica
SLD	Síndrome del Linfocito Desnudo
STE6	Proteína transportadora en levaduras perteneciente a la familia ABC
Ski2	Súper asesina -2 en levadura

Sk12w	Gen de la Hélicasa Humana
TAP	Proteínas Transportadoras de Péptidos Antígenicos
Thr	Tirosina
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
T $\gamma\delta$	Células T gama-delta.
TMDs	Dominio de trasmembrana
Val	Valina
U.V.	Luz Ultravioleta

## I. Resumen.

La Neumonitis por Hipersensibilidad (NH), es una enfermedad inflamatoria difusa del parénquima pulmonar provocada por una reacción inmune exagerada a la inhalación repetida de partículas orgánicas. Sólo una pequeña parte de los individuos expuestos estos antígenos desarrolla este padecimiento. En este contexto, se ha postulado la existencia de factores genéticos de susceptibilidad o resistencia. Debido a su papel en el procesamiento de antígenos, su localización dentro del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y su polimorfismo, los genes TAP (Transportadores de péptidos antigénicos) son candidatos importantes para el estudio de asociación con esta enfermedad. Dentro de este marco, el objetivo de este estudio fue determinar la asociación de los genes TAP1 con la NH. Para esto se estudiaron a 58 sujetos sanos (grupo control) seleccionados al azar y 73 pacientes con NH a los que se les tomó una muestra de sangre venosa con EDTA como anticoagulante para la obtención de DNA genómico. Los alelos TAP1 se determinaron por reacción en cadena de la polimerasa en su modalidad de hibridación con nucleótido secuencia específica (PCR-SSO), la que nos permitió la asignación más precisa de alelos. Los resultados mostraron una disminución significativa del alelo TAP1\*02012 en los pacientes con neumonitis por hipersensibilidad con relación a los sujetos normales. El análisis estadístico reveló una razón de momios de 0.08 (IC 0.00-0.57) con una P corregida <0.002. Esta disminución pareció a expensas del alelo TAP1\*02011 el cual se encontró incrementado en el grupo de pacientes en comparación con controles sanos (OR de 4.19, IC 0.84-28.30). Sin embargo, este incremento no alcanzó significancia estadística. Estos resultados sugieren que el alelo TAP1\*02012 puede desempeñar un papel protector para el desarrollo de esta enfermedad. Adicionalmente, se realizó un análisis de haplotipos de 57 sujetos de los cuales 38 eran relacionados (pertenecientes a 12 familias) y 19 de población no relacionada, y se establecieron las frecuencias haplotípicas. Este análisis reveló que existen 66 combinaciones diferentes en las que predomina el haplotipo HLA B61 DR4 DQ8 TAP1\*0101 con una frecuencia de 0.061 (6.14 %).

## **II. Antecedentes**

### **II.I. Neumonitis por hipersensibilidad**

La Neumonitis por Hipersensibilidad (NH), también conocida como alveolitis alérgica extrínseca, es una enfermedad inflamatoria difusa del parénquima pulmonar provocada por la inhalación repetida de partículas orgánicas y que afecta a bronquiolos, alvéolos y espacio intersticial (1). La respuesta inflamatoria está mediada principalmente por una respuesta inmunológica exagerada que ocurre en un hospedero susceptible (2, 3). La secuencia de los eventos inmunopatológicos no se conoce con precisión aunque la mayoría de las evidencias apoyan el concepto de que se trata de una hiperreactividad mediada por linfocitos T; sin embargo la formación de complejos inmunes puede participar en los cuadros agudos (4, 5).

La NH puede ser producida por una amplia variedad de partículas orgánicas y agentes químicos que de manera general puede subclasificarse en hongos, actinomicetos, proteínas heterólogas y compuestos químicos de bajo peso molecular (1, 4).

En México, la causa más frecuente de esta enfermedad se relaciona con la exposición a diferentes tipos de aves, en especial, palomas, pichones y pericos australianos (6). El padecimiento parece ser frecuente y aunque la magnitud del problema en el país no se conoce con precisión, en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias se atienden en promedio de 70 a 80 casos nuevos por año, y se reciben solicitudes de interconsulta adicional de diferentes Estados de un número similar de pacientes.

La enfermedad se puede presentar en 3 formas clínicas: aguda, subaguda y crónica. La forma aguda ocurre 6-8 horas después de la exposición a cantidades elevadas del antígeno.

Las formas subagudas y crónicas se caracterizan porque la enfermedad se desarrolla lentamente, en semanas (subaguda) o meses/años (crónica) después de la exposición constante a bajas concentraciones del antígeno. En términos generales, la neumonitis por hipersensibilidad por aves que se observa en México se caracteriza por una forma clínica subaguda/crónica provocada por la exposición

prolongada al antígeno aviario, que afecta predominantemente a mujeres entre la 2° y 5° décadas de la vida (6-8). De hecho, más del 90% de los casos de NH atendidos en el INER en los últimos 20 años son mujeres.

Por otro lado, es importante destacar que cuando la NH subaguda/crónica progresa, se producen lesiones fibrosantes que destruyen el parénquima pulmonar y en este contexto, aproximadamente el 30% de los pacientes desarrollan una enfermedad progresiva, incapacitante e irreversible, lo cual provoca la muerte de la mayoría de estos casos en un lapso de 5 años (6-8). A la fecha se ignoran los mecanismos responsables del inicio de esta respuesta fibrosante, aunque estos parecen involucrar diferentes y complejas interacciones celulares y moleculares (9-14). En otras palabras, el porqué unos enfermos mejoran o curan y otros progresan a la fibrosis se desconoce.

## **II.II. Respuesta inmune en Neumonitis por hipersensibilidad**

La neumonitis por hipersensibilidad se caracteriza por una respuesta inflamatoria compleja ante la inhalación del antígeno y que involucra varias subpoblaciones celulares del sistema inmune así como numerosos mediadores (4, 15, 21).

Los eventos iniciales en el desarrollo de la NH se caracterizan por la activación de células presentadoras de antígenos relacionadas con moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (4,19). Esto resulta en la unión específica de dichas moléculas con el receptor de las células T CD4+, lo cual provoca la activación, proliferación y diferenciación de diversas clonas en subtipos de células T que en primera instancia contribuyen a la formación de anticuerpos por células B. En esta primera fase, si la concentración de antígenos es muy elevada, las reacciones que inician el daño pulmonar agudo se relacionan con la formación de complejos inmunes *in situ*, resultado de la interacción del antígeno inhalado con anticuerpos IgG específicos producidos en el tejido pulmonar (18, 21, 22). Este hecho desencadena dos eventos críticos: la activación de la cascada del complemento y la activación de macrófagos alveolares e intersticiales y ambos mecanismos están involucrados en la patogénesis de la forma aguda de la enfermedad.

Las formas subagudas/crónicas de la NH son mediadas por células T las cuales son las responsables de la inflamación intersticial linfocitaria y granulomatosa que caracteriza a estas fases (4, 23, 24).

En el intersticio y los espacios alveolares del parénquima pulmonar la interacción del antígeno, las células presentadoras y las células T CD4+ de memoria inician la activación, proliferación clonal y diferenciación de las células T CD4+ en múltiples subpoblaciones (25). Si la exposición al antígeno continúa, estas reacciones inducen la formación de granulomas y promueven que las células inflamatorias elaboren factores de crecimiento que estimulan la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena produciendo fibrosis intersticial (4, 11, 26, 27).

### **II.III. Susceptibilidad genética y Neumonitis por hipersensibilidad**

Es importante enfatizar que sólo una pequeña parte de los individuos expuestos a la inhalación de partículas orgánicas desarrolla este padecimiento. En este contexto, se ha postulado la existencia de factores genéticos de susceptibilidad o resistencia, aunque estos no han sido completamente esclarecidos (4). Al menos parte de la susceptibilidad genética se encuentra relacionada con el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y polimorfismos del promotor del factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), como hemos demostrado previamente en población mexicana con esta enfermedad inducida por antígeno aviario (3). En dicho estudio se encontró una asociación estrecha entre algunos alelos y haplotipos del MHC clase II y el desarrollo de NH. Además se observó una contribución importante del TNF 308<sup>-2</sup> en el fenotipo de la enfermedad, ya que los sujetos portadores de dicho alelo mostraban una enfermedad mas acelerada.

Los resultados de este estudio sugieren que la respuesta pulmonar inflamatoria al antígeno aviario puede estar modulada por diferentes genes ubicados en diversas regiones del complejo principal de histocompatibilidad.

### **III. Complejo principal de histocompatibilidad**

La colección extendida de genes sobre el brazo corto del cromosoma 6 en la banda 6p21.31 es llamada complejo principal de histocompatibilidad. Es una región muy densa de genes (28, 29), que fue originalmente descubierta en 1937 por Peter Gorer debido a su importancia en el rechazo o aceptación de los



trasplantes ya que presenta una función decisiva para la viabilidad del injerto. (29, 30). El primer reporte de asociación entre el MHC y la susceptibilidad o resistencia a determinada enfermedad fue realizado por Lilly en 1964 al encontrar, en ratones, ciertos genes que le conferían resistencia a padecer leucemia inducida por el virus de Gross (29, 30). Amiel estableció la primera asociación del sistema HLA con la enfermedad en 1967 al encontrar en pacientes con enfermedad de Hodgkin un antígeno con mayor frecuencia que en la población en general (30). Posteriormente se demostró que el sistema HLA se encontraba relacionado con el desarrollo de numerosas enfermedades (30, 31)

Las primeras caracterizaciones de los antígenos específicos del sistema HLA se llevaron a cabo con pruebas de microcitotoxicidad que permitieron identificar los diferentes locus de las clases I y II (A, B, C, DQ, DR, DP). Actualmente, los métodos de DNA recombinante han sido de gran ayuda para delinear los genes de este sistema y la cristalografía ha permitido determinar su función en la respuesta inmunitaria (31, 32, 33).

### III.I. Organización genética.

El MHC es una región del genoma humano de alrededor de 8000 Kb que se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (figura 1 y 3) y que esta constituido al menos, por el siguiente grupo de genes: A, B, C, DR, DP, DQ, C2, C4, FB (34, 35, 36). Klein propuso una clasificación basándose en la estructura, distribución y función. Sin embargo en 1997 Given y Weissman, propusieron dividir esta región en cuatro clases sugiriendo que existe una concentración de genes que es distinta a las otras tres propuestas con anterioridad, con lo que se les designo como genes de la clase IV (**tabla 1**)

Clase I	Clásicos.- A, B, C No clásicos.- E, F, G, H, J y X
Clase II	Funcionales.- DR, DP, DQ No funcionales.- DM, DO, TAP, LMP
Clase III	C2, C4A, C4B, fB y 21OH
Clase IV	TNF, LTA, LTB, B144, 1C7, AIF-1, Hsp70, Sk12w, IkBL, BAT1, MICA, MICB.

**Tabla 1.-** Clasificación de los genes HLA en cuatro clases.

**La región genética de clase I** es una región compleja con genes que codifican para la cadena pesada, altamente polimórfica de los antígenos HLA clase I. Ésta ha sido estudiada detalladamente y así fue posible descubrir tres nuevas clases de genes que codifican para una cadena pesada de los antígenos HLA clase I diferente a la que ocupan los genes llamados "clásicos". Estos genes han sido denominados "no clásicos", y su función se desconoce. Del mismo modo se ha determinado la existencia de pseudogenes (genes que no expresan productos proteicos). (37,38, 39).

**La región genética de clase II** contiene una gran variedad de genes localizados en una región de aproximadamente 6 millones de pares de bases dentro del cromosoma 6 (40). Esta región ha sido subdividida en tres subregiones designadas como DR, DQ y DP en la que cada una de ellas codifica para, al menos, un grupo de cadenas funcionales alfa y beta. Las regiones principales han sido llamadas regiones funcionales (37, 41).

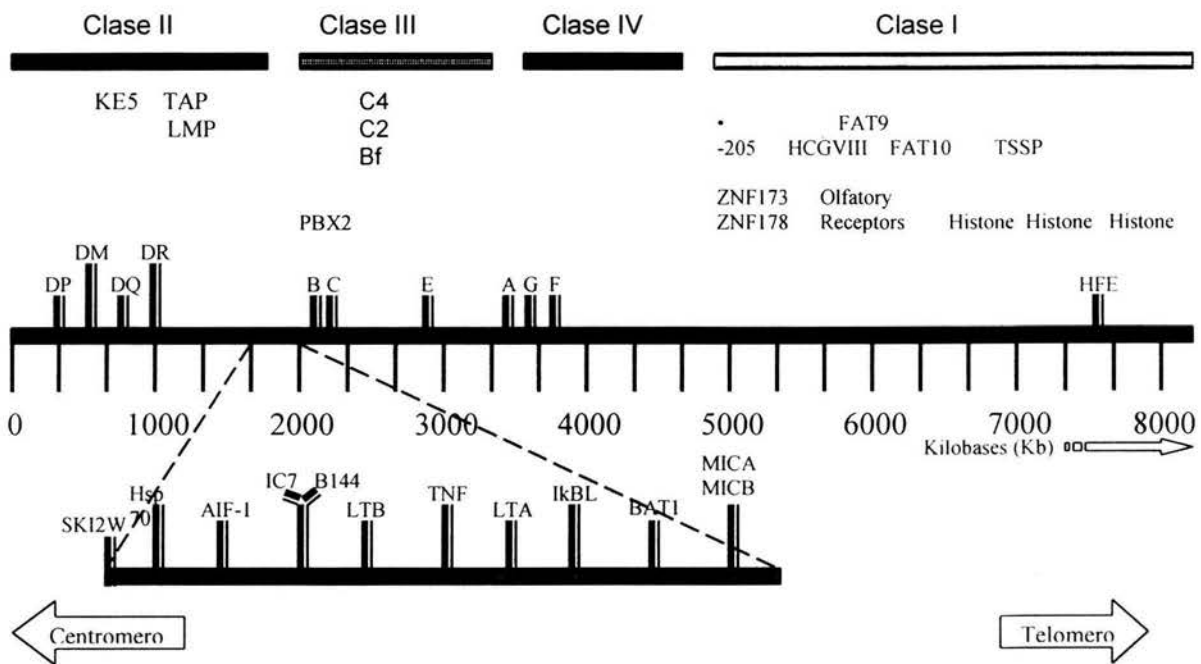
Sin embargo, no todos los genes alfa y beta expresan productos funcionales. Las subregiones DR y DP contienen pseudogenes y la región DQ, contiene genes que no son pseudogenes pero no se expresan (37, 42).

**La región genética de clase III** esta localizada entre las regiones clase I (HLA-B) y clase II (HLA-DR) y abarca 1000 Kb de DNA. La región clase III contiene una colección heterogénea de genes que codifican componentes del sistema del complemento (C2, C4 y factor B) y la 21-hidroxilasa. (36). Los genes clase III presentan un grado moderado de variabilidad genética y se encuentra definido como un segmento cromosomal completo (35). Análisis electroforéticos han demostrado que C2, C4A y C4B y el factor B (Bf) son polimórficos y debido a su marcado desequilibrio de enlace, las combinaciones específicas de los alelos C2, C4 y Bf son heredadas como unidades genéticas simples que se conocen como complotipos (35)

**La región genética de clase IV;** esta región abarca 300 Kb e incluye a genes que codifican para proteínas que tienen un papel importante en stress, inflamación e infección, como: factor de necrosis tumoral (TNF), linfotóxina A (LTA), linfotóxina B (LTB), Transcrito específico de leucocitos (B144 o LST-1), un gen expresado



preferentemente en monocitos y otras líneas de células hematopoyéticas que codifica para tres diferentes RNA; el producto de este gen es similar a la proteína de superficie CTLA-4 (1C7), un gen expresado en un subgrupo de macrófagos infiltrados en aloinjertos llamado factor inflamatorio del injerto -1 (AIF-1 o G1), Sk12w, una proteína similar a la proteína superasesina -2 en levadura (Ski2) la cual proteína tiene un efecto antiviral particularmente contra virus de RNA no poliadenilado, un factor de transcripción de la familia de NFκB ligado a IκappaB (IκBL), BAT1, genes relacionados a MHC clase I-A (MICA), genes relacionados a MHC clase I-B (MICB) (Figura 1) (43).



**Figura No. 1.** Mapa del MHC que incluye la región de clase IV propuesta por Gruen y Weissman en 1997. Se observa la localización genómica, número aproximado de Kilobases que ocupa cada región y algunos genes implicados en procesos inflamatorios.

#### **IV. Genes TAP**

Recientemente se ha descubierto una serie de genes dentro de la región clase II que están implicados en la degradación, procesamiento y presentación de péptidos por moléculas HLA clase I (44,45). El transporte activo de péptidos fue propuesto inicialmente por Townsend y colaboradores en 1989 basándose en estudios que demostraron en una línea celular de ratón, defectos en el ensamblaje de moléculas HLA clase I sobre la superficie celular en ausencia de péptidos adicionados. Un fenómeno similar fue descrito en líneas celulares de rata y humanas; la mutación responsable de estos defectos fue descrita en la región del MHC clase II en ambas especies. Entre 1989 y 1992, diferentes autores reportaron la existencia y posteriormente la secuencia de dos genes ahora llamados transportadores asociados con el procesamiento de antígenos (TAP) [Livingston y col. en 1989; Hosken y Bevan en 1990; Cerundolo y col. en 1990; Powis y col. en 1992; Spies y col. en 1990, y Bahram y col. en 1991 (46)]. Estos genes, previamente denominados RING 4 y RING 11 respectivamente (47), están localizados entre las subregiones HLA DQ y HLA DP (**figura 2**)(48,49). Anticuerpos específicos para TAP1 coprecipitan tanto con TAP1 como con TAP2 sugiriendo que estas proteínas están físicamente asociadas de una forma heterodimérica. Este complejo TAP1/TAP2 se encuentra ubicado en la membrana del retículo endoplásmico y muestra homología con la superfamilia de los transportadores ABC (ATP-binding cassette) (47).

##### **IV.I. Localización y estructura de TAP1 y TAP2.**

TAP es un complejo proteico heterodimérico que consiste de las subunidades TAP1 de 70 kD (748 aa) y TAP2 de 72 kD (703 aa), (50, 51). Cada subunidad contiene de 6 a 8 regiones que atraviesan la membrana, un dominio citoplasmático, y un probable sitio de unión al ATP (47). Pertenece a la familia de transportadores ABC que tienen una caja de unión a ATP (108) que incluyen entre otros a la glicoproteína P de multidrogosresistencia (MDR), al regulador de conductancia transmembranal de la fibrosis cística (CFTR), la proteína de adenoleucodistrofia (ALDP), de la levadura STE6 oligopéptido transportador de *Salmonella typhimurium* (52, 53).

En 1999, Jan C. Vos propuso la estructura tridimensional del heterodímero. Se concluyó que TAP1 tenía los dominios N y C terminales en el citoplasma, mientras que TAP2 tiene el dominio N terminal en el lumen del retículo endoplásmico. Se ha propuesto un modelo en el que se describe la estructura en tres partes: a) un poro transmembranal en la porción N terminal, el dominio del poro es hidrofóbico y contiene de 6 a 8 segmentos transmembranales para TAP1 y de 5 a 7 para TAP2 (54); b) un bolsillo citoplasmático de unión al péptido en el centro; mutaciones en este dominio afectan la especificidad del péptido; y c) un dominio de unión a nucleótidos en la porción C terminal, el cual dirige los procesos de traslocación y contiene dos motivos para la hidrólisis y unión de ATP (**figura 3**) (51, 54, 55).

El heterodímero pesa aproximadamente 140 kD y el poro mide de 50 – 70 nm lo cual permite el paso de péptidos oligoméricos que son generados en el proteosoma. Estos péptidos oscilan entre 8 a 15 aminoácidos de largo, aunque ocasionalmente pueden ser mayores como es el caso del HLA-B27 que puede adquirir péptidos de más de 33 aa de manera dependiente del transporte de TAP (55, 56).

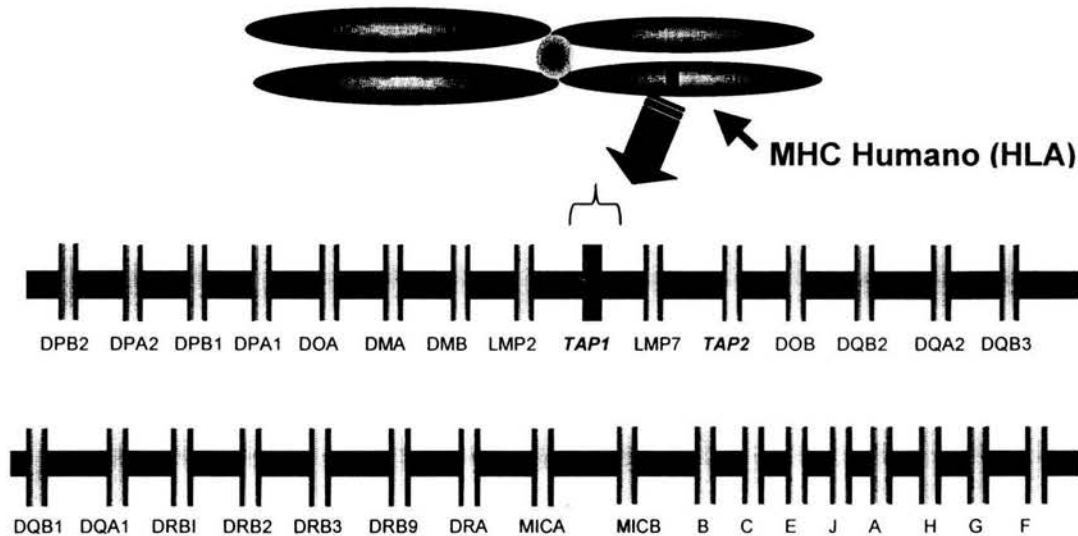
#### **IV.II. Organización genómica de TAP.**

Los genes TAP están localizados en el grupo de genes de HLA clase II sobre el brazo corto del cromosoma 6 humano, entre HLA-DP y DQ (48), y a aproximadamente 1.5 megabases del gen HLA B (**figura 2**) (57).

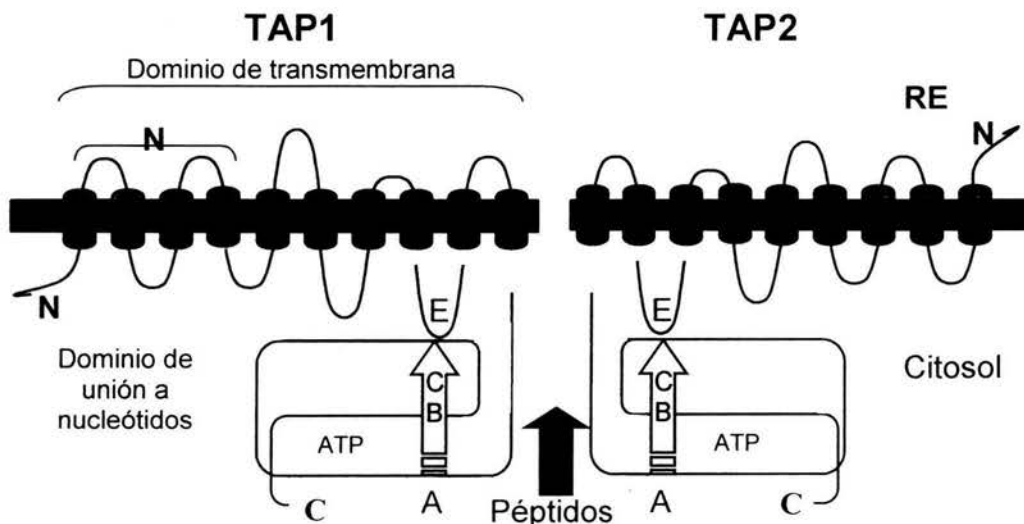
El alineamiento entre las secuencias de TAP1 y TAP2 muestran un alto grado de homología de 200 aa localizados en el dominio C terminal. Esta región posee tres motivos característicos. Los motivos Walker A y B forman una caja de unión a ATP altamente conservado; el motivo C-loop consiste de 6 a 8 aa conservados y se encuentra localizado entre el motivo Walker A y B, lo que demuestra que estas proteínas provienen de la superfamilia de transportadores con caja de unión a ATP. También poseen un dominio de unión a nucleótidos conservado (NBD) y un dominio de transmembrana (TMD) de alrededor de 6 segmentos que atraviesan la membrana y que es característica de esta familia de proteínas. Una unidad funcional comprende dos NBDs y dos TMDs (**figura 3**) (58). El gen de TAP1 es regulado por un promotor bidireccional que comparte con otro gen muy importante

en el procesamiento de antígenos, el polipéptido de bajo peso molecular (LMP2) (59).

### Cromosoma 6



**Figura No 2.** Localización genética de TAP1 y TAP2 dentro de la región de clase II del MHC humano, sobre el brazo corto del cromosoma 6 humano, entre HLA-DP y DQ, y a aproximadamente 1.5 megabases del gen HLA B.



**Figura No 3.** Estructura de las proteínas TAP.- El dominio N terminal de TAP 1 y TAP 2 es muy hidrofóbico y esta formado por tres o cuatro hélices transmembranales. El dominio de unión a péptidos consta de los Walker A y B (flechas amarillas). TAP1 tiene los dominios N y C terminales en el citoplasma, mientras que TAP2 tiene el dominio N terminal en el lumen del retículo endoplásmico. Walker A, B y C forman el *cassette* característico de la familia (*cassette* de unión a ATP). Se observan los dominios transmembranales, citosólico y el sitio de entrada del péptido.

### **IV.III. Función biológica.**

Las proteínas TAP1 y TAP2 son necesarias para la generación de la respuesta inmune celular (59), y constituyen el puente entre la generación y la presentación de péptidos. TAP tiene la capacidad para transportar péptidos con un amplio rango de tamaño y secuencias aunque el tamaño óptimo del sustrato se encuentra entre 8 y 15 aa (51, 60, 61); el poro tiene una considerable flexibilidad de tal manera que péptidos con grandes tamaños pueden ser transportados por TAP.

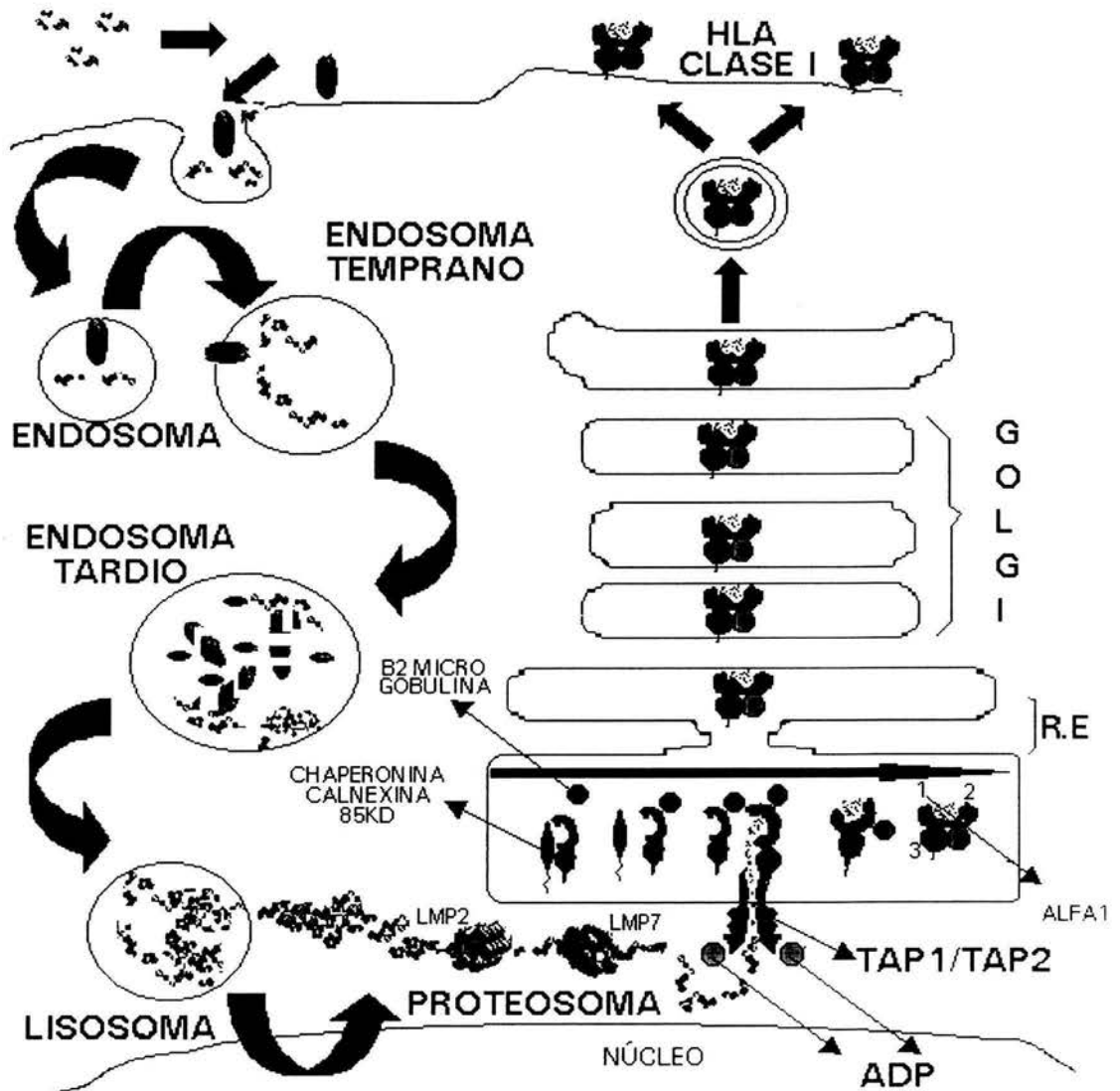
En el caso de TAP de ratón, se ha demostrado que existe una clara preferencia para péptidos hidrofóbicos en C terminal (51, 62). Es importante destacar que si bien las proteínas TAP procesan principalmente antígenos peptídicos (citosólicos) para unirlos a moléculas de clase I, se ha reportado que también desempeñan un papel en el procesamiento de antígenos exógenos restringidos por clase II (48).

### **IV.IV. Vías de procesamiento antigénico.**

#### **IV.IV.I. Por clase I**

Los péptidos derivados de antígenos endógenos, vírales y tumorales, son presentados por las moléculas HLA clase I. El antígeno es degradado en el citoplasma a péptidos de diferentes tamaños por acción de dos proteosomas de bajo peso molecular (LMP2 y LMP7) codificados en la región HLA clase II del MHC. Sin embargo, estos no parecen ser indispensables ya que en su ausencia se pueden formar proteosomas capaces de generar péptidos. Posteriormente los péptidos son transportados hacia el interior del retículo endoplásmico por las proteínas TAP1 y TAP2 para unirse a las moléculas HLA clase I. Al ingresar al retículo endoplásmico, la cadena clase I alfa se une a la chaperona de 85 kD calnexina, de la que se disocia al unirse la  $\beta$ 2-microglobulina. A continuación, el dímero  $\alpha/\beta$ 2-microglobulina se asocia físicamente al dímero TAP1/TAP2 el cual, mediante la hidrólisis de ATP, permite el paso del péptido del citosol al retículo endoplásmico donde es captado y anclado a la molécula HLA de clase I. El péptido y la  $\beta$ 2-microglobulina estabilizan la estructura terciaria de la molécula clase I que a continuación se disocia del dímero TAP1/TAP2. Una vez estabilizada su estructura, la molécula clase I viaja del retículo endoplásmico, a través de la vía

secretoria constitutiva, a la superficie celular, así las moléculas clase I son en realidad trímeros en los que la tercera unidad es el péptido(63) (figura 4).



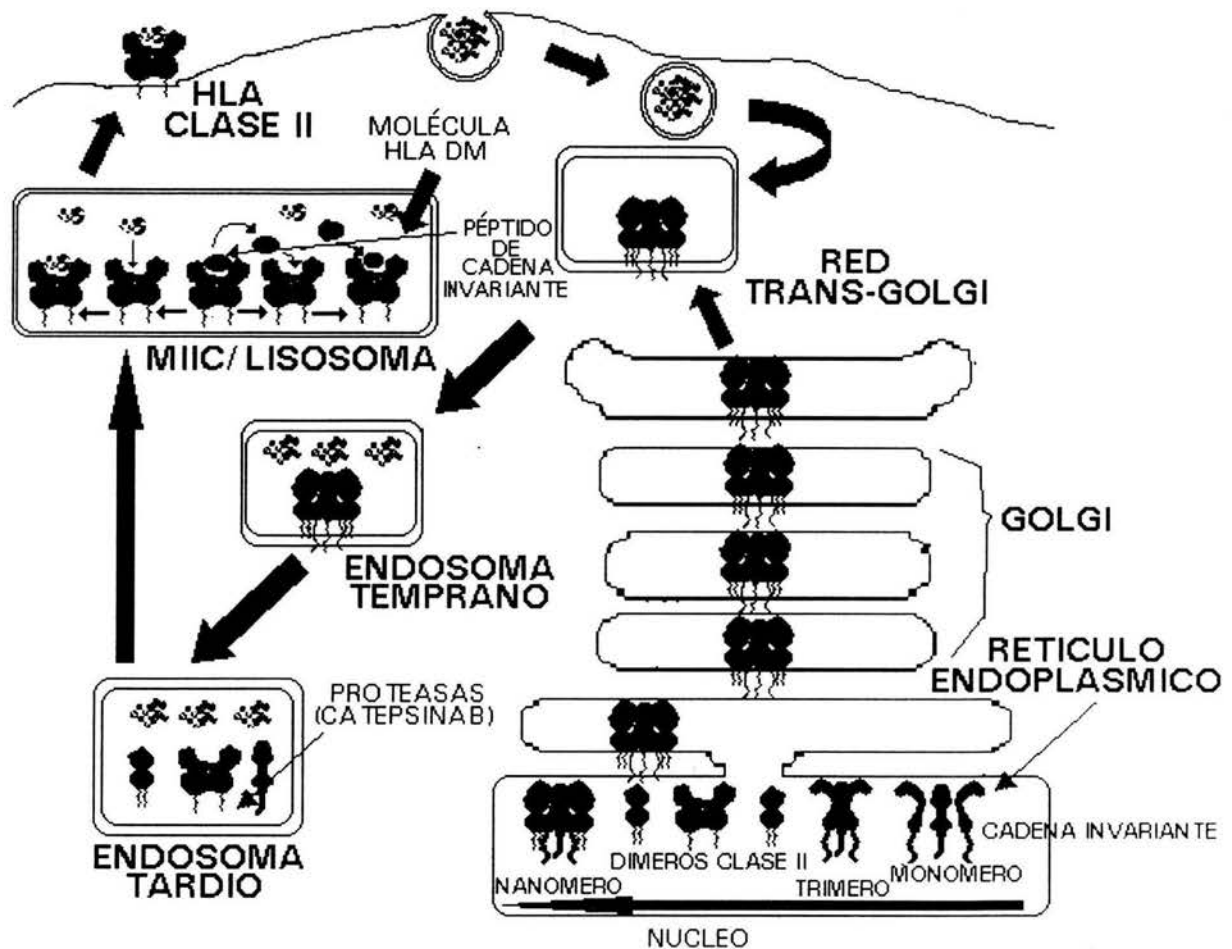
**Figura No 4.-** Representación esquemática del procesamiento de péptidos derivados de proteínas citoplasmáticas que son presentados por las moléculas HLA clase I y formación de la molécula HLA clase I dentro del retículo endoplásmico.



#### IV.IV.II. Por clase II

Las moléculas clase II presentan mejor a péptidos derivados de proteínas exógenas que ingresan a la célula por endocitosis; la unión de los péptidos antigénicos con las moléculas clase II se lleva a cabo en un compartimento de la vía endocítica debido a que, después de su biosíntesis, viajan directamente a la superficie celular. Este compartimento es un endosoma de tipo tardío bioquímicamente relacionado con los lisosomas y que por sus características únicas es llamado MIIC (compartimento de clase II) (**figura 5**)(63,64).

La proteína exógena puede ingresar por vía endocítica mediante tres mecanismos: endocitosis mediada por receptores, pinocitosis y fagocitosis. Durante la biosíntesis, las cadenas clase II alfa y beta se asocian a la cadena invariante (Li; >31 kD < 41 kD), la cual se asocia en forma no covalente al dímero clase II en el momento de su traslocación al retículo endoplásmico. Inicialmente la Li forma homotrímeros y alrededor de éstos se ensamblan tres dímeros para formar un nanómero que permanece así hasta llegar a la vía endocítica, donde por medio de proteasas (catepsina b) y el pH ácido, la cadena Li se disocia de las cadenas alfa y beta de clase II. El último fragmento de la cadena Li que permanece unido a la molécula clase II se denomina CLIP (Péptido de Cadena Invariante Asociado a clase II) el cual se queda ubicado en el sitio de unión con el péptido y mediante competencia con la molécula HLA-DM clase II se disocia y posteriormente adquiere estabilidad al unirse con el péptido antigénico. La Li facilita el transporte de las moléculas clase II impidiendo la unión de péptidos al dímero clase II antes de llegar a la vía endocítica; sin la cadena Li, los dímeros son retenidos en el retículo endoplásmico; además, tiene en la porción intracitoplasmática una señal de tráfico intracelular que la lleva de la red del trans-golgi a endosomas tempranos. Otra característica que hace diferente estas moléculas a las de clase I es que unen péptidos mas grandes y de tamaño variable (de 12 a 25 a.a) mas grandes que los que presentan las moléculas de clase I (63) (**figura 5**).



**Figura No. 5.-** Representación esquemática del procesamiento y unión de péptidos derivado de proteínas exógenas que son presentados por las moléculas HLA clase II, de la misma forma se muestra la formación de la molécula HLA clase II dentro del retículo endoplásmico y la unión de péptidos que a diferencia de las moléculas HLA clase I se lleva a cabo en un compartimento de la vía endocítica.

#### IV.IV.III. Vías de procesamiento antigénico alternas (Antígenos exógenos presentados por MHC clase I)

Las moléculas del MHC presentan péptidos antigénicos sobre las superficies de las células, de esta manera los linfocitos puedan detectar algún agente extraño (microbiológico) o algunas células transformadas. Las moléculas MHC clase I presentan peptidos a las células T citotóxicas CD 8+, mientras que las moléculas MHC clase II presentan péptidos a las células T cooperadoras CD 4+, el dogma



actual es que los antígenos extracelulares son procesados por la vía exógena, por endocitosis y son parcialmente degradados en estructuras endosomales y lisosomales para producir péptidos que se unan a las moléculas MHC clase II. En la vía de procesamiento endógena las proteínas intracelulares son degradadas en el citosol por el complejo proteosomal, generando péptidos que son transportados del citoplasma al lumen del retículo endoplásmico y transportado por TAP para su posterior unión al heterodímero MHC clase II (65).

En resumen, aunque se ha sugerido que los antígenos endógenos son presentados por MHC clase I y los exógenos por MHC clase II, la evidencia acumulada nos indica que esta dicotomía en la presentación de antígenos de origen endógeno y exógeno no es absoluta (66).

El procesamiento alternativo de MHC clase I ha sido reportado en varios sistemas. La vía citosólica alterna de MHC clase I involucra la transferencia de proteínas antigénicas exógenas de compartimentos subcelulares al citosol, donde estos entran al procesamiento de MHC clase I convencional (67).

La presentación de antígenos exógenos particulados es dependiente de TAP; existen indicios de que estos antígenos y la vía de procesamiento por clase I convencional se sobrelapan y que los antígenos fagosomales pueden tener acceso al citosol de las células presentadoras de antígenos. Se ha propuesto, entre otras hipótesis, que existen células especializadas que ingieren antígenos exógenos para su posterior presentación a los linfocitos T citotóxicos por MHC clase I (68).

El procesamiento alternativo de MHC de clase I desempeña un papel importante en la iniciación de la respuesta celular de linfocitos T CD8+, pero sus mecanismos no se conocen con precisión. Su conocimiento será muy importante para entender mejor las defensas del huésped en las enfermedades infecciosas y para el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación (67).

#### **IV.V. Polimorfismos.**

El sistema HLA es el más polimórfico que se conoce en mamíferos, lo que indica la presencia de un elevado número de variaciones denominados alelos dentro de un mismo locus (69, 70).

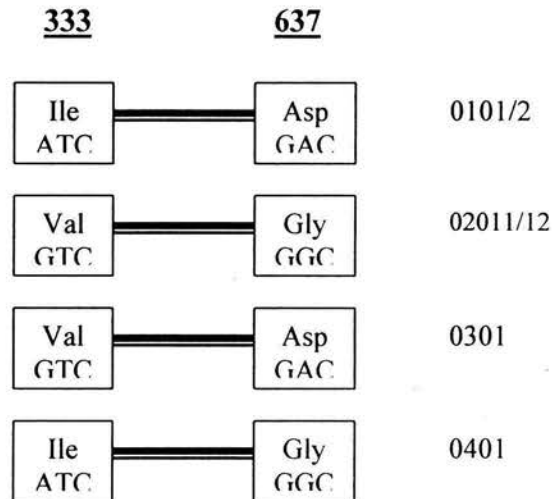
Por lo menos tres aproximaciones experimentales suministran información acerca del significado del polimorfismo de los genes TAP: 1.- El análisis del espectro de péptidos generados, transportados y presentados, 2.- Los estudios de asociación con enfermedades y 3.- Los estudios de genética de poblaciones (71).

En 1992, Colona y colaboradores describieron y caracterizaron dos sitios dimórficos dentro de TAP1, Ille-Val en la posición 333 y Asp-Gly en la posición 637, y cuatro sitios dimórficos en el gen TAP2 Val-Ille 379, Ala-Thr 565, Thr-Ala 665 y Stop-Gly (57, 72); encontró algunas combinaciones (alelos) y las denominó TAP1 A, B, C y TAP2 A, B, C, D, y E, y desde entonces estas regiones han sido ampliamente investigadas. Sin embargo, la mayoría de los estudios (44, 47, 48, 56) se han realizado considerando los sitios dimórficos descritos por Colona (**figura 6**). El análisis de nuevos sitios está permitiendo la definición mas precisa de estos alelos (**figura 7**). En este contexto, con el empleo de técnicas distintas a las convencionales, se han demostrado nuevas regiones dimórficas y con esto nuevos alelos.

A la fecha existen bien documentados 6 alelos para el gen TAP 1 y 4 para TAP2 con nomenclatura oficial (IMG/HLA). Adicionalmente, se han descrito nuevas regiones dimórficas y nuevos alelos en algunas poblaciones (Africa y Japón) a los que el comité de nomenclatura de la OMS aún no ha clasificado. Por esto existen algunas confusiones en los reportes de alelos para el gen TAP2. Una revisión sobre el dimorfismo del gen TAP reveló que existen 17 posiciones polimórficas a lo largo de este gen entre las que podemos mencionar: 379 Ala (GTA) a ile (ATA), 565 Ala (GCT) a Thr (ACT), 665 Thr (ACA) a Ala (GCA), 687 Stop (TAG) a Gln (CAG) (73), 374, 458, 466, 467 (74), 163 (75), 387 (76), 577 (22), 596 (77) 386, 436, 697, 604, 651 y en intrones 651 (72).

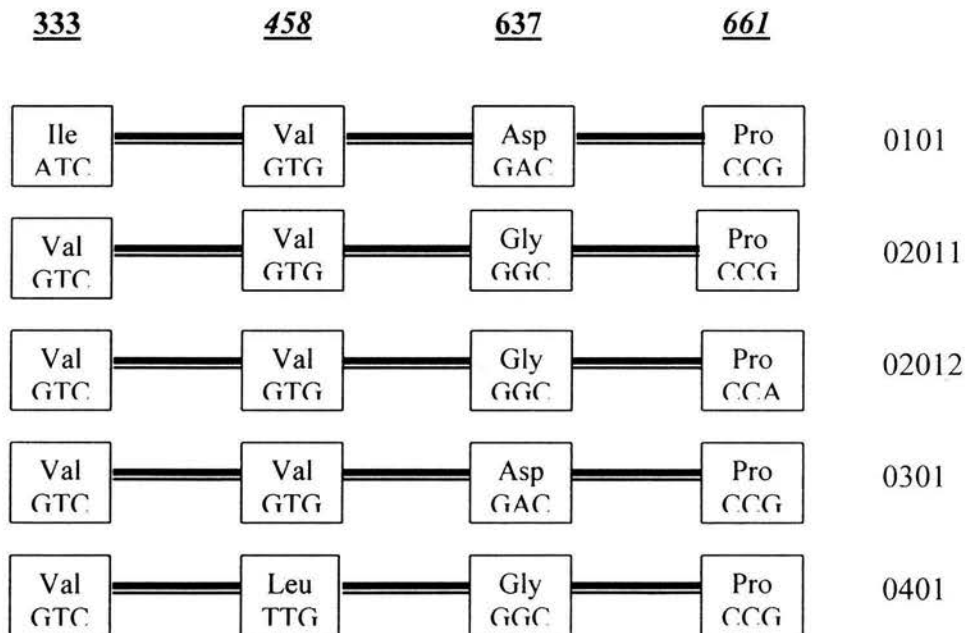
**Figura No. 6.- Comparación de regiones involucradas en la determinación de polimorfismos del gen TAP1 en población mestiza mexicana**

**S. Balladares y col.**



**Figura No. 7.- Comparación de regiones involucradas en la determinación de polimorfismos del Gen TAP1 en población mestiza mexicana**

**Presente estudio.**



#### IV.VI. TAP y enfermedades.

La presencia de moléculas HLA clase I estables sobre la superficie de la célula requiere del transporte activo de péptidos antigénicos a través del retículo endoplásmico por medio de los productos de los genes, TAP1 y TAP2 (78). Como ya se mencionó, los genes TAP sí bien mucho menos que los genes clásicos de clase I y II, son polimórficos. En este contexto, los polimorfismos de TAP y su potencial asociación con enfermedades han sido objeto de estudios recientes (79), y a la fecha se han descrito varios padecimientos humanos probablemente relacionados con polimorfismos de esta proteína; algunas de estas asociaciones se ejemplifican en la (**tabla 2**), e incluyen a la tuberculosis (47), artritis reumatoide (80), sarcoidosis (48, 81), miastenia gravis (82), y cáncer de pulmón (83), entre otras. Es posible que las diferencias en los genes TAP humanos puedan causar alteraciones en la presentación de péptidos por las moléculas de clase I.

Enfermedad	Alelo TAP	Población	RR	Asociado a HLA
Síndrome de Reiter	TAP1*0301	Caucásicos	13%	Independiente a B27
Síndrome de Reiter	TAP1*0201	Caucásicos	77%	Independiente a B27
Artritis Reumatoide	TAP2*0101-DR4	Caucásicos	19.29	DRB1*0405
Artritis Reumatoide	TAP2*0101 solo	Caucásicos	4.25	
Cáncer Pulmonar	Defecto en TAP 1			
EPOC	TAP2*0201	Asiáticos	P <sup>C</sup> 0.05	B*5401
Tuberculosis Pulmonar	TAP2*0201/*0102	India Norte	4.3	DRB1*1501. *1502
Lepra Tuberculoide	TAP2*0103	India Norte	3.5	
SIDA	TAP2 Ala 665	Africanos	Resistencia HIV	

**Tabla No 2.-** Enfermedades asociadas a algunos alelos de TAP, se observa la población estudiada, el riesgo relativo (RR) y la asociación con otros hálelos dentro de la región de HLA.

Los genes involucrados en el desarrollo de una enfermedad poligénica se denominan genes de susceptibilidad, ya que es la combinación de varios de ellos la que aumenta el riesgo a padecer una enfermedad, la cual probablemente se desarrollara siempre y cuando el sujeto sea expuesto a un conjunto de factores ambientales que así lo permitan. La determinación de polimorfismos genéticos como parte de la patogénesis de enfermedades se ha popularizado y por lo tanto

se han generado una serie de estrategias moleculares para este tipo de investigación (84).

#### **IV.VI.I. TAP y Cáncer**

Múltiples mecanismos contribuyen para que las células tumorales evadan la inmunidad celular antitumoral, entre otros, el decremento en la expresión de complejos MHC clase I-péptidos. Esto puede deberse a una disminución en la síntesis y expresión de MHC clase I como ya se ha observado en algunos tumores humanos o por una disminución en el procesamiento de antígenos tumorales con la consecuente disminución en la producción de complejos MHC-péptido. Se han demostrado deficiencias en los componentes de la vía de procesamiento por MHC clase I en una variedad tejidos neoplásicos humanos y líneas celulares tumorales, y algunos estudios han correlacionado estas deficiencias con la progresión del tumor (85).

En este sentido, se ha hipotetizado que la deficiencia en la expresión de TAP1 por células tumorales puede reducir el procesamiento y la presentación de antígenos tumorales por la clase I, decreciendo la susceptibilidad de las células tumorales a la inmunidad antitumoral mediada por las células T CD8 e incrementando la capacidad invasora de estas células.

#### **IV.VI.II. Síndrome de deficiencia de TAP.**

También conocido como Síndrome del Linfocito Desnudo (SLD), se caracteriza por una severa disminución en la regulación de moléculas HLA clase I y/o clase II. El SLD tipo I es un defecto confinado a las moléculas de clase I, mientras que el SLD de tipo II se relaciona con las moléculas de clase II. La pérdida de la expresión de moléculas HLA clase I sobre la superficie de células infectadas con virus y tumorales, impide su reconocimiento por los linfocitos T citotóxicos, lo que las hace blancos específicos a lisis por las células NK y células T  $\gamma\delta$ . Sin embargo, los niveles de expresión son suficientes para no ser destruidos por NK y al mismo tiempo para evadir a los linfocitos T citotóxicos.

Además la presentación de péptidos propios por medio de las moléculas HLA clase I es importante para la selección de células T citotóxicas en el timo. La delección o mutación de una o ambas proteínas TAP daña severamente la

traslocación de péptidos al interior del retículo endoplásmico. En ausencia de este péptido ligado, el complejo HLA clase I/ $\beta$ 2 microglobulina es inestable, con lo que se disocia la  $\beta$ 2 microglobulina y desdobla la molécula HLA clase I. Por lo tanto, un defecto que dañe la traslocación de péptidos al interior del retículo endoplásmico resulta en una expresión reducida de moléculas HLA clase I sobre la superficie de la célula.

De acuerdo con el comportamiento inmunológico y clínico, existen tres grupos de pacientes con **SLD tipo I**:

Grupo I.- Presentan el fenotipo más grave de la enfermedad, con infecciones bacterianas y parasitarias recurrentes severas entre los 4 a 5 meses de edad; en estos pacientes se observa una baja regulación de moléculas HLA clase I y  $\beta$ 2 microglobulina sobre la superficie celular, y no existe producción de anticuerpos. En este grupo de pacientes los defectos transcripcionales de HLA clase I y  $\beta$ 2 microglobulina fueron descartados.

Grupo II.- A diferencia del anterior, estos pacientes pueden cursar completamente asintomáticos. Sin embargo, algunos enfermos pueden presentar daño pulmonar debido a infecciones bacterianas recurrentes, lo que puede llevar finalmente a insuficiencia respiratoria y muerte. También pueden desarrollar lesiones en piel. Al igual que el grupo anterior presentan una baja regulación en la expresión de moléculas HLA clase I sobre la superficie de las células, pero análisis moleculares por Northern blot demostraron un decremento en el RNAm de HLA clase I y  $\beta$ 2 microglobulina, consistente con un defecto transcripcional.

Grupo III.- Este es el grupo mejor caracterizado; la baja expresión de moléculas HLA clase I esta asociada con infecciones bacterianas recurrentes y lesiones granulomatosas de piel pero estos pacientes alcanzan la edad adulta. El análisis de 10 de estos pacientes reveló que la baja regulación de la expresión de las moléculas HLA clase I sobre la superficie celular se debía a un defecto en el complejo TAP (86).

**El SLD tipo II**, es una inmunodeficiencia hereditaria, resultado de la ausencia de la expresión de moléculas HLA clase II. Considerando el papel central de las moléculas de clase II en el desarrollo y activación de células T CD4, no es



sorprendente que el sistema inmune de estos pacientes esté gravemente dañado. Los genes afectados codifican para cuatro factores reguladores (RFXANK, RFX5, RFXAP, y CIITA) que son altamente específicos y esenciales para los genes HLA clase II (87).

#### **IV.VI.III. Inhibidores vírales de TAP**

Algunos virus han desarrollado mecanismos para evadir el sistema inmune de sus hospederos. Estas estrategias frecuentemente bloquean la vía de presentación de clase I lo que disminuye el reconocimiento y muerte de células infectadas por virus por linfocitos T citotóxicos (88); un ejemplo de este mecanismo lo constituye la proteína ICP47 del virus del herpes simple tipo I (HSV-) que se une específicamente a los TAP y por medio de este mecanismo bloquea la unión del péptido y su traslocación, lo que evita la unión del péptido con la molécula HLA clase I en el interior del retículo endoplásmico. En consecuencia, las células infectadas con el virus son enmascaradas y evaden la respuesta inmunológica mediada por los linfocitos T citotóxicos (89). Recientemente fue identificado otro inhibidor viral en el citomegalovirus humano que bloquea el transporte de péptidos en el curso de la infección (90). Otro virus que bloquea los transportadores, aunque no se conoce la proteína responsable, es el VIH-1 (91).

#### **IV.VII. Herencia.**

La especie humana cuenta con 46 cromosomas en cada célula somática, que confieren características diploides de los cuales 23 cromosomas pertenecen a la madre y 23 cromosomas al padre. Los genes se encuentran en lugares específicos del cromosoma (locus), encontrándose su homólogo en el otro cromosoma que forma el par con la existencia de variantes alélicas. Cuando un individuo presenta alelos homólogos idénticos tendrá características homocigóticas, pero si estos son diferentes será heterocigoto dominante (un gen domina a otro) o codominante (ambos se expresan) (92, 93, 94).

Por herencia Mendeliana, un individuo hereda 2 haplotipos HLA (91, 33), estando todos sus genes muy próximos y ligados entre sí, polimórficos y codominantes; Así dentro de una familia, donde el padre presenta los haplotipos a y b, y la madre los haplotipos c y d, se espera que las asociaciones de haplotipos para 4 de sus hijos

sean las siguientes: ac, ad, bc, bd. De tal forma que la presencia de otro hijo con la combinación ac nos indicaría que existe un 25% de probabilidad para que dos hermanos compartan los mismos haplotipos, 50% de compartir un haplotipo y 25% de incompatibilidad en sus antígenos HLA. De tal forma, que el sistema HLA se hereda en bloque, en forma codominante y siguiendo las leyes de segregación Mendeliana (95)

#### **IV.VIII. Análisis de enlace**

Este análisis tiene como objetivo determinar la segregación de un determinado marcador genético, y se realiza en familias que presentan alguna patología en particular con el objetivo de localizar una región cromosómica en la cual se encuentre tanto el gen anormal como el marcador (84).

Se sabe que el gen o genes responsables de una enfermedad van siempre acompañados de los genes o marcadores que están muy cerca de él; este tipo de análisis es útil en enfermedades poligénicas así como en enfermedades donde existen genes conocidos (84).

#### **IV.IX. Desequilibrio de enlace.**

El desequilibrio de enlace nos indica la aparición de dos antígenos sobre el mismo haplotipo siendo más frecuente de lo que se espera al multiplicar sus frecuencias individuales (92, 93, 94). En otras palabras, es una característica particular de los genes del MHC y consiste en la combinación preferencial de antígenos de los diferentes loci en un mismo individuo (96).

El desequilibrio de enlace se encuentra al determinar los antígenos HLA de una población, señala sus orígenes y migraciones, así como las relaciones en la expresión de algunas enfermedades (97).

Se han postulado hipótesis para explicar el desequilibrio de enlace y entre ellas se encuentran las siguientes (97): Migración o mezcla de poblaciones, selectividad, consanguinidad, y derivación al azar entre otras.



## **V. Justificación.**

- La Neumonitis por Hipersensibilidad ocurre en un pequeño número de sujetos expuestos a diversas partículas orgánicas. Sin embargo, los factores genéticos que predisponen a su desarrollo no se conocen con precisión. Algunas evidencias indican que pudiera existir asociación con genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC).
- Debido a su papel en el procesamiento de antígenos, su localización dentro del MHC y su polimorfismo, los genes TAP son candidatos importantes para el estudio de asociación con esta enfermedad.

## **VI. Hipótesis.**

- Los genes TAP1 del MHC clase II se asocian con la susceptibilidad a desarrollar Neumonitis por Hipersensibilidad.

## **VII. Objetivo general.**

1.- Determinar la asociación de los genes TAP1 con la Neumonitis por hipersensibilidad

## **VIII. Objetivos particulares.**

1.- Establecer las frecuencias génicas de los genes TAP1 en población mestiza mexicana.

2.- Determinar las frecuencias génicas de los genes TAP1 en pacientes con neumonitis por hipersensibilidad.

## **IX. Metodología.**

### **Población en estudio:**

#### **Controles:**

Se estudiaron a 58 sujetos sanos (grupo control) seleccionados al azar a los que se les tomó una muestra de sangre venosa con EDTA como anticoagulante para la obtención de DNA genómico.

#### **Grupo control con previo estudio del Sistema HLA**

Adicionalmente se estudiaron 42 sujetos sanos que contaban con la tipificación de los loci HLA-B, DR y DQ.

#### **Criterios de inclusión:**

1. Sujetos sanos sin antecedentes de enfermedades asociadas al sistema HLA.
2. Mestizos mexicanos con más de tres generaciones radicando en México, de 18 a 60 años de edad, de ambos sexos.

#### **Pacientes con neumonitis por hipersensibilidad:**

Se incluyeron 73 pacientes con NH (grupo problema) de los cuales se obtuvo DNA de la misma manera que en el grupo control.

#### **Criterios de inclusión:**

1. Diagnóstico de certeza basado en:
  - a) exposición a aves con relación causa-efecto.
  - b) cuadro clínico, radiológico y funcional compatible con NH.
  - c) anticuerpos circulantes específicos contra antígeno aviario determinados por ELISA.
  - d) más de 40% de linfocitos en el LBA.
  - e) hallazgos histológicos compatibles con la enfermedad.
  - f) sin antecedentes de enfermedades asociadas al sistema HLA.

g) mestizos mexicanos con más de tres generaciones radicando en México, de 18 a 60 años de edad de ambos sexos.

### ***Métodos:***

Existen diversas técnicas para poder determinar los polimorfismos genéticos de TAP, entre las que se encuentran: La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos secuencia específica (SSO), el Sistema de Amplificación Refractaria a la Mutación (ARMS), el polimorfismo de los fragmentos largos de restricción (RFLP), el polimorfismo conformacional de cadena simple (SSCP) y la secuenciación directa (98).

En este estudio se utilizó la técnica Oligonucleótido Secuencia Específica, la cual consta de una PCR previa a la hibridación con sondas oligonucleótido específicas. Los productos de esta amplificación se fijan en una membrana de Nylon por luz ultravioleta y posteriormente se hibridan con una sonda específica que nos detecta el cambio de la base que nos interesa. Esta técnica es muy útil para identificar cualquier variación genética.

### ***Extracción de DNA***

El DNA genómico se obtuvo por medio de un método basado en detergentes iónicos, con un estuche comercial (BD Tract Genomic DNA). Posteriormente, el DNA se cuantificó en un Espectrofotómetro (Beckman Mod. DU-640), en un rango de 240-260-280 nm. La lectura a 260 nm se utilizó para cuantificar el DNA mientras que la que se realiza a 260-280 permitió determinar contaminación con proteínas y la de 240-260 para determinar contaminación con agentes orgánicos. La fase de extracción involucró las siguientes etapas: Lisis celular, descontaminación con un método con base enzimática o química para remover proteínas "contaminantes", como RNA y otras macromoléculas, y separación del DNA a partir de los desechos celulares (99, 100).

## **Método**

### Lisis celular

- La muestra de sangre periférica anticoagulada con EDTA se centrifugó durante 5 minutos a 2500 rpm, para la separación del paquete globular del plasma.
- De la superficie del paquete globular se obtuvo la capa de glóbulos blancos la que se colocó en un tubo de polipropileno de 15ml.
- Se agregaron aproximadamente 10ml de solución de lisis para glóbulos rojos.
- Las muestras se centrifugaron durante 7 min a 3000 rpm, a una temperatura de 4°C.
- Lavados necesarios de la misma manera hasta lograr un sobrenadante claro.

### ***Extracción por el estuche KIT-Bdtrack (Maxim Biotech, Inc).***

- Se continúa trabajando con el tubo, desechando el sobrenadante teniendo precaución de no llevarse el botón formado.
- Se adicionó al botón formado 1500µl de la solución BD1, se mezcló en el vortex y se centrifugó a 3000 rpm, durante 10 min. a 4°C.
- El sobrenadante se separó teniendo precaución de no deshacer el botón formado.
- Se agregaron al botón 1500µl de la solución BD2, se mezcló en el vortex y centrifugó a 3000 rpm, durante 10 min. a 4 °C.
- Se separó el sobrenadante y el paquete se resuspendió en 360µl de la solución BD3.
- Se mezcló por retropipeteo e incubó a 65°C con agitación de 1hr a 24hrs.
- Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf y se les añadió 120µl de solución BD4.
- Se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min y se colectó cuidadosamente el sobrenadante en un tubo Eppendorf.

### ***Precipitación con Isopropanol absoluto.***

- Al sobrenadante se le agregó 600ml de isopropanol y se mezcló por inversión hasta obtener las hebras de DNA.
- Las hebras de DNA se separaron con una caña y se lavaron en 1ml de etanol al 70% frío aproximadamente 15 veces.
- Después de que el etanol se evaporó, el DNA se resuspendió en 200 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de DNAasas / RNAasas.
- Los tubos se taparon con papel Parafilm e incubaron 24 hrs. a 65°C con agitación.
- Las muestras se refrigeraron hasta su uso.

### ***Cuantificación de DNA***

- Existen varios métodos para detectar la presencia de DNA en una solución. En este estudio utilizamos el de espectrofotometría por absorción de radiación ultravioleta (UV). El DNA absorbe la radiación UV a una longitud de onda de 260 nm. Esta absorción se debe a los pares de purina y pirimidina (C, G, A, T). La concentración de DNA se expresa en  $\mu$ g/ml (100).

### ***Reacción en Cadena de la Polimerasa***

Este es un método que permite la amplificación enzimática de secuencias específicas de DNA (47). Tiene la extraordinaria capacidad de sintetizar millones de copias de DNA (101). Para amplificar las muestras, se utilizan dos iniciadores que flanquean las regiones que contienen secuencias polimórficas. Este método fue desarrollado originalmente en 1985 por Randall Saiki, Henry Erlich y Kari Mullis en la corporación Cetus.

Los componentes requeridos para una PCR son:

- DNA
- Iniciadores específicos (Primers)
- Mezcla de desoxinucleótidos (dNTP's)
- Solución amortiguadora de reacción

➤ DNA polimerasa

Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos que son:

- Desnaturalización, en el cual se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del DNA.
- Alineación, en el cual se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de DNA blanco desnaturalizado.
- Extensión, en el que la DNA polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al ir polimerizando los desoxinucleótidos libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos sencillas presentes al inicio de la reacción.

### ***Electroforesis***

Este es un método utilizado para separar moléculas cargadas que migran en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico. En una electroforesis en gel una muestra con moléculas de tamaño heterogéneo se separa a través de una matriz inerte, con la agarosa, avanzando en función de su tamaño.

### ***PCR-SSO***

La amplificación de secuencias específicas de DNA por PCR seguida por la hibridación con oligonucleótidos secuencia específica (SSO) ha sido una poderosa técnica para el análisis detallado de variaciones genéticas. (102). Tradicionalmente la técnica inicia en el extremo 5' radiomarcado (usualmente con  $P^{32}$ ) del SSO. Desde que se descubrió que el marcaje radioactivo tiene muchas desventajas, se reemplazo por una prueba no radioactiva utilizando marcaje con digoxigenina, que fue el que utilizamos en este estudio.

### ***Procedimiento***

Si existen las bandas se prosigue a preparar la cámara para dot-blot, colocando una membrana de Nylon en la cual se cargan las muestras amplificadas en los pozos de la membrana, inmovilizando con la aplicación de calor. Se aplican las



sondas marcadas (digoxigenasa) y se incuba para que se efectúe la hibridación o acoplamiento de las sondas; para eliminar el resto de las sondas no acopladas se hacen lavados repetidos con un buffer y se procede a visualizar la hibridación.

Los iniciadores que se utilizaron para la determinación de los polimorfismos se diseñaron en el programa Oligo-4 a excepción del que identifica el TAP1\*0101 (47).

Los iniciadores FTAP1\*A 5' CACCCTGAGTGATTCTCT 3', 5' ACTGAGTCTGCCAAGTCT 3' amplifican una región de 235 pb del exón número 4 del gen TAP1, las condiciones de la amplificación son las siguientes: temperatura 1, 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C 1 min, 55°C 1 min 72°C 1 min y una segunda Temperatura de 72°C por 7 min. la sonda que nos hibrida esta region es, 5' GTCACCCTGATCACCTG 3' nos identifica el alelo TAP1\* 0101, la sonda 5' GTCACCCTGGTCACCCTG 3' nos apoya para determinar el alelo TAP1\*0301, las condiciones de hibridación son: sonda No 1 42°C toda noche sonda No 2 44°C toda la noche, las condiciones de lavado post-hibridacion son 15 min en SSC 2X, 20 min en SSC2X, SDS 0.1%, 15 min a 42°C en SSC2X, SDS0.1%, a 42°C 30 min en SSC2X, SDS 0.5% y 20 min en Whashing Buffer (Roche).

Los iniciadores FTAP1\*B 5' GAGACAGGGACTTGATA 3', 5' AGATGGAAGACCGAAGAC 3' amplifican una región de 840 pb del exon número 6 del gen TAP1, las condiciones de la amplificación son las siguientes: temperatura 1, 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C 1 min, 55°C 1 min 72°C 1 min y una segunda Temperatura de 72°C por 7 min. la sonda que nos hibrida esta region es, 5' CCCAGGCTTTGGAGGTGA 3' identifica el alelo TAP1\* 0401, la sonda 5' CCCAGGCTGTGGAGGTGA 3' nos apoya para determinar el alelo TAP1\*0101, TAP1\*02011, TAP1\*02012, TAP1\*0301 las condiciones de hibridación son: sonda No 3 38°C toda noche sonda No 4 40°C toda la noche, las condiciones de lavado post-hibridacion son 30 min en SSC 2X, 20 min en SSC2X,

SDS 0.1%, 15 min a 38°C en SSC2X, SDS0.1%, 30 min a 38°C en SSC2X, SDS 0.5% y 20 min en Whashing Buffer (Roche).

Los iniciadores FTAP1\*C 5' CTTGCCTTTATCCTTCAGTTCCTC 3', 5' GTCTTTGCCTCGTCTTCTATCTCT 3' amplifican una región de 562 pb del exon numero 10 del gen TAP1, las condiciones de la amplificación son las siguientes: temperatura 1, 94°C por 5 minutos, 5 ciclos de 94°C 1 min, 62°C 1 min 72°C 30 seg, 25 ciclos de 94°C 40 seg, 68°C 40 seg 72°C 40 seg y una segunda Temperatura de 72°C por 7 min. la sonda que nos hibrida esta región es, 5' CAGAGGTAGACGAGGCTG 3' identifica el alelo TAP1\*0301 junto con la sonda No 2 , la sonda 5' CAGAGGTAGGCGAGGCTG 3' nos ayuda para comprobar el alelo TAP1\*0101, las condiciones de hibridación son: sonda No 5 38°C toda noche sonda No 6 40°C toda la noche, las condiciones de lavado post-hibridacion son 30 min en SSC 2X, 20 min en SSC2X, SDS 0.1%, 15 min a 38°C en SSC2X, SDS0.1%, 30 min a 38°C en SSC2X, SDS 0.5% y 20 min en Whashing Buffer

Después de los lavados las membranas se depositaron en solución bloqueadora (Roche) por 30 minutos, lo cual fue seguido de la solución que contenía el anticuerpo anti-digoxigenina (Roche) con el cual se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 2 lavados con buffer de lavado por 15 min., Cada uno, y por último, las membranas se incubaron en 10 ml de solución color/sustrato recién preparada, con la finalidad de visualizar la hibridación.

## X. RESULTADOS

En el esquema general (**figura 8**) se muestran los grupos controles y experimental a los cuales se les tipificó TAP1. Se incluyeron 131 individuos no relacionados, 58 sujetos normales seleccionados al azar y 73 pacientes con diagnóstico de Neumonitis por Hipersensibilidad. A todos se les tipificó HLA-TAP1 por la técnica Oligonucleótido Secuencia Específica. Adicionalmente, se analizaron 12 familias constituidas por 38 sujetos normales los cuales contaban con la tipificación de loci del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (HLA-B) y de clase II (HLA-DR y DQ). Estos se sumaron a 19 controles de población abierta también tipificados con lo que logramos obtener los haplotipos de 57 sujetos.

El estudio familiar se realizó con el objeto de establecer la segregación y de esta forma definir los haplotipos para cada uno de los sujetos que participaron en este estudio.

### ***Frecuencias fenotípicas y génicas de HLA-TAP1 en población normal***

En la **tabla 3** se muestran las frecuencias de HLA-TAP1 obtenidas en sujetos control, mestizos mexicanos no relacionados. El alelo que predominó de manera significativa fue el TAP1\*0101 con una FF de 0.77 y FG de 0.52, lo cual es muy similar a lo reportado en otras poblaciones; el segundo alelo en orden de frecuencia fue el TAP1\*02012 con una FF de 0.08 y FG de 0.04, seguido del TAP1\*0301 con una FF 0.07 y FG 0.03, y por último el 02011 con una FF de 0.01 y FG de 0.005. En este estudio no se encontró el alelo TAP1\*0401. En cinco sujetos no se pudo distinguir uno de los dos alelos que conforman a TAP1\* debido a la presencia de un patrón de hibridación positivo con diversas sondas (ambigüedad), lo que impidió definir adecuadamente al posible subtipo.

La comparación de las frecuencias alélicas de TAP1 obtenidas en este estudio con las reportadas en diversas poblaciones se muestran en la **tabla 4**. En términos generales las frecuencias alélicas son relativamente similares con predominio de TAP1\*0101 y TAP1\*0201 en todas las poblaciones. Una diferencia importante con una investigación previa realizada en México se refiere al alelo TAP1\*0301 el

cual nosotros encontramos con una frecuencia de 7.75 mientras que en el otro estudio estuvo ausente.

Cabe destacar que en nuestro trabajo se utilizó una adecuada batería de sondas con lo que se logró incluso la diferenciación de los subtipos 1 y 2 del alelo TAP1\*0201, lo cual no ha sido reportado en estudios previos (**tablas 3 y 4**).

Por otro lado, la **tabla 4** muestra que las frecuencias obtenidas en nuestro estudio son similares a las reportadas en la población Española.

### ***Haplotipos***

Los posibles ligamientos entre alelos de HLA-B, -DR, -DQ y TAP1 se presentan de las **tablas 5 a la 7**. Las combinaciones entre alelos de HLA-DR y TAP1 (**tabla 5**) nos indica que las asociaciones más frecuentes se encuentran entre TAP1\*0101 con HLA-DR4 (22), HLA-DR8 (13), HLA-DR7 (10), HLA-DR14 (7), y HLA-DR17 (5). En el caso de TAP1\*02012, la combinación mas frecuente también fue con el HLA-DR4 (5). Alelos infrecuentes como TAP1\*02012 se asociaron a HLA-DR7 y HLA-DR16.

En cuanto a los haplotipos más característicos entre HLA-DQ y TAP1 (**tabla 6**), se encontraron las combinaciones de TAP1\*0101 con HLA-DQ8 (30), HLA-DQ 4 (15), HLA-DQ2 (14), HLA-DQ5 (11), y de TAP1\*02012 con el HLA-DQ8 con (6). Como se puede observar el número de combinaciones entre estos loci es menor, debido a que HLA DQB es menos polimórfico que HLA-DR y HLA-B.

Finalmente, los haplotipos más comunes entre HLA-B y TAP1 (**tabla 7**) están representados con el TAP1\*0101 ligado a los alelos HLA-B39, B35, B44, B61, B51 y B8. Debido a que el locus HLA B es el más polimórfico dentro del sistema HLA, existe mayor diversidad de combinaciones respecto a los otros loci de HLA.

En la **tabla 8** se presentan las combinaciones posibles entre HLA-B, HLA-DR, y HLA-DQ con los alelos de TAP1 de 57 sujetos de los cuales tenemos 38 relacionados (12 familias) y 19 controles sanos no relacionados. El análisis por haplotipos reveló que existen 66 combinaciones diferentes en las que predomina el haplotipo HLA B61 DR4 DQ8 TAP1\*0101 con una frecuencia de 0.061 (6.14 %). De los haplotipos que se identificaron en este estudio, únicamente el 31.8% (21 haplotipos) rebasan las frecuencias del 0.1%. Debido a que es el primer estudio en población mexicana que analiza como haplotipo a HLA clase I, clase II y TAP 1, no existen datos para llevar a cabo comparación con otras poblaciones.

Sin embargo, las frecuencias haplotípicas que incluyen a HLA clase II (HLA DRB1 y DQB1) con TAP1 han sido previamente exploradas en Mestizos Mexicanos. Los resultados comparativos con nuestro estudio se presentan en la **tabla No. 9**. Las frecuencias haplotípicas de DRB1\*08-DQB1\*04-TAP1\*0101 (FH = 0.13) y DRB1\*14-DQB1\*07-TAP1\*0101 (FH = 0.03) correlacionan con las ya descritas en la población mexicana. Por el contrario, el haplotipo DRB1\*04-DQB1\*08 - TAP1\*0101 muestra una frecuencia significativamente mas elevada en nuestro estudio en relación con los datos reportados previamente (FH = 0.30 versus FH = 0.11,  $P^c = 0.01$ ). Probablemente, debido al tamaño de la muestra, en nuestro estudio no se encontraron otros haplotipos reportados en México como el DRB1\*07-DQB1\*02-TAP1\*02011/12, DRB1\*16-DQB1\*07-TAP1\*02011/12, y DRB1\*06-DQB1\*07-TAP1\*0401.

### ***Frecuencias fenotípicas y génicas de HLA-TAP1 en pacientes con Neumonitis por Hipersensibilidad***

La **tabla 10** nos indica las frecuencias fenotípicas y génicas de TAP1 en pacientes con Neumonitis por Hipersensibilidad. Del grupo de 73 pacientes estudiados, el alelo predominante fue el TAP1\*0101 con una FG de 0.5 seguido de TAP1\*02011 con una FG de 0.03, TAP1\*0301 con una FG de 0.03, TAP1\*02012 con una FG de 0.003, y por último TAP1\*0401 con una FG de 0.005.

La **tabla 11** muestra la comparación entre las frecuencias génicas de TAP1\* en pacientes y controles sanos. Se observó una disminución significativa del alelo TAP1\*02012 en los pacientes con neumonitis por hipersensibilidad en relación con los sujetos normales. El análisis estadístico reveló una razón de momios de 0.08 (IC 0.00-0.57) con una P corregida  $<0.002$ . Esta disminución pareció a expensas del alelo TAP1\*02011 el cual se encontró incrementado en el grupo de pacientes en comparación con controles sanos (OR de 4.19, IC 0.84-28.30). Sin embargo, este incremento no alcanzó significancia estadística.

## XI. DISCUSIÓN.

La neumonitis por hipersensibilidad es una enfermedad pulmonar provocada por una reacción inmune exagerada a la inhalación de diferentes partículas orgánicas. Los mecanismos por los cuales la exposición a estos antígenos resulta en NH no se conocen con precisión, pero parecen involucrar la formación de complejos inmunes en los casos agudos, y una hiperreactividad mediada por linfocitos T en los casos subagudos y crónicos (1). Un aspecto importante lo constituye la observación de que solo una pequeña parte de las personas expuestas desarrollan la enfermedad; esta información, sumada al hecho de que algunos pacientes curan mientras otros progresan a la fibrosis aun en ausencia del agente agresor, sugiere que el desarrollo y evolución de la NH depende probablemente de una compleja interrelación entre factores genéticos y ambientales.

Como la NH es una enfermedad inmunopatológica y el MHC desempeña un papel fundamental en el desarrollo apropiado de la respuesta inmune, este complejo ha sido uno de los posibles candidatos para evaluar la susceptibilidad genética. Entre otras funciones, el sistema HLA forma parte de las moléculas que están involucradas en la presentación de péptidos a las células T CD8 por HLA clase I y a células T CD4 por HLA clase II. De hecho, en esta región se encuentra codificada gran parte de la maquinaria empleada para el procesamiento, degradación, transporte y presentación de antígenos a los linfocitos T citotóxicos y T facilitadores (45, 46).

En este contexto, estudios previos desarrollados en nuestro Instituto han demostrado que al menos parte de la susceptibilidad genética a desarrollar NH se relaciona con el sistema MHC, especialmente con HLA clase II, así como con polimorfismos del promotor del factor de necrosis tumoral alfa (3). En particular, se encontró un incremento en la frecuencia de HLA DRB1\*1305 y HLA DQB1\*0501 y un decremento de HLA DQB\*0402 en los pacientes con NH, lo que sugiere que diferentes polimorfismos dentro de este complejo pueden participar en los mecanismos de susceptibilidad/resistencia al desarrollo de esta enfermedad.

En el presente estudio, ampliamos esa investigación analizando el polimorfismo de los genes TAP1 del sistema MHC en el desarrollo de esta enfermedad en



pacientes Mestizos Mexicanos. Como se mencionó previamente, los genes TAP son polimórficos y en la actualidad se reconocen oficialmente 6 alelos de TAP1 y 4 de TAP2 (IMGT DB). Estos genes están localizados en el grupo de genes de HLA clase II sobre el brazo corto del cromosoma 6 humano, entre HLA-DP y DQ (48), y desempeñan un papel fundamental en la presentación adecuada de péptidos para el reconocimiento inmune.

TAP es una proteína transmembranal que tiene propiedades únicas con respecto al reconocimiento y translocación de un vasto espectro de péptidos antigénicos, en especial aquellos relacionados con la respuesta inmune mediada por MHC clase I. El transporte de péptidos antigénicos al lumen del retículo endoplásmico y su unión con moléculas MHC clase I es un proceso esencial para su presentación a linfocitos T citotóxicos. En este sentido, la pérdida de la función de TAP puede provocar la pérdida de la expresión de estas moléculas clase I en la superficie celular con la consecuente alteración en la respuesta inmune. Más aun, se ha sugerido que células que carecen de moléculas MHC clase I pueden ser blanco de células asesinas naturales.

Diversos estudios sugieren que TAP puede participar en el desarrollo de diferentes enfermedades humanas (78), y en este sentido, se han descrito asociaciones con Tuberculosis (47), Artritis Reumatoide (79), Sarcoidosis (48, 80), Miastenia Gravis (81), y Cáncer de Pulmón (82) entre otras.

Particularmente, un cierto número de pacientes con diversas enfermedades autoinmunes asociadas con el complejo principal de histocompatibilidad, como por ejemplo, diabetes tipo I, síndrome de Sjogren y enfermedad de Hashimoto, muestran una disminución en la expresión de TAP1 y TAP2 (103). Por otro lado, se ha sugerido que la fosforilación anormal de TAP puede provocar respuestas inmunes citotóxicas, y subsecuentemente el desarrollo de ciertas enfermedades autoinmunes que se asocian con polimorfismos de TAP (104).

Con estas bases conceptuales nos propusimos estudiar a estos genes en población mestiza mexicana con neumonitis por hipersensibilidad. Es importante

señalar que a la fecha no existen reportes sobre el polimorfismo de los genes TAP1 implicados en la susceptibilidad o protección a esta enfermedad.

Un primer análisis enfocado a la población control mostró que el alelo TAP1 más frecuente en la población mexicana es el TAP1\*0101, el cual pudiera ser un gen ancestral, ya que también ha sido reportado en otras poblaciones con una frecuencia muy elevada. Sin embargo, estudios realizados en otras especies sugieren que el gen ancestral de TAP1\* es el TAP1\*02011, el cual evolucionó y mediante mutaciones puntuales dio origen al TAP1\*0101 y al TAP1\*0301 (105).

En términos generales, las frecuencias alélicas de los genes TAP1\* en mestizos mexicanos correlacionaron con las obtenidas en otros grupos étnicos(106). Sin embargo, la comparación de las frecuencias obtenidas en este estudio con las reportadas en uno previo también realizado en población mestiza mexicana, muestra algunas diferencias en los alelos TAP1\*0201, 0301 y 0401; en parte, esta discrepancia puede estar relacionada con la metodología empleada en ambos estudios, ya que, aunque el sistema de amplificación refractaria a la mutación (ARMS) es una técnica muy común y fácil de realizar no es tan sensible como el método basado en hibridación con oligonucleótido secuencia específica (SSO) que fue el utilizado en este estudio (107). Esto nos permitió por ejemplo diferenciar entre el alelo TAP1\*02011 y TAP1\*02012. Adicionalmente, las diferencias pueden deberse también al reducido número de sujetos examinados en ambos estudios. Por otro lado, nuestros resultados en población normal mostraron frecuencias semejantes a los de la población española.

Es importante destacar que la diferenciación entre los alelos TAP1\*02011 y 02012 fue posible debido al diseño de los iniciadores que se emplearon y mediante los cuales exploramos dos nuevas regiones que en previos estudios se habían considerado con la finalidad de asignar los alelos 02011, 02012 y 0401. Con el último, existe una discrepancia debido a que se ha reportado que en la posición 333 éste codifica para isoleucina (GTG) y de acuerdo a la base de datos del Instituto de Investigación Anthony Nolan (en la cual basamos el diseño de

iniciadores y sondas) se reporta que dicha posición codifica para el aminoácido Leucina (TTG) (Figuras 6 y 7).

En el caso del alelo 02012 en la posición 661 se encuentra el aminoácido prolina (CCA) y este se diferencia de los demás alelos por su triplete (CCG). El alelo 02011 se determina explorando las cuatro regiones 333, 458, 637, y 661 (**Figura 9**).

El análisis de la segregación familiar de genes HLA clase I y II (HLA-B-DR-DQ) y TAP1 en el grupo control sugiere que la combinación de HLA-B61 DR4 DQ8 TAP1\*0101 es la más frecuente, seguida en orden de frecuencia por HLA-B35 DR8 DQ4 TAP1\*0101 y HLA B 44 DR4 DQ8 TAP1\*0101.

En un estudio previo desarrollado en población mestiza mexicana se habían evaluado los haplotipos de TAP1 con genes de HLA clase II (105). La comparación de esos resultados con los nuestros muestra una excelente correlación en lo que respecta a los haplotipos DRB1\*08-DQB1\*04 -TAP1\*0101 y DRB1\*14-DQB1\*07-TAP1\*0101. Por el contrario, la combinación DRB1\*04-DQB1\*08-TAP1\*0101 se encontró en nuestro estudio con una frecuencia incrementada. Por otro lado, los haplotipos DRB1\*07-DQB1\*02-TAP1\*02011/12, DRB1\*16-DQB1\*07 - TAP1\*02011/12 y DRB1\*06-DQB1\*07 -TAP1\*0401, estuvieron ausentes en nuestro grupo de controles.

A la fecha existen varios estudios que tratan de esclarecer el posible papel que los polimorfismos de los genes TAP pueden desempeñar en el desarrollo de enfermedades humanas. Como se mencionó, en particular se han analizado padecimientos con fondo autoinmune o enfermedades infecciosas como la tuberculosis pulmonar. En este último caso por ejemplo, Rajalingam y cols (47) en un estudio realizado en la India encontró una asociación significativa con el alelo TAP2\*0101/0103 (riesgo relativo de 4.3), aunque los autores no pudieron diferenciar entre un alelo y otro. Recientemente se ha explorado el polimorfismo de estos genes con algunas enfermedades en la que se involucra la vía de presentación por HLA clase I como por ejemplo el síndrome de inmunodeficiencia

**Falta página**

**N° 46**

algunas diferencias, lo que sugiere que la distribución de estos genes puede tener diferencias regionales y étnicas (110).

## XII. CONCLUSIONES

1. El alelo TAP1 más frecuente en la población mexicana es el TAP1\*0101, lo cual coincide con todas las poblaciones étnicas estudiadas hasta la fecha.
2. El análisis por haplotipos permitió determinar la existencia de 66 haplotipos diferentes. El más frecuente fue la combinación TAP1-HLAB61-DR4-DQ8. Solo 21 de los 66 haplotipos presentaron frecuencias arriba de 0.1%.
3. El alelo TAP1\*02012 se encontró significativamente disminuido en los pacientes con neumonitis por hipersensibilidad, sugiriendo que puede otorgar resistencia al desarrollo de la enfermedad.
4. Será importante en el futuro determinar nuevas combinaciones alélicas mediante la secuenciación de las regiones comprometidas y determinar el polimorfismo de los genes TAP2 en pacientes con NH.

## Tablas

**Tabla No.3.- Frecuencias fenotípicas (FF) y génicas (FG) de TAP1, en 58 sujetos sanos, mestizos mexicanos**

ALELOS	n = 58	FF	FG
	<b>116</b>		
ÁLELOS			
0101	90	0.77	0.52
02012	10	0.08	0.04
0301	9	0.07	0.03
02011	2	0.01	0.005
0401	0	0.00	0.00
ND.	5	0.04	0.02

**Tabla No 4.- Frecuencias alélicas de TAP1 en diferentes poblaciones**

	Mex*	Mex	Fra	Fra	Fra	Ale	Esp	EU	Jpn	Jpn	Jpn	Jpn	Jpn
	n = 58	n=89	n=41	n=70	n=162	N=101	n=106	n=80	n=35	n=75	n=95	n=106	n=91
0101	77.5	75.8	85.4	91.4	83.3	73.8	75.3	83.8	81.0	90.5	85.3	86.3	85.2
0201	10.3	20.3	9.7	7.1	16.3	15.8	14.4	13.1	10.0	9.5	14.7	12.7	13.7
0301	7.75	0	3.7	1.4	0.5	8.9	6.2	3.1	0	0	0	0.9	1.1
0401	0	3.9	1.2	0	0	1.5	0	0	9.0	0	0	0	0
ND	4.45												

\*Presente estudio

**Tabla No. 5.- Frecuencia de combinaciones entre alelos del locus HLA-DR y HLA-TAP1**

Haplotipo DRB1-TAP1	No.
DRB1 *04-TAP1*0101	22
DRB1 *08-TAP1*0101	13
DRB1 *07-TAP1*0101	10
DRB1 *14-TAP1*0101	7
DRB1 *17-TAP1*0101	5
DRB1 *04-TAP1*02012	5
DRB1 *11-TAP1*0101	4
DRB1 *01-TAP1*0101	3
DRB1 *13-TAP1*0101	3
DRB1 *15-TAP1*0101	3
DRB1 *16-TAP1*0101	3
DRB1 *04-TAP1*0301	2
DRB1 *03-TAP1*0101	1
DRB1 *07-TAP1*02012	1
DRB1 *16-TAP1*02012	1
DRB1 *13-TAP1*0301	1



**Tabla No. 6.- Frecuencia de combinaciones entre alelos del locus HLA-DQ y HLA-TAP1**

<b>Haplotipo DRQ1-TAP1</b>	<b>No.</b>
DQB1*08 –TAP1*0101	30
DQB1*04 –TAP1*0101	15
DQB1*02 –TAP1*0101	14
DQB1*05 –TAP1*0101	11
DQB1*07 –TAP1*0101	7
DQB1*06 –TAP1*0101	5
DQB1*08 –TAP1*02012	6
DQB1*09 –TAP1*0101	3
DQB1*03 –TAP1*0101	2
DQB1*02 –TAP1*02012	2
DQB1*08 –TAP1*0301	1
DQB1*05 –TAP1*0301	1
DQB1*07 –TAP1*0301	1
DQB1*06 –TAP1*02012	1

**Tabla No. 7.- Frecuencia de combinaciones entre alelos del locus HLA-B y HLA-TAP1**

<b>Haplotipo HLA B-TAP1</b>	<b>No.</b>
B39 TAP1*0101	11
B35 TAP1*0101	10
B44 TAP1*0101	10
B61 TAP1*0101	8
B8 TAP1*0101	7
B51 TAP1*0101	7
B18 TAP1*0101	4
B52 TAP1*0101	4
B7 TAP1*0101	3
B49 TAP1*0101	3
B53 TAP1*0101	3
B39-TAP1*02012	3
B40 TAP1*0101	2
B62 TAP1*0101	2
B13 TAP1*0101	1
B38 TAP1*0101	1
B41 TAP1*0101	1
B45 TAP1*0101	1
B50 TAP1*0101	1
B57 TAP1*0101	1
B58 TAP1*0101	1
B65 TAP1*0101	1
B75 TAP1*0101	1
B35TAP1*02012	1
B61TAP1*02012	1
B51TAP1*02012	1
B13TAP1*02012	1
B63TAP1*02012	1
B70TAP1*02012	1
B35 TAP1*0301	1
B61 TAP1*0301	1
B51 TAP1*0301	1

**Tabla No 8.- Frecuencias Haplotípicas HLA-B-DR-DQ-TAP1**

No	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-TAP1	n	F.H %
1.	61	4	8	0101	7	6.14
2.	44	7	2	0101	5	4.38
3.	44	4	8	0101	5	4.38
4.	8	17	2	0101	5	4.38
5.	35	8	4	0101	4	3.50
6.	35	4	8	0101	4	3.50
7.	39	4	8	02012	4	3.50
8.	39	8	4	0101	4	3.50
9.	39	4	8	0101	3	2.63
10.	52	14	7	0101	3	2.63
11.	13	4	8	0101	3	2.63
12.	51	4	8	0101	3	2.63
13.	65	1	5	0101	3	2.63
14.	8	1	5	0101	2	1.75
15.	35	11	7	0101	2	1.75
16.	8	17	2	02012	2	1.75
17.	39	16	5	0301	2	1.75
18.	53	13	6	0101	2	1.75
19.	62	4	8	0101	2	1.75
20.	63	13	6	0101	2	1.75
21.	18	7	9	0101	2	1.75
22.	53	1	5	0101	1	0.87
23.	62	8	4	0101	1	0.87
24.	7	1	5	0101	1	0.87
25.	7	14	5	0101	1	0.87
26.	7	15	6	0101	1	0.87
27.	8	8	4	0101	1	0.87
28.	8	15	6	0101	1	0.87
29.	13	7	2	02012	1	0.87
30.	18	3	2	0101	1	0.87
31.	18	14	2	0101	1	0.87
32.	18	8	4	0101	1	0.87
33.	35	16	5	0101	1	0.87
34.	35	14	7	0101	1	0.87
35.	35	4	7	0301	1	0.87
36.	35	16	8	02012	1	0.87

**Continuación Tabla 8**  
**(Frecuencias Haplotípicas HLA-B-DR-DQ-TAP1)**

	<b>HLA-B</b>	<b>HLA-DR</b>	<b>HLA-DQ</b>	<b>HLA-TAP1</b>	<b>No</b>	<b>F.H</b>
37.	35	17	2	0101	1	0.87
38.	38	4	8	0101	1	0.87
39.	39	11	7	0101	1	0.87
40.	4005	4	8	0101	1	0.87
41.	40	7	9	0101	1	0.87
42.	40	4	8	0101	1	0.87
43.	41	7	2	0101	1	0.87
44.	44	16	8	0101	1	0.87
45.	45	15	6	0101	1	0.87
46.	49	13	3	0101	1	0.87
47.	49	4	8	0101	1	0.87
48.	49	11	7	0101	1	0.87
49.	50	14	5	0101	1	0.87
50.	51	11	13	0101	1	0.87
51.	51	17	2	0101	1	0.87
52.	51	8	4	0101	1	0.87
53.	51	4	8	01012	1	0.87
54.	51	14	5	0101	1	0.87
55.	51	13	5	0301	1	0.87
56.	51	7	2	0101	1	0.87
57.	52	4	7	0101	1	0.87
58.	53	1	5	0301	1	0.87
59.	57	7	9	0101	1	0.87
60.	58	13	6	0101	1	0.87
61.	61	4	4	0101	1	0.87
62.	61	4	8	0301	1	0.87
63.	61	4	8	02012	1	0.87
64.	62	8	4	0301	1	0.87
65.	70	15	2	02012	1	0.87
66.	75	8	4	0101	1	0.87
					114	100 %

**Tabla No 9.- Frecuencias Haplotípicas de HLA DRB1\*-DQB1\* en Mestizos Mexicanos reportadas por dos grupos de investigación.**

Haplotipo	Mex*	Mex
	INER	INDRE**
	n = 58	n = 89
DRB1*08-DQB1*04 -TAP1*0101	0.13	0.12
DRB1*04-DQB1*08 -TAP1*0101	0.30	0.11
DRB1*14-DQB1*07 -TAP1*0101	0.03	0.05
DRB1*07-DQB1*02 -TAP1*02011/12	-	0.03
DRB1*16-DQB1*07 - TAP1*02011/12	-	0.02
DRB1*06-DQB1*07 -TAP1*0401	-	0.03

**INER. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.**

**\*\* INDRE. Instituto Nacional de Referencia Epidemiologica.**

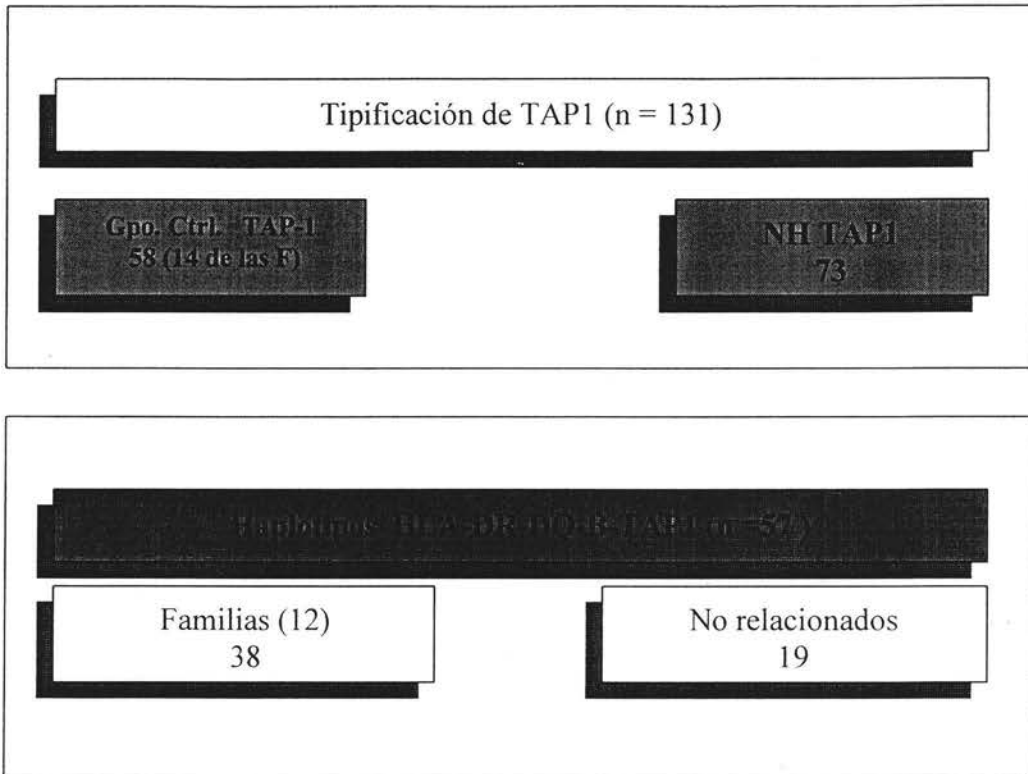
**Tabla No 10.- Frecuencias fenotípicas (FF) y génicas (FG) de TAP1, en 73 pacientes con NH**

TAP1*	n = 73	FF	FG
	146		
	Alelos		
0101	110	0.75	0.5
02011	10	0.06	0.03
0301	10	0.06	0.03
0401	2	0.01	0.005
02012	1	0.006	0.003
ND.	13	0.08	0.04

**Tabla No 11.- Frecuencias génicas de TAP1\* en las distintas poblaciones en estudio.**

TAP1	NH		Grupo Control		p <sup>c</sup>	OR	IC 95 %
	(n = 73	alelos =146)	(n = 58	alelos = 116)			
	N	FG	N	FG			
0101	110	0.5	90	0.52	0.78	0.88	0.48 – 1.63
02011	10	<b>0.03</b>	2	<b>0.005</b>	0.09	4.19	0.84 – 28.30
02012	1	<b>0.003</b>	10	<b>0.04</b>	0.002	0.07	0.00 – 0.57
0301	10	0.03	9	0.03	0.96	0.87	0.31 – 2.44
0401	2	0.005	0	0.00	1.00	1.63	0.11 – 4.84
ND	13	0.04	5	0.02	0.22	2.17	0.69 – 4.84

**Figura 8.- Esquema general del estudio**



**Figura No. 9.- Alineación de la secuencia de aminoácidos de la base de datos del Instituto de investigación Anthony Nolan.**

HLADB-1.5.0-Jan2000

HLA-TAP1 Amino Acid Sequence Alignments

Sequences Aligned: 04-Jan-2000

Steven G. E. Marsh, Anthony Nolan Research Institute.

	310	320	330	340	350	360	
TAP1*0101	ENLSLFLWYL	VRGLCLLGIM	LWGSVSLTMV	TLITLPLLFL	LPKKVKGWYQ	LLEVQVRESL	
TAP1*02011	-----	-----	-----	-V-----	-----	-----	
TAP1*02012	-----	-----	-----	-V-----	-----	-----	
TAP1*0301	-----	-----	-----	-V-----	-----	-----	
TAP1*0401	-----	-----	-----	-V-----	-----	-----	
	410	420	430	440	450	460	
TAP1*0101	NQKEAVAYAV	NSWTTSISGM	LLKVGILYIG	GQLVTSGAVS	SGNLVTFVLY	QMQFTQAVEV	
TAP1*02011	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
TAP1*02012	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
TAP1*0301	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
TAP1*0401	-----	-----	-----	-----	-----	-----L--	
	610	620	630	640	650	660	670
TAP1*0101	YGLTQKPTME	EITAAAVKSG	AHSFISGLPQ	GYDTEVDEAG	SQLSGGQRQA	VALARALIRK	PCVLILDDAT
TAP1*02011	-----	-----	-----	-----G-----	-----	-----	-----
TAP1*02012	-----	-----	-----	-----G-----	-----	-----	-----
TAP1*0301	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TAP1*0401	-----	-----	-----	-----G-----	-----Q--	-----	-----

### XIII.. Bibliografía

1. Selman M, Chapela R, Raghu G. Hypersensitivity Pneumonitis: clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. *Seminars Resp Med* 14:353-359, 1993.
2. Selman M, Terán L, Mendoza A, et al. Increase of HLA-DR7 in Pigeon Breeder's Lung in a Mexican population. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 44:63-68, 1987.
3. Camarena A, Juárez A, Mejía M, Estrada A, Carrillo G, Zúñiga J, Navarro C, Granados J, Selman M. Major histocompatibility complex and TNF- gene polymorphisms in pigeon breeder's disease. *Am J Respir Crit Care Med* 163:1528-1533, 2001.
4. Selman M. Hypersensitivity Pneumonitis. In: *Interstitial Lung Disease*. Schwarz M, and King T, eds. B.C. Decker Inc., Hamilton Ontario, 2003.
5. Pepys J. Clinical and therapeutic significance of patterns of allergic reactions of the lungs to extrinsic agents. *Am. Rev. Respir. Dis.* 116:573-578, 1977.
6. Pérez-Padilla R, Salas J, Chapela R, Carrillo G, Sansores R, Selman M. Mortality in Mexican patients with chronic pigeon breeders lung compared to those with usual interstitial pneumonia. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148:49-53, 1993.
7. Sansores R, Salas J, Chapela R, Barquín N, Selman M. Clubbing in hypersensitivity pneumonitis. Its prevalence and possible prognostic role. *Arch Intern Med* 150:1849-1851, 1990.
8. Ramírez A, Sansores R, Pérez-Padilla R, Carrillo G, Selman M. Utility of a provocation test for diagnosis of chronic pigeon breeder's disease. *Am J Respir Crit Care Med* 8:862-869, 1998.
9. Selman M, Montaña M, Ramos C, Chapela R, González G, Vadillo F. Lung collagen metabolism and the clinical course of hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 94:347-353, 1988.
10. Barquín N, Sansores R, Chapela R, Pérez-Tamayo R, Selman M. Immunoregulatory abnormalities in patients with Pigeon Breeder's Disease. *Lung* 168:103-110, 1990.
11. Selman M, González G, López JS, Ramos C, Montaña M, Barquín N, Vadillo F. Effect of lung T-lymphocytes on fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis and allergic extrinsic alveolitis. *Thorax* 45:451-455, 1990.



12. Pardo A, Barrios R, Gaxiola M, Segura L, Carrillo G, Estrada A, Mejía M, Selman M. Increase of lung neutrophils in hypersensitivity pneumonitis is associated with lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1698-1704, 2000.
13. Pardo A, Smith KM, Abrams J, Coffman R, Bustos M, McClanahan TK, Grein J, Murphy EE, Zlotnik A, Selman M. CCL18/DC-CK-1/PARC up-regulation in hypersensitivity pneumonitis. *J Leukocyte Biol* 70:610-616, 2001.
14. Navarro C, Mendoza F, Barrera L, Segura L, Gaxiola M, Páramo I, Selman M. Up-regulation of L-selectin and E-selectin in Hypersensitivity Pneumonitis. *Chest* 121:354-360, 2002.
15. Sandoval J, Bañales JL, Cortés J, Mendoza F, Selman M. Detection of antibodies against avian antigens in bronchoalveolar lavage from patients with Pigeon Breeder's Disease: usefulness of enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme immunotransfer blotting. *J. Clin. Lab. Anal.* 4:81-85, 1990.
16. Boyd G, McSherry CP, Bahham SW, Lynch PP. A current view of pigeon fancier's lung: a model for pulmonary extrinsic alveolitis. *Clin Allergy* 12:53-59, 1982.
17. Mendoza F, Melendro E, Baltazares M, Bañales JL, Ximenez C, Selman M. Cellular immune response to fractionated avian antigens by peripheral blood mononuclear cells from patients with Pigeon breeder's disease. *J Lab Clin Med* 127:23-28, 1996.
18. Daniele RP, Henson PM, Fantone JC, Ward PA, Dresin RB. Immune complex injury of the lung. *Am. Rev. Respir Dis.* 124:738-755, 1981
19. Benfer K H. Hypersensitivity Pneumonitis. *Conferences and reviews. West J. Med.* 159:570-578, 1993.
20. Denis M. Proinflammatory cytokines in hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 151:164-169, 1995.
21. Salvaggio JE. Recent advances in pathogenesis of allergic alveolitis. *Clin Exp Allerg*, 20:137-144, 1990.
22. Yoshizawa Y, Nomura A, Ohdama S, Tanaka M, Morinari H, Hasegawa S. The significance of complement activation in the pathogenesis of hypersensitivity pneumonitis: Sequential changes of complement components and chemotactic activities in bronchoalveolar lavage fluid. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 87: 417-423, 1988.

23. López M, Salvaggio JE. Hypersensitivity pneumonitis, In Murray JF, Nadel JA (Eds): Textbook of Respiratory Medicine. Philadelphia, Pa, WB Saunders, pp 1606-1618, 1988.
24. Kunkel SL, Chensue SW, Strieter RM, Lynch JP, Remic DG. Cellular and molecular aspects of granulomatous inflammation. Am J Respir Cell Mol Biol. 1:439-447, 1989.
25. Semenzato G, Immunology of interstitial lung diseases: cellular events taking place in the lung of sarcoidosis, hypersensitivity pneumonitis and HIV infection. Eur. Respir J. 4: 94-102, 1991.
26. Yednock TA, Rosen SD. Lymphocyte homing. Adv. Immunol. 44:313-378, 1989.
27. Denis M, Ghadirian E. Transforming growth factor-  $\beta$  is generated in the course of hypersensitivity pneumonitis. Contribution to collagen synthesis. Am J Respir Cell Mol Biol. 7:156-160, 1992.
28. David Rhodes and John Trowsdale. Genetics and Molecular Genetics of the MHC. Cambridge University, Cambridge UK. All rights reserved. 1998
29. M. Tevfik Dorak, B.A. (Hons), M.D., Ph.D. Major Histocompatibility Complex, <http://dorakmt.tripod.com/mhc/mhc.html>. May 22, 2000
30. Festestein H, "Inmunogenética fundamental, biología y aplicaciones clínicas de HLA y H-2" Edit. El Manual Moderno, México D.F. 10-501981
31. Abul K. Abbas, Andrew H Lichtman, Jordan S Pober . Inmunología celular y Molecular 3 edición. Mc Graw Hill Interamericana pp 285-372 (1999)
32. Roitt, I. "Essential immunology" Blackwell Scientific publications. 7ª Edición pp. 51-64. 1991
33. Stites, Stobo, Fundenberg, Wells " Inmunología Básica y Clínica" Quinta Edición. Editorial el Manual Moderno México DF. 1985.
34. Klein, J. Origin of Mayor Histocompatibility Complex Polimorphism : the trans-species hipótesis. Human Immunology 19:155-162 1987
35. Trowsdale, J Ragoussi, J. Y Capbell, D.. Map of the Human MHC. Immunology Today 12 (12) 443-446. 1991
36. D.A. Rhodes. J Trowsdale. Genetics and molecular genetics of the MHC. Reviews in Immunogenetics: 1; 21- 31. 1999

37. Arnaiz-villena. MHC Research : Fast forward. *Immunology Today* 14 (1) 3-5. 1993
38. Monaco , J.J. A molecular model of MHC class I restricted antigen processing. *Immunology Today* 13 (5): 173-178 1992
39. Parham, P. Presentation and processing of antigens in paris immunology *Today* 9 (3) 65-66 1988
40. Smith, M; Lam, K; Hersh, E; Lebl, M y Grimes, W. Peptide sequences binding to MHC class I proteins. *Molecular Immunology* 31 (18): 1431-1443. 1994
41. Schwartz, B. Diversity and regulation of expresion of human leukocyte antigen class II molecules. *The American J. Of Medicin* 85 (suppl 6<sup>a</sup>) 6-8. 1988.
42. Serjeantson, S.W. The reason for MHC polymorphism in man. *Transplantation Proceeding* 21 (1): 598-601 1989
43. Gruen J, Weissman SM. Envolving Views of the Major Histocompatibility Complex. *Blood*; 90:4252-4265 1997
44. Rueda Faucz F; MacAgnan Probst C; Petzl erler ML. Polymorphism of LMP2, TAP1, LMP7 and TAP2 in Brazilian Amerindians and Caucasoids: implications for the evolution of allelic and haplotypic diversity. *Eur J immunogenet*, Feb, 27:1, 5-16. 2000
45. John J Monaco, Ph. D. Department of Molecular Genetics, Biochemistry and Microbiology.  
[http://www.molgen.uc.edu/logic/index.php?page=dept\\_facultyCVs&faculty=58](http://www.molgen.uc.edu/logic/index.php?page=dept_facultyCVs&faculty=58)
46. Mary Carrington, Marco Colonna, Thomas Spies, J. Claiborne Stephens, and Dean L. Mann. Haplotypic variation of the transporter associated with antigen processing (TAP) genes and their extension of Hla class II region haplotypes. *Immunogenetics* 37: 266-273, 1993
47. R Rajalingam, D.P. Singal , N.K. Mehra. Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis. *Tissue Antigens*:49:168-172. 1997
48. M. Ishihara. S.Ohno, T Ishida, T Naruse , M. Kagiya, N.mizuki, E. Maruya, H. Saji, H. Inoko. Analisys of allelic variation of the TAP2 gene in sarcoidosis. *Tissue Antigens*:49: 107-110. 1997
49. Barbara A.L. Owen and Larry R. Pease. Termal Stability of MHC Class I- $\beta_2$ -Microglobulin Peptide Complexes in the Endoplasmic Reticulum Is Determined by

the Peptide Occupancy of the Transporter Associated with Antigen Processing Complex. *The Journal of Immunology*, 166:1740-1747. 2001

50. Ortmann, B., Copeman, J., Lehner, P.J., Sadasivan, B., Herberg, J.A., Grandea, A.G., Riddell, S.R., Tampe, R., Spies, T., Trowsdale, J. And Cresswell, P., A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science*. 277: 1306-1309. 1997

51. Jan C. Vos Pieter Spee, Frank Momburg, and Jacques Neefjes. Membrane Topology and Dimerization of the Two Subunits of the Transporter Associated With Antigen Processing Reveal a Three-Domain Structure. *The Journal of Immunology*, 163: 6679-6685. 1999

52. Urlinger S, Kuchler K, Meyer TH, Uebel S, Tampe R. Intracellular location, complex formation, and function of the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Biol Chem*. May 13;269(19):14032-7. 1994

53. Stephan Uebel and Robert Tampe. Specificity of the proteasome and the TAP transporter. *Current Opinion in Immunology*, 11:203-208. 1999

54. Eric A. J. Reits, Alexander C. Griekpoor and Jacques Neefjes. How does TAP pump peptides? Insights from DNA repair and traffic ATPases. *Immunology Today Trends*. December 2000. 598 Vol.21 No. 12

55. Jens-Oliver Koopmann, Gunter J Hammerling and Frank Momburg. Generation, Intracellular transport and Loading of peptides associated with MHC class I molecules. *Current Opinion in Immunology* 1997, 9: 80-88

56. capítulo 6 procesamiento y presentación de antígenos

57. Keicho N., Tokunaga K., Nakata k., Taguchi Y., Azuma A., Tanabe K., Matsushita M., Emi.M., Ohishi N., Kudoh S. Contribution of TAP genes to genetic predisposition for diffuse panbronchiolitis. *Tissue Antigens* 1999; 53: 366-373

58. Brigitte Lankat-Buttgereit, Robert Tampe. The transporter associated with antigen processing TAP structure and function. *FEBS Letter* 464 (1999) 108-112

59. Lorraine A. Cramer, Stacy L. Nelson, and Michael J. Klemsz. Synergistic Induction of the Tap-1 Gene by INF- $\gamma$  and Lipopolysaccharide in Macrophages Is Regulated by STAT1. *The Journal of Immunology*, 2000, 165:3190-3197

60. Androlewicz, M.J., and P. Cresswell. 1994. Human transporter associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity* 1:7

61. Momburg, F., J. Roelse, G.J. Hammerling, and J. Neefjes. 1994. Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter. *J Exp. Med.* 179:1613
62. Momburg, F., J. Roelse, J.C Howard, G.W. Butcher, G.J. Hammerling and J.J. Neefjes. 1994. selectivity of MHC-encoded peptide transporters from be man, mouse and rat. *Nature* 367:648
63. Moreno Rodríguez J. Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad. Edit. UTEHA.1995 Pag. 34-39
64. Marcel Van Lith, Marieke van Ham and Jacques Neefjes. Stable expresión of MHC class I heavy chain/HLA-DO complex at the plasma membrane. *Eur. J. Immunol.* 2003. 33: 1145-1151
65. Monique Gromme, Fons G.C.M. Uytdehaag, Hans Janssen, Jero Calafat, Robert S. Van Binnendijk, Marcel J. H. Kenter, Abraham Tulp, Desiree verwoerd, and Jacques Neefjes. Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 96, pp. 10326-10331, August 1999 *Immunology*.
66. Falk Nimmrjahn, Slavoljub Milosevic, Uta Behrends, elizabeth M. Jaffee, Drew M. Pardoll, Georg W. Bornkamm and Josef Mautner. Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur. J. Immunol.* 2003. 33: 1250-1259.
67. Peter J Chefalo, Andres G. Grandea III, Luc Van Kaer, and Clifford V. Harding. Tapasin <sup>-/-</sup> and TAP1 <sup>-/-</sup> Macrophages Are Deficient in Vacuolar Alternate Class I MHC (MHC-I) Processing due to Decresed MHC-I Stability at Phagolysosomal pH. *The Journal of Immunology*, 2003, 170: 5825-5833.
68. Eric Pamer and Peter cresswell. Mechanisms of MHC Class I-Restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 1998. 16:323-58
69. Erlich, H.A. and Gyllensten, 1991. Shared epitopos among HLA class II alleles: gene conversion, common ancestry and balancing selection. *Immunology Today* 12 (11): 411-414
70. Klein, J. 1987. Origin of Major Histocompatibility Complex Polymorphism: the trans-species hipótesis. *Human Immunology* 19: 155-162
71. F. Rueda Faucz, C. Macagnan Probst and M.L. Petzl-Erler. Polymorphism of LMP2, TAP1, LMP7 and TAP2 in Brazilian Amerindians and Caucasoids:



- implications for the evolution of allelic and haplotypic diversity. 2000 European journal of Immunogenetics, 27, 5-6
72. Stephen H. Powis, Susan Tonks, Ian Mockridge, Adrian P. Kelly, Julia G. Bodmer, and John Trowsdale. Alleles and Haplotypes of the MHC-encoded ABC transporters TAP1 y TAP2. Immunogenetics 37: 373-380, 1993
73. Marco Colonna, Maureen Bresnahan, Seiamak Bahram, Jack L. Strominger. Allelic variants of the human putative peptide transporter involved in antigen processing. Pro. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 89, pp. 3932-3936, May 1992
74. Tang J., Allen S., Karita E., Musonda R., and Kaslow R.A. New TAP2 polymorphism in Africans. Tissue Antigens 1998: 51: 556-562
75. Aoki Y, Isselbacher KJ, Pillai S. Polymorphisms involving the transmembrane domains of human TAP2. Immunogenetics 38:382. 1993
76. Moins-Teisserenc H, Bobrynina V, Loiseau P, Charron D. New polymorphisms within the human TAP1 and TAP2 coding regions. Immunogenetics. 40:242. 1994
77. Pttanakitsakul S, Takeuchi F, Nabeta H et al. A novel TAP2 gene RFLP observed in a Japanese. Tissue Antigens. 47: 353-355. 1996
78. J. Androlewicz, Bodo Ortmann, Peter M. Van Endert, Thomas Spies, and Peter Creswell. Characteristics of peptide and major histocompatibility complex class I/2-microglobulin binding to the transporters associated with antigen processing (TAP and TAP).
79. Shitaye H; Hayney MS; Love DW; Dimanlig P; Poland GA. A novel method for assigning TAP1 genotype using restriction enzyme plus PASA methodology. Human Immunol, 1999 dec, 60:12, 1289-92.
80. Singal, M. Ye, X. Qiu, M. D' Souza. Polymorphisms in the TAP2 gene and their association With rheumatoid arthritis. 1994. 12: 29-33,
81. Foley PJ; Lympny PA; Puscinska E; Zielinski J; Welsh KI; du Bois RM. Analysis of MHC encoded antigen-processing gene TAP1 and TAP2 polymorphisms in sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med, 1999 Sep, 160:3, 1009-14.
82. P.Hjelmström, R. Giscombe, A.K. Lefvert, R. Pirskanen, I. Kockum, M. Landin-Olsson, C.B. Sanjeevi. TAP polymorphisms in Swedish myasthenia gravis patients. Tissue Antigens 1997: 49: 176-179.

83. Korkolopoulou P, Kaklamanis L, Pezzella F, Harris AL, Gatter KC. Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. 1996 *BR J Cancer* Jan; 73(2):148-53.
84. Maria Teresa Tusié, Gerardo Gamba. *Biología molecular en medicina*. XII. Análisis de enlace y clonación posicional. *Rev invest clin* 1997; 49:529-32
85. Johansen A.K., Templeton D.J., Sy M.S. and Harding C.V. Deficiency of Transporter for Antigen Presentation (TAP) in Tumor Cells Allows Evasion of Immune Surveillance and Increases Tumorigenesis. *The Journal of Immunology*, 1999, 163: 4224-4231
86. S.D. Gadola, H.T. Moins-Teisserenc, J. Trowsdale, W.L. Gross and V. Cerundolo. Immunodeficiency Review. TAP deficiency syndrome. *Clin Exp Immunol* 2000; 121:173-178
87. Walter Reith and Bernard Mach. The Bare Lymphocyte Syndrome and the regulation of MHC Expression. *Annu. Rev. Immunol.* 2001. 19:331-73
88. Frank Momburg, Arno Mullbacher, and Mario Lobigs. Modulation of transporter associated with Antigen Processing (TAP)-Mediated Peptide Import into the Endoplasmic reticulum by Flavivirus Infection. *Journal of Virology*, June 2001, p 5663-5671
89. Lars Neumann, Wolfgang Kraas, Stephan Uebel, Gunther Jung and Robert Tampé. The Active Domain of the Herpes Simplex Virus Protein ICP47: A potent Inhibitor of the Transporter associated with Antigen Processing (TAP). *JMB. Academic Press Limited*, Vol. 390. pp. 484-492 1997
90. Jens-Oliver Koopmann, Gunter J Hammerling and Frank Momburg. Generation, intracellular transport and loading of peptides associated with MHC class I molecules. *Current Opinion in Immunology*. 9: 80-88 1997
91. Jason L Petersen, Chantey R. Morris, and Joyce C. Solheim. Virus Evasion of MHC Class I Molecule Presentation. Brief Review. *The Journal of Immunology*. Pag. 4473-4478 August 4. 2003
92. Winchester, 1986. *Genética. Un estudio de los principios de la herencia*. Edit. CECSA. México. pp265-292.
93. Sturtevant A H and Beadle G W. 1962 *An Introduction to Genetics*. Edit. Dover publications inc. New York. USA. pp 93-126

94. Mettler. L; and Gregg T. 1979. *Genética de las poblaciones y evolución*. Edit. Unión tipográfica. Edit . Hispano-americana, S.A de C.v México. pp 70-102
95. Kumiko Eiguchi de Palmero. *HLA y Enfermedad*. Asociación de Alergia e Inmunología Buenos Aire. Primera edición junio 1999  
[http://wwwaiba.com.ar/libro/\\_private/hla\\_y\\_enfermedad.htm](http://wwwaiba.com.ar/libro/_private/hla_y_enfermedad.htm)
96. Jesús Kazuo Yamamoto-Furusho. Papel de los genes del complejo principal de histocompatibilidad en los procesos infecciosos. *La Revista de Investigación Clínica*. Vol. 52, Num. 4, pp. 461-466 Julio-Agosto 2000
97. Lisker, R. *Estructura genética de la población mexicana. Aspectos médicos y antropológicos*. Editorial Salvat, México 1981.
98. C.L. Perry, C.H. Mijovic, C.S. Cockram, V.T.F. Yeung, D. Jenkins, A.H. Barnett. A novel PCR-based methodology to determine TAP allele frequencies in population studies. *Tissue Antigens* 52: 88-91 1998
99. Chapel Helen y Mensen Haeney. *Inmunología clínica. El manual Moderno*. Maria del Rosario Carsolio; pp. 449-450, 1992
100. Gorodezky Clara. *Curso Teórico-Práctico de genética molecular*, Departamento de Inmunogenética INDRE, SSA. Agosto 2001
101. Aquino G.A. "Susceptibilidad genética del sistema HLA clase II en pacientes con tuberculosis pulmonar drogoresistente" Universidad Veracruzana. Tesis de licenciatura julio 2000. Pág. 82
102. Nevinny-Stickel, C; Bettinotti, M. D. I. P.; Andreas, A.; Hinzpeter, M.; Muhlegger, K.; Schmitz, G.;Albert, E.D. Non-radioactive HLA class II typing using Polymerase Chain Reaction and digoxigenin labeled oligonucleotide probes. *Human Immunol.* 31, 7-13. 1990.
103. Fu Y, Yan G, Shi L, and Faustman D. Antigen processing and autoimmunity. Evaluation of mRNA abundance and function of HLA-linked genes. *Ann NY Acad Sci* 842: 138-155, 1998.
104. Li Y, Salter-Cid L, Vitiello A, Preckel T, Lee JD, Angulo A, Cai Z, Peterson PA, and Yang Y. Regulation of transporter associated with antigen processing by phosphorylation. *J Biol Chem* 275: 24130-24135, 2000
105. Tang I, Freedman D, Allen S et al. TAP1 Polymorphisms in several human ethnics groups: Characteristics, evolution, and genotyping strategies. *Human Immunology*, 2001: 62: 256-268



106. S. Balladares, C Alase, J Pujo, C Duran, JL Navarro and C Gorodezky. Distribution of TAP gene polymorphisms and extended MHC haplotypes in Mexican Mestizos and Seri Indians from northwest México. *Genes and Immunity* (2002) 3 78-85
107. F. Jordan, A.J. McWhinnie, S. Turner, N. Gavira, A.A. Calvert, S.A. Cleaver, R.H. holman, J.M. Goldman and J.A. Madrigal. Comparison of HLA-DRB1 typing by DNA-RFLP, PCR-SSO and PCR-SSP methods and their application in providing matched unrelated donors for bone marrow transplantation. *Tissue Antigens* 1995;45:103-110.
108. Pyo CW, Hur SS, Kim YK, Kim TY, Kim TG. Association of TAP and HLA-DM genes with psoriasis in Koreans. *J Invest Dermatol* 120:616-622, 2003.
109. Hang LW, Hsia TC, Chen WC, Chen HY, Tsai FJ. TAP1 gene Accl polymorphism is associated with atopic bronchial asthma. *J Clin Lab Anal* 17:57-60, 2003.
110. Cai M, Yan L, Cheng H, Ding H, Fu Z. Antigen transporter gene polymorphism and predisposition to Graves disease: aa preliminary analysis. *Zhoghua Nei Keza Zhi* 41(11): 758-61. Nov 2002