

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION “SALVADOR
ZUBIRAN”.**

**ASOCIACIONES GENICAS DE LOS ALELOS DE LOS LOCI HLA-B, HLA-DRB1,
HLA-DQA Y HLA-DQB EN PACIENTES MEXICANAS MESTIZAS CON
CANCER DE MAMA. UN ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES.**

Alumno: M en C David. F. Cantú de León.

Comité Tutorial: Dr. Julio Granados Arriola (Tutor).
Dr. Alejandro Mohar Betancourt.
Dr. Alejandro García Carrancá.

MEXICO, D.F. ABRIL 2010.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE

EPIDEMIOLOGIA DEL CANCER DE MAMA	2
FACTORES DE RIESGO PARA PRESENTACION DE CANCER MAMARIO	4
FACTORES NO FAMILIARES	4
FACTORES FAMILIARES	11
COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD	14
COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN EL HOMBRE	15
ESTRUCTURA DE LAS MOLECULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD	20
ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL	21
DISTRIBUCION TISULAR DE LAS MOLECULAS CLASE I Y II	25
GENES TAP Y LMP	27
RING 3	28
TAPASINA	28
REGULACION DE LA EXRESION DE LOS GENES DEL MHC	28
RELACION ENTRE GENES HLA Y LAS NEOPLASIAS MALIGNAS	30
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
JUSTIFICACION	34
HIPOTESIS	34
OBJETIVOS	34
DISEÑO DEL ESTUDIO	35
CRITERIOS DE INCLUSION	35
CRITERIOS DE EXCLUSION	35
DEFINICION DE CASO Y CONTROL	36
MATERIALES Y METODOS	37
TIPIFICACION DEL HLA	37
ANALISIS ESTADISTICO	40
CALCULO DE TAMAÑO DE MUESTRA	40
ASPECTOS ETICOS	41
ASPECTOS FINANCIEROS	41
ACTIVIDADES REALIZADAS POR EL ALUMNO	41
RESULTADOS	42
DISCUSION	52
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	57
ANEXOS	
ANEXO 1	67
ANEXO 2	68
ANEXO 3	70
ANEXO 4	71
APENDICE 1	72

EPIDEMIOLOGIA DEL CANCER DE MAMA

El cáncer de la mama es la neoplasia mas frecuente en la mujer no solo en países desarrollados sino a nivel mundial, se estima una cifra de 1.15 millones de casos en todo el planeta. De ellos se considera que la mitad se presentan en países industrializados (27.3% en Europa y 31.3% en Norteamérica) a excepción de Japón en que esta neoplasia ocupa el tercer lugar, las tasas de incidencia mas bajas se observan en Asia y Africa (*Ferlay, 2005; Jemal, 2008; Jemal, 2009*).

En Estados Unidos el cáncer de mama es el más común, se reportan aproximadamente 182,460 casos nuevos en forma anual, siendo además la segunda causa de muerte con cerca de 41000 muertes al año por esta neoplasia (*Jemal, 2008*). A principios de la década de 1980, la tasa aumentó en un 3.7% por año, probablemente por la creciente utilización de la mamografía, ya que el diagnóstico de carcinoma ductal in situ y en etapa I se incrementaron, mientras que etapas clínicas mas avanzadas se disminuyeron o se mantuvieron estables (*Ferlay, 2005*).

En México en el año 2003 se registraron 12,488 casos de cáncer de mama de los cuales solo 519 corresponden a carcinoma in situ. La mayor frecuencia se presentó en la población femenina en donde se encontraron 12,433 casos de cáncer de mama invasor y 517 in situ. Se registraron en el sexo masculino 55 casos de cáncer de mama invasor y 2 in situ. La población más afectada fue de 40 a 59 años y 70 años de edad. Se considera que la combinación de cáncer Cervico-uterino y cáncer mamario corresponden al 49% de todas las neoplasias en la mujer mexicana (*RHNM, 2003; RHNM, 2000*).

En el Instituto Nacional de Cancerología según el reporte hospitalario del 2000 al 2004, el cáncer de mama es el más frecuente de todas la neoplasias y representó el 17.6% (3,395) de todos los tumores. En las mujeres ocupó el primer lugar (17.5%) con 3,376 casos y 19 casos (0.1%) en hombres. La edad de diagnóstico con mayor frecuencia es entre los 30 y 70 años (*Cancerología, 2007*).

Es una neoplasia de origen multifactorial, como ocurre con prácticamente todas las neoplasias, sin embargo, puede ser agrupada de tres maneras; sobretodo para determinar si existe carga genética asociada a la misma, en: Esporádico, Familiar y Genético presentándose en la población general con una frecuencia del 70-80, 15-20 y 10% respectivamente (*Harris, 2000*).

Dentro de las variables mas importantes que influyen en la presentación de la enfermedad se tienen la edad, historia familiar, exposición a hormonas (tanto endógenas como exógenas), dieta, enfermedad mamaria benigna, factores ambientales así como genéticos, aunque como ya ha sido mencionado previamente, el origen es considerado multifactorial. A estas variables relacionadas con una enfermedad se les conoce como factores de riesgo, definiendo a factor de riesgo como a aquella característica que de encontrarse presente influye en mayor o menor grado a la presentación de una condición determinada, en el caso de las neoplasias, estos factores se encuentran relacionados tanto con el paciente propiamente dicho como del medio externo que lo rodea y del microambiente celular (*Hunt, 2008*).

Existen diferentes modalidades de agrupar los distintos factores asociados a la presentación del cáncer mamario, exclusivamente para motivos de esta revisión los agruparemos en factores Familiares y No Familiares (**Cuadro 1**) (*Hunt, 2008*). En el caso particular de cáncer de la glándula mamaria, la mayoría de estos elementos incrementan el riesgo de desarrollo en forma moderada y se ha estimado que por lo menos el 50% y hasta el 80% de las mujeres que desarrollan cáncer mamario no tiene factores predisponentes además del género y la edad. Según la revisión de DeVita y cols la edad juega un papel importante en el desarrollo del cáncer mamario, se considera que por debajo de los 30 años la enfermedad es poco común, entre los 35 y 39 se encontró una incidencia de 59 por 100,000 habitantes, sin embargo cuando se evaluó el grupo de edad de los 55 a 59 años la tasa llegó a ser de 296 por 100,000 (*DeVita, 2001*).

FACTOR	RIESGO RELATIVO
Factores Familiares	
Historia familiar de Cáncer de Mama	
1er. Grado	1.8
Premenopáusica 1er. Grado unilateral	3.0
Postmenopáusica 1er. Grado unilateral	1.5
Premenopáusica 1er. Grado bilateral	9.0
Postmenopáusica 1er. Grado bilateral	4.0-5.4
Factores no Familiares	
Historia Menstrual	
Menarca antes de 12 años	1.7-3.4
Menarca después de los 17 años	1.5
Menopausia antes de los 55 años	2.5-5.0
Menopausia después de los 55 años	2.0-4.0
Ciclos anovulatorios	2.0
Historia de embarazo	
Primer embarazo a término antes de los 20 años	0.4
Primer embarazo a término entre 20 a 34 años	1.0
Primer embarazo a término después de 35 años	1.5-4.0
Nuliparidad	4.0

Cuadro 1. Factores de Riesgo para el Desarrollo de Cáncer Mamario

FACTORES NO FAMILIARES:

Edad y Sexo

La edad y el sexo son los dos factores de riesgo más fuertemente asociados al desarrollo de cáncer de mama ya que este tumor se presenta 100 veces más frecuente en mujeres que en hombres, se estima que en Estados Unidos se diagnostican por año 178480 casos de de cáncer invasor en mujeres y tan solo 2030 en hombres. Las tasas de incidencia aumentan considerablemente conforme las pacientes incrementan su edad, siendo muy poco frecuente antes de los 25 años donde las lesiones benignas son las lesiones mas frecuentes mientras que existe un aumento considerable a la edad de 45-50 años (*Gareth, 2007; Smigal, 2006.*), tal como se muestra en la **Cuadro 2**

Esta información correlaciona igualmente con lo reportado en la revisión realizada en el Instituto Nacional de Cancerología en la revisión de la casuística del 2000 al 2004 (*Cancerología, 2007*). Por otro lado, de acuerdo con la evaluación realizada por Rodríguez-Cuevas et al (*Rodríguez-Cuevas, 2001*) entre 1993 y 1995, donde se reportaron 29,075 nuevos casos de cáncer mamario de los cuales el 45.5% se presentó a una edad menor de 50 años, siendo importante mencionar que el grupo de edad más afectado fue el de 40 a 49 años correspondiendo a 29.5% de todos los tumores. Cuando se realizó una comparación con los estudios reportados por otros autores se encontró que en nuestro país la enfermedad se presenta casi una década antes que en países europeos o Estados Unidos.

PROBABILIDAD DE DESARROLLO DE CÁNCER DE MAMA		
AJUSTADO A LA EDAD		
EDAD	PROBABILIDAD DE DESARROLLO DE CÁNCER EN LOS SIGUIENTES 10 AÑOS.	1 EN
20	0.05%	1,985
30	0.44%	229
40	1.46%	68
50	2.73%	37
60	3.82%	26
70	4.14%	24
DURANTE LA VIDA	13.22%	

Cuadro 2. La edad como influencia para el desarrollo de Cáncer Mamario

Raza

Las tasas más altas de presentación de esta neoplasia ocurren en las poblaciones donde predomina la raza blanca (141 casos por cada 100000 mujeres), sin embargo las otras no se encuentran exentas de ella, tal es el caso de la raza negra (119 por 100000), asiáticos americanos (97 por 100000), hispanos (90 por 100000), indio-americanos (55 por 100000) (*Ravdin, 2007; Smigal, 2006*).

De la misma manera, la raza parece estar asociado a otros factores de mal pronóstico tal como lo muestra Bradley y cols que estudiaron 5719 pacientes diagnosticadas con cáncer de mama determinando que las mujeres afro-americanas presentan una menor respuesta a los tratamientos en comparación con su contraparte blanca (*Bradley, 2002*).

En otro estudio Carey y cols incluyeron 496 casos donde se realizó el análisis de expresión génica identificando varios subtipos de cáncer de mama entre ellos basal, Luminal A y Luminal B. De estos el tipo basal fue el más frecuente en mujeres premenopáusicas afro-americanas (39%) en comparación con la posmenopáusicas (14%), en las mujeres americanas pre y post menopáusicas el tipo basal se presentó en 16%. El subtipo luminal A fue menos frecuente en afro americanas 36% vs. 59% en pacientes americanas. Lo anterior contribuye a un mal pronóstico en las pacientes Afro americanas (*Carey, 2006*).

Al realizar una evaluación comparativa con otros países latinoamericanos, como Venezuela (*Capote, 1996*), se encontró que el porcentaje de mujeres menores de 50 años con diagnóstico de cáncer mamario era similar al de nuestro país por lo que se concluyó que por alguna razón, las mujeres latinoamericanas tienen una tendencia a desarrollar éste tipo de neoplasias a una edad mas temprana. Dicha observación es similar para las mujeres japonesas en las cuales el 46.5% de las enfermas tienen una edad menor a 50 años (*Parkin, 1992*). Al parecer los factores ambientales o los dietéticos no son los responsables de este comportamiento, ya que los reportes de la literatura que evalúan pacientes latinas que viven en Los Angeles o Nuevo México muestran un porcentaje de presentación (38-39%) a edades similares que las mujeres que viven en México u otros países de Latinoamérica (*SEER, 1973-1995, Jemal, 2009; NCI, 2009*).

Podemos concluir de estas observaciones que gran parte de estas diferencias étnicas son atribuibles a factores asociados con el estilo de vida y situación socioeconómica, que también explican algunas discrepancias en la supervivencia atribuibles a la raza, aunque algunos factores genéticos y biológicos también pueden contribuir (*Palmer, 2003*) y al comportamiento multifactorial de la neoplasia

Reproducción y Estado Hormonal

La exposición prolongada a concentraciones elevadas endógena de estrógeno aumenta el riesgo de cáncer mamario. La producción de estrógenos (estradiol, el estriol, estrona) es modulado por la función ovárica: la menarquia, el embarazo y la menopausia. Después de la menopausia, la principal fuente de estrógenos es dehidroepiandrosterona (DHEA), se produce en la glándula suprarrenal y se metaboliza a nivel periférico en estrona y estradiol. Los factores reproductivos que han mostrado una influencia en el riesgo de este tumor son la edad de la menarquia, edad de la primera gestación, edad de la menopausia, la paridad y la lactancia materna (*Clemons, 2001; NCI, 2009; Parsa, 2009*).

Es claro que la menarquia temprana se asocia con un mayor riesgo de cáncer, en un estudio, se mostró que por cada dos años de retraso en la aparición de la misma, se presentó un 10 por ciento de reducción en el riesgo de cáncer. La explicación de esta protección es que el inicio tardío de los ciclos menstruales regulares se asocian menor exposición a las hormonas (*Colditz, 2000; NCI, 2009; Parsa, 2009; Reeves, 2009*).

La presentación tardía de la menopausia aumenta el riesgo considerándose que el riesgo relativo aumenta en un 1,03 por ciento por cada año de edad de retraso de la menopausia, lo que es comparable al aumento en el riesgo con el uso de terapia de reemplazo hormonal (*Colditz, 2000; Gammon, 1997; Reeves, 2009*).

La ooforectomía bilateral antes de los 40 años ha mostrado una reducción en el riesgo en un 50 por ciento, sin embargo, este beneficio en la reducción del riesgo es eliminado si se administra terapia de reemplazo hormonal (*Brinton, 1988; Brinton, 1997; Torres-Mejía, 2009*).

Las mujeres nulíparas tienen un mayor riesgo de cáncer de mama en comparación con las mujeres multíparas; el riesgo relativo varía de 1,2 a 1,7. El efecto protector del embarazo no se ve hasta después de 10 años después del parto. El riesgo de cáncer de mama aumenta transitoriamente después de un embarazo a edad mayor (*De Vita, 2001; Li, 2008; Rosner, 1994*).

Si la multiparidad confiere una protección real contra el cáncer de mama ha sido motivo de controversia, la mayoría de los estudios sugieren una disminución en el riesgo cuando la mujer tiene un mayor número de embarazos (*Li, 2008 ; Rosner, 1994*). En el reporte de Rosner et al, se mostró que las mujeres que tienen un parto a los 35 años tienen un 1,6 veces mayor riesgo de cáncer de mama que las mujeres que tienen un embarazo a la edad de 26 a 27 años (*NCI, 2009 ; Rosner, 1994*).

Aunque varios estudios epidemiológicos sugieren un vínculo entre la infertilidad debido a trastornos anovulatorios y una disminución en el riesgo, los resultados son contradictorios. Otros estudios para ajustar la paridad y la edad al primer parto, o bien no han observado ninguna asociación o un ligero aumento de riesgo asociado con la infertilidad (*Li, 2008*). Li y cols evaluaron los eventos reproductivos y el riesgo de cáncer de mama entre 4013 y 4069 mujeres blancas y afro americanas, con seguimiento a 4 años, en las pacientes en quienes había un intervalo de 16 años entre la menarca y el primer parto tenía RR de 1.5 vs. RR 1.4 en quienes tenían un lapso de 5 años, concluyendo que el intervalo entre la edad de la menarca y el primer parto se asocia con mayor riesgo particularmente en mujeres blancas (*Li, 2008*).

En Estados Unidos, la incidencia de cáncer de mama es mayor entre las mujeres blancas antes de los 45 años, pero menor en edades más avanzadas. Palmer y cols incluyeron 6,400 pacientes de 1997 a 1999, la edad se asoció con la alta paridad observando un RR de 2.4 en pacientes con más de 4 partos y menores de 45 años en comparación con las pacientes mayores de 45 años y más de 4 partos con RR 0.5 concluyéndose que paridad tiene una doble asociación con el riesgo de cáncer de mama en las mujeres afro-americanas. Entre las mujeres menores de 45 años, la paridad se asocia con un aumento en el riesgo, mientras que en las mujeres mayores de 45 años se asocia a una disminución en el riesgo, al menos en este grupo étnico (*Jemal, 2009; NCI, 2009; Palmer, 2003*).

En los datos del Nurses' Health Study, la incidencia acumulada de cáncer de mama hasta la edad de 70 para al multiparas frente a las mujeres nulíparas fue de 20 por ciento inferior si el primer nacimiento se presentaba a los 20 años o antes, 10 % más bajo para el primer nacimiento a la edad de 25, y 5 por ciento más alto si el primer nacimiento fue a la edad de 35 (*Rosner, 1994*), esta observación apoya aun mas la teoría de la exposición prolongada a estrógenos endógenos en la patogénesis del tumor (*NCI, 2009*).

La lactancia materna ha demostrado tener efecto protector, sin embargo, la magnitud depende de la duración de la misma. Se reporta RR 0.83 para pacientes con hijos pero no han lactado contra un RR 0.53 para quienes han lactado a mas de 3 hijos, además se ha encontrado un RR 0.47 para quienes lactaron a su primer hijo durante más de 13 meses. Observación que fue hecha en uno de los más grandes análisis que incluía los datos individuales de 47 estudios epidemiológicos entre ellos 50302 mujeres con cáncer de mama invasor y 96973 controles. El riesgo relativo de cáncer de mama se redujo en un 4,3 por ciento por cada 12 meses de lactancia, además de una disminución de 7 por ciento para cada nacimiento (*Missmer, 2002 ; Zheng, 2001*). El mecanismo postulado por el cual la lactancia materna actúa como un protector es que puede retrasar el restablecimiento de los ciclos de ovulación, aumentando así la secreción de prolactina y disminuyendo la producción de estrógenos (*Martin, 2005; NCI,2009*).

Es claro que las pacientes obesas tienen mayores niveles de estrógeno, debido a la conversión de andrógenos suprarrenales a estrógenos en el tejido adiposo periférico, por consiguiente, tienen un mayor riesgo de cáncer de mama que las mujeres posmenopáusicas no obesas con RR 1,19 contra RR 1.02, respectivamente. Por otra parte, la reducción de los niveles de estrógeno (por la supresión de la función ovárica en las mujeres premenopáusicas o el uso de fármacos como los inhibidores de la aromataasa en mujeres posmenopáusicas) disminuye el riesgo de cáncer de mama. Estas observaciones sugieren que los niveles séricos de estrógenos están relacionados con el riesgo de cáncer de mama, además de que los datos epidemiológicos disponibles son más convincentes para posmenopáusicas, en comparación con las mujeres premenopáusicas (*Key, 2003*).

Una revisión de nueve estudios epidemiológicos prospectivos encontró una relación positiva entre la concentración de estradiol en suero y el riesgo de cáncer de mama, determinándose un riesgo mayor de desarrollar la neoplasia (RR = 1.42, 95% CI = 1.04-1.95) mujeres con concentraciones elevadas de estradiol en comparación con aquellas mujeres que tenían niveles dentro de los rangos de la normalidad (*Key, 2002; NCI,2009; Torres-Mejía, 2009*).

Hallazgos similares se observaron en un estudio donde se incluyeron 7705 mujeres posmenopáusicas con niveles séricos de estradiol mayores a 12 pmol / L determinándose que presentaban dos veces mayor riesgo de cáncer de mama invasor que las mujeres con niveles más bajos (*Lippman, 2001; Torres-Mejía, 2009*).

Los resultados del estudio Nurses' Health Study sugieren que la asociación es más fuerte para el cáncer de mama invasor y que además presenta receptores hormonales positivos. En este estudio longitudinal se midieron los niveles de la hormona endógena en 322 mujeres que desarrollaron cáncer de mama y en 643 sin la neoplasia. Se observó una asociación directa entre el riesgo de cáncer de mama y los niveles tanto de de estrógenos como de andrógenos. En contraste con los resultados en las mujeres posmenopáusicas, los datos en las mujeres premenopáusicas son menos claros, en parte a la variabilidad de las concentraciones de hormonas durante los ciclos menstruales y el embarazo, lo que hace difícil mediciones reproducibles en este grupo de mujeres. Además, la mayoría de los estudios epidemiológicos han tendido a utilizar una sola muestra de sangre independiente del día del ciclo menstrual en que se encuentran las pacientes (*Missmer, 2004; Torres-Mejía,2009*).

Tomados en conjunto, los resultados de la mayoría de los estudios prospectivos sugieren que, si bien las mujeres que desarrollaron cáncer de mama habían presentando niveles sanguíneos más altos de estradiol que las mujeres que no lo presentaron, es de importancia hacer notar que la diferencia no fue estadísticamente significativa en ninguno de los mismos (*Kaaks, 2005; NCI, 2009*).

Por otra parte, una asociación significativa entre los niveles séricos de estrógenos durante la fase folicular del ciclo menstrual y el riesgo de cáncer de mama se demostró en un estudio de casos y controles en el Nurses' Health Study. Las mujeres con niveles de estradiol en fase folicular significativamente más altas presentaron RR 2,4 para cáncer de mama invasor y para receptores hormonales positivos RR 2,7 en comparación con el grupo de mujeres con niveles hormonales menores en esta fase del ciclo menstrual. En contraste, no hubo asociación significativa entre el riesgo de cáncer de mama y los niveles hormonales en la fase lútea (*Eliassen, 2006*).

FACTORES FAMILIARES

Historia Familiar

Los factores genéticos contribuyen en una pequeña proporción de los tumores mamarios (cerca del 5%), sin embargo la importancia reside en que cerca del 25% de estos casos se presentan a la edad de los 30 años o antes. La historia familiar, especialmente un familiar de primer grado (madre, hermana o hija) tiene un efecto aditivo especialmente si se asocia a cambios proliferativos con atipia. En pacientes sin el diagnóstico de cáncer mamario que tienen incrementada la posibilidad de presentar mutaciones de BRCA1 o BRCA2 pueden ser identificadas basándose en el número de familiares con cáncer mamario y la edad en que se les hizo el diagnóstico. Entre más familiares con la neoplasia diagnosticada a edades menores de 50 años el incremento en el riesgo de desarrollo del tumor es mayor llegando casi hasta el 50%, lo que indicaría un comportamiento autosómico dominante (*Vogel, 2008*).

Las relaciones son de riesgo más alto para las mujeres jóvenes con familiares afectados. Por lo tanto, el riesgo se incrementó 2,9 veces para una mujer cuyo familiar fue diagnosticado antes de la edad de 30 años, pero sólo 1,5 veces mayor si el afectado se le diagnosticó después de los 60 años de edad. Del mismo modo, el riesgo de cáncer de mama antes de los 40 años se incrementó 5.7 veces, si un familiar ha tenido cáncer de mama antes de los 40 años (*Beral, 2002*).

Mutaciones Genéticas

Los estudios en gemelos sugieren que la mayoría de agregación familiar de cáncer de mama resultados de la susceptibilidad heredada. Sin embargo, las mutaciones genéticas específicas que predisponen al cáncer de mama son raros y sólo 5 a 6 por ciento de todos los cánceres de mama son atribuibles directamente a la herencia específicamente por susceptibilidad genética al presentar mutaciones en los genes como BRCA1, BRCA2, p53, ATM, y PTEN (*Lichtenstein, 2000; Nusbaum, 2007*).

De los cerca de 200,000 casos de cáncer de mama diagnosticados por año en Estados Unidos tan solo 18,000 casos se asocian directamente a predisposición hereditaria de genes como BRCA1 y BRCA2. Estos genes fueron identificados y clonados en 1994 y 1995 respectivamente y más de 1200 mutaciones deletéreas han sido identificadas en toda su longitud BRCA1 el cual se encuentra compuesta por 24 exones y 1863 aminoácidos, mientras que el BRCA2 con 27 exones y 3418 aminoácidos. Las mutaciones más comunes en población judíos son dos en BRCA1 (185delAG y 5382insC) y una en BRCA2 la mutación 6174delT. La prevalencia de mutaciones en mujeres judías es de aproximadamente 2%. El riesgo de cáncer de mama asociado con estas mutaciones en BRCA1 se ha estimado en 50-80% y 40-70% para BRCA2 (*Garber, 2005; Lee, 2008*).

En nuestro país existe muy poca información al respecto del estudio de estas mutaciones específicas, aunque en otros países latinoamericanos, tales como Chile, Cuba, Colombia y Brasil. Por ejemplo en Chile, Torres et al estudiaron casos de cáncer mamario familiar. Identificaron 13 mutaciones en 53 familias (24%), ocho en BRCA1 y cinco en BRCA2. Las dos mutaciones de BRCA1 recurrentes, 3450 delCAAG y A1708E, ocuparon las ocho mutaciones de BRCA1 identificadas, mientras que la mutación 3034 delACAA en BRCA2 ocupó dos de las cinco mutaciones de BRCA2 (*Narod, 2009; Torres, 2007*)

En la **Cuadro 3** se muestran los diferentes síndromes asociados a cáncer mamario.

SIIDROME	CLINICA GENERAL	EPIDEMIOLOGIA GENETICA	PREVALENCIA	FUNCION DE GENES	RIESGO DE CANCER
BRCA-1 BRCA-2 5-10% Autosómico dominante Mutaciones: inserciones Delecciones	Cáncer de mama. Cáncer de Ovario. Cáncer de próstata. Cáncer páncreas CARACTERISTICAS CLINICO PATOLÓGICAS BRCA1 se asocia a Carcinoma medula, alta tasa de RE y RP positivos, HER2 neu negativo, alto grado nuclear, aneuploides, sobreexpresión de P53. Basal like	BRCA1 17q21, 22 exones. BRCA-2 13q12-13, 27 exones, 10.4kb Judios Ashkenazi BRCA1 (187delAG y 5385insC) BRCA2 (6174delT)	1 EM 40 (2.3%) en Judíos Ashkenazi. 1 en 500 a 1 en 800 en la población general	Genes supresores de tumor donde la pérdida de ambos alelos es necesario para el inicio de la tumorigénesis. Mantenimiento de la integridad genómica. Reparación del DNA por recombinación homóloga Interacción con RAD 51 Control de la recombinación integridad del genoma.)	BRCA1 50-80% BRCA2 40-70% Ca de mama contralateral a la edad de 70 años 41-64%
LI-FRAUMENI Mutación germinal 84% mutaciones 10% supresiones 2% inserciones 4% empalme	Cáncer de mama Sarcoma de tejidos blandos. Tumores cerebrales (glioblastoma, meduloblastoma, neuroectodérmico) Osteosarcomas. Tumores adrenocorticales Leucemia Cáncer de estomago, colon, pulmón.	P53 11 exones 20kb. Mutaciones de los codones 175,245,248,273,182.	Familias con criterios clásicos EPA 50-71% tendrán la mutación germinal.	Supresor tumoral que salvaguarda la integridad del genoma. Regula la replicación de DNA y reparación de DNA, la expresión génica y el control del ciclo celular	Cáncer de mama 32% antes de los 30 años 78% a los 45 años-97% a los 50 años. Edad media de cáncer de mama 37 años. Sracoma 91% antes de los 45 años.
COWDEN Autosómica Dominante Gen PTEN Línea germinal Bannayan Riley-RUVALCABA (BRRS) Sx Proteus (PS)	Cáncer de mama Hamartomas Cáncer de endometrio Cáncer de Tiroides Anomalías gastrointestinales, genitourinarias Lesiones benignas de mama: fibro adenomas, metaplasia apocrina, adenosis. CRACTERISTICAS PATOLOGICAS. Predomina carcinoma ductal Lesiones hamartomasas. Cáncer de mama en hombre	PTEN Mutaciones en los exone 5,7,8. Localizado en 10q23, contiene 9 exones y 403 aminoácidos	80% de los pacientes que reúnen los criterios clínicos de diagnóstico	PTEN codifica una fosfatasa de lípidos que participa en la detención del ciclo celular o apoptosis ambas.	20-50% riesgo de cáncer de mama a una edad promedio entre 36-46 años 10% riesgo de cáncer de tiroides 5-10% cáncer de endometrio
TAXIA TELANGIETASIA Autonómica recesiva	Infancia con ataxia cerebelosa progresiva, telangiectasia bulbar conjuntiva y cara, nistagmus, estrabismo, disminución de agudeza visual, inmunodeficiencia, retraso de crecimiento, leucemia, linfoma Cáncer de mama Cáncer de mama masculino Cáncer de próstata Cáncer de colon	Gen AT identificado como ATM Localizado a 11q22-23, consta de 66 exones 150kb	0.4% y 2.8% en portadores de ATM	ATM es un PI-3 cinasa que actúa como una molécula de señalización que participa en las respuesta celulares al daño ADN, en particular daños causados por radiación ionizante	1%.13% de cáncer de mama El RR es de 5.1 para padecer cáncer de mama, aumenta en mujeres jóvenes y tiende a disminuir con la edad. Algunas mutaciones de ATM dan lugar riesgos de 52-60% en menores de 70 años.
PEUTZ-JEGHERS Autonómico dominante Incidencia 1/3300 a 1/29000	Pigmentación mucocutánea melanoótica, pólipos hamartomatosos en tracto gastrointestinal, lesiones benignas y malignas gastrointestinales y extraintestinales.	STK11 (LKB1) Serina treonina cinasa. Localizado en cromosoma 19p13.3 compuesto por 9 exones, se han identificado 150 mutaciones.	16% de los potadores de PJS	La mutación en STK11 induce la angiogénesis, supresión del crecimiento de detención, apoptosis o pérdida de polaridad celular	Riesgo acumulativo de cáncer es de 20-93% incluyendo cáncer de mama, útero, cérvix, pulmón-
CDH1 Autonómico Dominante Mutación germinal	Cáncer gástrico difuso. Cáncer de mama lobulillar Cáncer de colon	CDH1 Situado 6q22.1 16	33-80% de las familias con mutación en CDH1 1% de todos los pacientes con cáncer gástrico y 6% en	Cdh1 gen supresor de invasión que codifica a proteína E-cadherina, célula de adhesión celular, molécula que juega un papel fundamental en el mantenimiento de la	Penetrancia 70% de padecer cáncer gástrico difuso en pacientes de 60 años, el riesgo de cáncer gástrico difuso a los 80 años es de 67%. 39% de riesgo

Cuadro 3. Síndromes genéticos asociados a Cáncer Mamario

COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

Desde su descubrimiento en 1936 (*Gorer, 1936*) el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) ha sido ampliamente estudiado en el genoma de los vertebrados (*Klein, 1991*). Los primeros productos de los genes de HMC fueron identificados en la superficie de los leucocitos y se conocieron como complejo de antígenos leucocitarios humanos (HLA). Aunque las moléculas MHC originalmente fueron estudiadas por su habilidad para conferir tolerancia después de un trasplante de órgano, su principal función es dar protección contra patógenos. Una de las principales características de estas moléculas es su extraordinario polimorfismo. Hoy día se considera que las moléculas de histocompatibilidad tienen como función principal recoger péptidos del interior de la célula, transportarlos a la superficie celular y allí presentarlos a las células T. Esto a través de un sistema muy sofisticado en el que las moléculas Clase I del MHC presentan antígenos endógenos a las células T CD8+ y las moléculas clase II presentan los antígenos exógenos a las células T CD4+. Se han identificado un gran número de proteínas que dan soporte a estos dos sistemas, esto además, en conjunto con las proteínas del complemento Clase III, es de suma importancia mencionar que constantemente se secuencian nuevos alelos, lo que hace difícil mantener una alineación consistente entre los alelos asignados en base a su secuencia y los perfiles serológicos de las proteínas codificadas (*Klein, 1991; Horton, 2004; Marsh, 2010*).

Las moléculas de histocompatibilidad se localizan en la superficie de las células de las distintas especies animales. En el ratón se denominan antígenos H-2 y los genes que las codifican se localizan en el cromosoma 17. En el humano se denominan antígenos HLA (Human Leucocyte Antigens) y están codificadas por genes ubicados en el brazo corto del cromosoma 6. Los primeros trabajos sobre los antígenos H-2 fueron realizados por Gorer (*Gorer, 1936*) en cepas murinas endogámicas (inbred), obtenidas por el cruce entre animales hermanos de forma continuada durante al menos 20 generaciones.

En el caso humano, el Primer antígeno de histocompatibilidad descrito fue MAC (en la actualidad definido como HLA-A2), descubierto por Jean Dausset en 1958, utilizando este nombre en honor de tres voluntarios que participaron en los experimentos de Dausset y

que sus nombres empezaban con M, A y C (*Dausset, 1958; Dausset, 1958; Turner, 2004*). Pronto se vio que existía una relación entre estos antígenos y el no rechazo de riñones trasplantados.

Como ya se ha dicho, los genes que codifican las moléculas cuya estructura y función se encuentran agrupados en el brazo corto del cromosoma 6 donde se localiza el lugar que codifica el MHC se extiende aproximadamente 2-3 centimorgans (aproximadamente 4×10^6 pares de bases) y en el humano contiene al menos 50 genes distintos. Este grupo de genes se encuentra organizado de forma diferente en las distintas especies, conociéndose con precisión la organización genética del MHC en el hombre, sistema HLA, y el ratón, sistema H-2. Recientemente se ha propuesto una nueva taxonomía para clasificar los distintos genes que codifican las moléculas de histocompatibilidad (*Collins, 1994; Jones, 1997*).

Complejo Principal de Histocompatibilidad en el hombre.

En el MHC se codifican los loci que de los distintos antígenos HLA clase I y II (**Figura 1**). Entre los de clase I se encuentran los genes que codifican las cadenas α de los antígenos HLA-A, HLA-B y HLA-C y entre los de clase II se encuentran los pares de genes que codifican las cadenas α y β de los antígenos HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP (*Campbell 1993, Campbell 1997, Maenaka, 1999; Solana*)

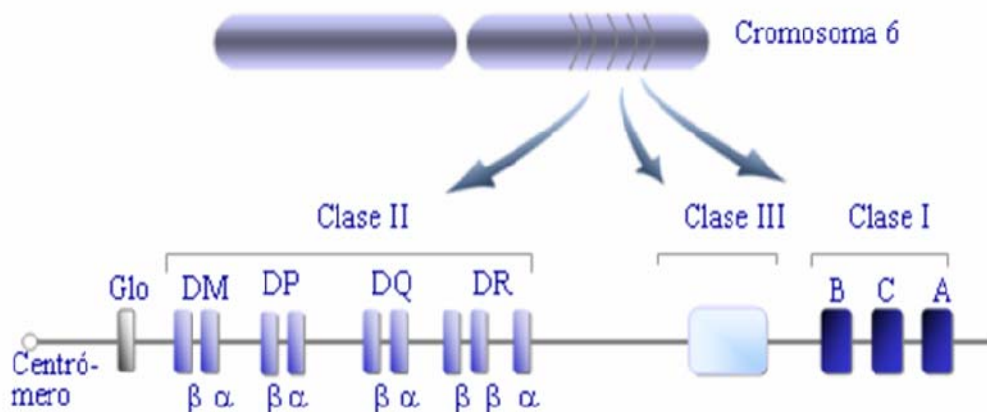


Figura 1. Esquema del cromosoma 6 y los loci que codifican las proteínas HLA Clásicas

Prof. Solana

Este grupo de genes se heredan de acuerdo con las leyes de Mendel, como caracteres codominantes simples. Se define como un haplotipo a la de la información genética heredada de cada padre y codifica antígenos de cada región, son loci cercanos en un cromosoma y se heredan como una unidad y que provee un patrón genético distintivo y como se muestra en la **Figura 2**, se ha identificado y secuenciado el mapa genético extendido del MHC (*Horton, 2004*).

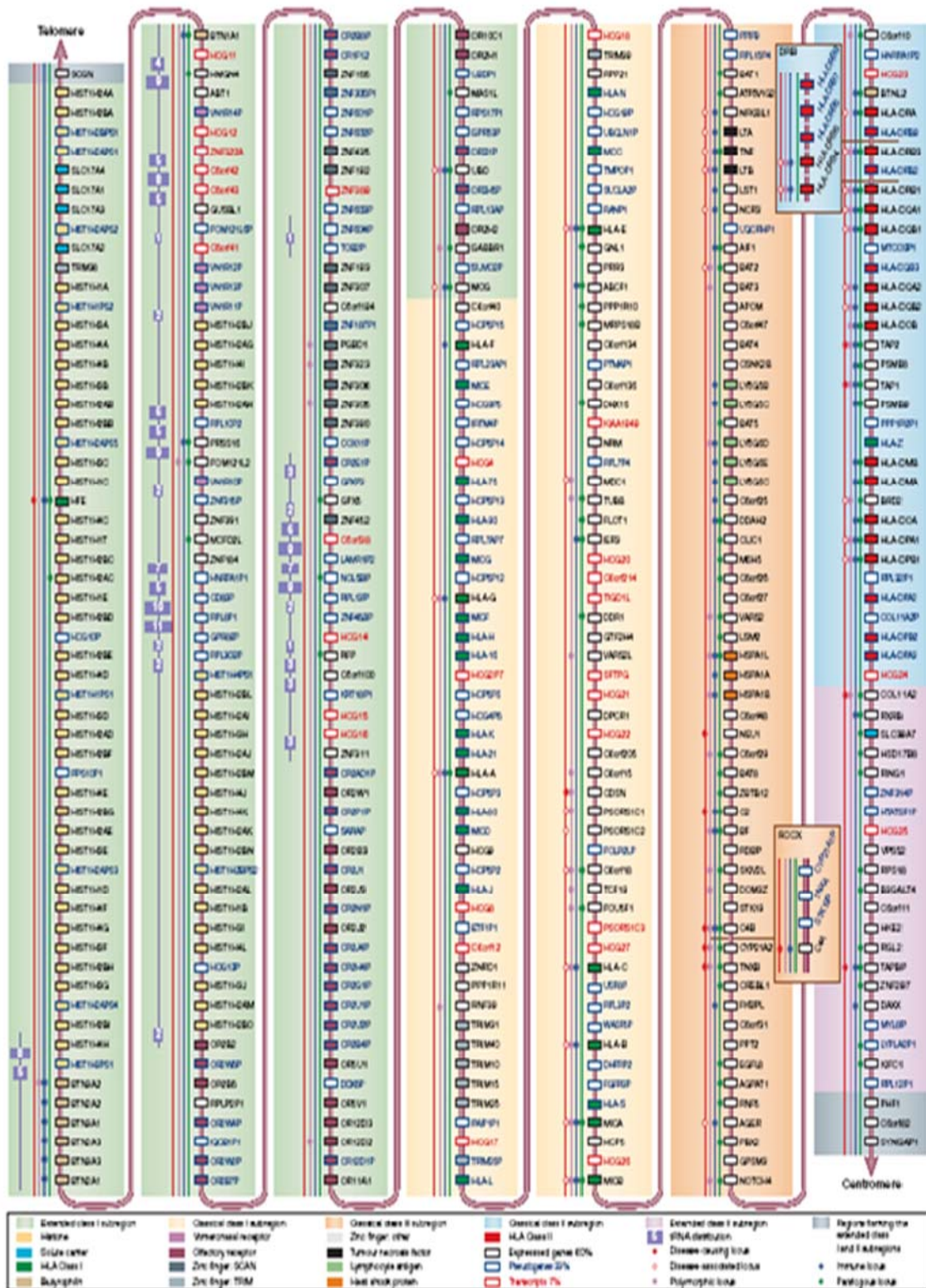


Figura 2. Mapa genético del MHC extendido (xMHC).

Horton, 2004

La existencia de estos diferentes loci fue demostrada inicialmente por la aparición espontánea de recombinaciones entre los mismos o la existencia de líneas celulares mutantes, con pérdidas de uno o varios loci y ha sido confirmada a lo largo de los últimos años por el empleo de técnicas de biología molecular que han permitido aislar y secuenciar estos genes. Gracias a estas técnicas se ha descubierto la existencia en esta región de numerosos genes y pseudogenes pero solamente una minoría tiene estructura clase I o clase II mientras que la mayoría no están relacionados estructuralmente (*Maenaka, 1999*).

Las moléculas de histocompatibilidad presentes en las células del organismo son marcadores para las células del sistema inmunitario de "lo propio" (el yo inmunológico) e intervienen de manera fundamental en la activación tímica de los linfocitos T. La función biológica de las moléculas de histocompatibilidad es la de presentar péptidos antigénicos para la activación de los linfocitos T. En general, la discriminación de lo propio de lo extraño, entre otros, es llevada a cabo por los linfocitos T citotóxicos y son los que reconocen moléculas HLA clase I. Las células T que reconocen moléculas HLA clase II en su la mayoría tienen función reguladora produciendo citocinas.

El termino de HLA clase I fue introducido por Klein para describir los antígenos A, B y C y Clase II para describir los antígenos DR, DQ y DP, nomenclatura que se utiliza hasta la actualidad. Posteriormente, se identificaron otros antígenos Clase I, los HLA-G, -E y -F, que presentan una distribución tisular limitada y han sido llamados Antígenos HLA Clase I No Clásicos mientras que los HLA-A, -B y -C son llamados HLA Clase I Clásicos (*Klein, 1991; Thorsby, 2009*).

Las moléculas de histocompatibilidad de un individuo son antigénicas para otro y por lo tanto activan el sistema inmunológico (*Jones 1997*). Cada célula del organismo, (excepto las células germinales), poseen un haplotipo procedente del padre y otro de la madre. Los genes del MHC son altamente polimórficos, es decir pueden ser estructuralmente diferentes entre individuos de la misma especie. Existen zonas muy conservadas en cada alelo prácticamente idénticas en todos los individuos (*Thorsby, 1999; Trowsdale, 1993*).

En el año 2008, se ha actualizado el directorio de los HLA, previamente se habían publicado cuatro versiones, 1997, 1999, 2001 y 2004. El objetivo del directorio es ayudar a la identificación serológica asociados a los productos de los genes HLA-A, -B, -C, -DRB1 y -DQB1 (*Holsworth, 2009*). Hoy existen casi 3000 alelos que son variantes de los 129 antígenos descritos y que no pueden identificarse por técnicas serológicas o celulares, en el cuadro se muestra el número de alelos con nombre oficial hasta el 31 de diciembre del 2009 (*Marsh, 2010*).

Locus	Número de Alelos
HLA-A	965
HLA-B	1543
HLA-C	626
HLA-E	9
HLA-F	21
HLA-G	46
HLA-DRA	3
HLA-DRB1	762
HLA-DRB2	1
HLA-DRB3	52
HLA-DRB4	14
HLA-DRB5	19
HLA-DRB6	3
HLA-DRB7	2
HLA-DRB8	1
HLA-DRB9	1
HLA-DQA1	35
HLA-DQB1	107
HLA-DPA1	28
HLA-DPB1	138
HLA-DOA	12
HLA-DOB	9
HLA-DMA	4
HLA-DMB	7
TAP1	7
TAP2	4
MICA	68
MICB	30

Cuadro 4. Número de alelos con nombres oficiales en cada locus hasta el 31 de Diciembre de 2009

ESTRUCTURA DE LAS MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD

Según su estructura las moléculas de histocompatibilidad se dividen en dos grandes grupos: moléculas de clase I y moléculas de clase II que se encuentran codificadas por regiones genéticas distintas dentro del MHC y desempeñan distintas funciones inmunológicas (**Figura 3**).

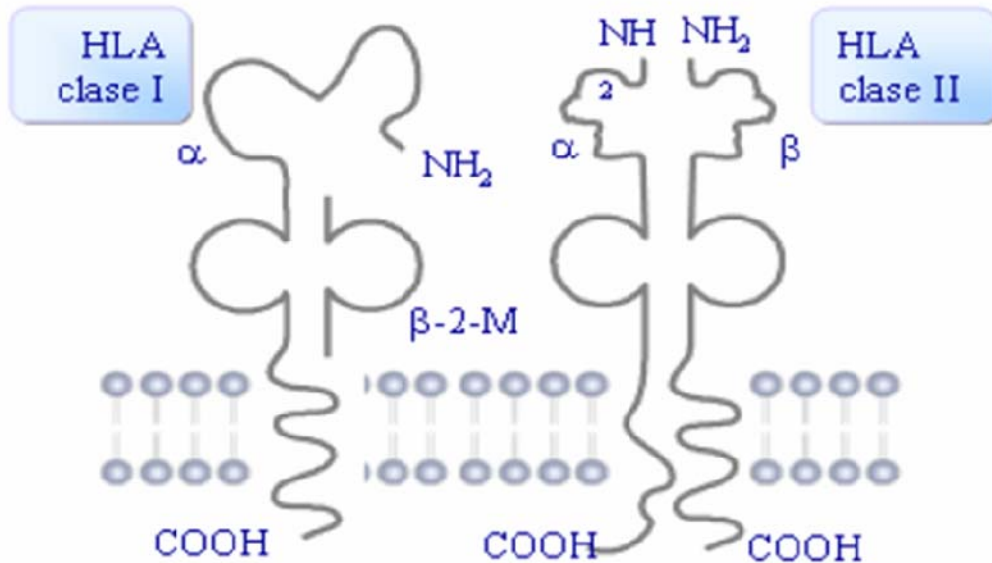


Figura 3. Antígenos de histocompatibilidad clase I y clase II
Ref. Solana

Las estructuras detalladas de las moléculas clase I y clase II han sido determinadas por cristalografía de rayos X (*Dessen, 1997; Smith, 1998*). Cada molécula contiene un dominio extracelular compuesta de cuatro dominios. En sus características generales, las estructuras de las moléculas tanto Clase I como Clase II son muy similares. En ambas, los dominios membranales distales, los α -1 y α -2 de la Clase I y los α -1 y β -1 en la Clase II, se pliegan para formar amplias hendiduras, en tanto que los dominios extracelulares adoptan una estructura similar a inmunoglobulina (immunoglobulin-domain-like). No obstante que ambas tienen estructuras similares existen diferencias que tienen un efecto importante en el mecanismo de interacción con los péptidos antigénicos (*Garboczi, 1994; Gosh, 1995; Saper, 1991*).

Estructura tridimensional.

El análisis de la estructura tridimensional de los antígenos de histocompatibilidad de clase I y clase II, determinada mediante cristalografía, demuestra que los dominios están estructurados de forma diferente. Así, dentro de los antígenos clase I, el dominio α -3 y la β -2-microglobulina están organizados en estructura de hoja plegada β . Por el contrario los dominios α -1 y α -2 constan cada uno de ellos de una sola zona formada por cuatro fragmentos en estructura de hoja β plegada seguido de otro segmento organizado en forma de α -hélice. Esta organización delimita una hendidura denominada sitio de unión al péptido (peptide binding groove) en el que los residuos más polimórficos se encuentran en el suelo y las paredes de la hendidura. En esa hendidura se localiza un péptido que no pertenece a la molécula y de aproximadamente 8-10 aminoácidos. Ese péptido procede de proteínas endógenas e interacciona con las moléculas de histocompatibilidad mediante fuerzas no covalentes entre sitios concretos de ambas estructuras. Un determinado antígeno de histocompatibilidad puede unirse a péptidos diferentes siempre que éstos posean uno o varios motivos que interaccionen con zonas de la molécula cuya estructura tiene residuos polimórficos. La estructura tridimensional de los antígenos de clase II también ha sido determinada por cristalografía y es semejante a la de los antígenos de clase I. Los dos dominios proximales (α -2 y β -2) son los equivalentes al dominio α -3 y a la β -2-microglobulina de los antígenos clase I, mientras que los dos dominios distales (α -1 y β -1) de los antígenos clase II se corresponden con los dominios α -1 y α -2 de la molécula clase I. La hendidura donde se ubica el péptido se forma entre los dominios α -1 y β -1 de las moléculas clase II (*Jones, 1997*).

La región clase I

Esta región del MHC está constituida por 2Mb de DNA, sin embargo, los estudios de secuenciación de DNA genómico sugieren que muchos transcritos se encuentran codificados en esta región (*Gruen, 1997; Janer, 1998; Natarajan, 1999; Shiina 1998*). Las moléculas de los antígenos de histocompatibilidad de clase I (**Figura 4**), tanto en el sistema HLA como en el H-2, se hallan constituidas por 2 cadenas polipeptídicas: una cadena pesada, glicosilada, de mayor tamaño, con un peso molecular de 45 kD, que se

encuentra asociada, mediante interacciones no covalentes a una cadena ligera, la β -2-microglobulina que tiene un peso molecular aproximado de 12.5 kD.

La β -2-microglobulina es un polipéptido idéntico al componente sérico normal, es idéntica en todos los individuos de la misma especie y los genes que la codifican se hallan en el cromosoma 15 en el hombre y en el cromosoma 2 en el ratón. El análisis estructural de la β -2-microglobulina revela que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, con una notoria homología con el tercer dominio constante de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*Grey, 1973*).

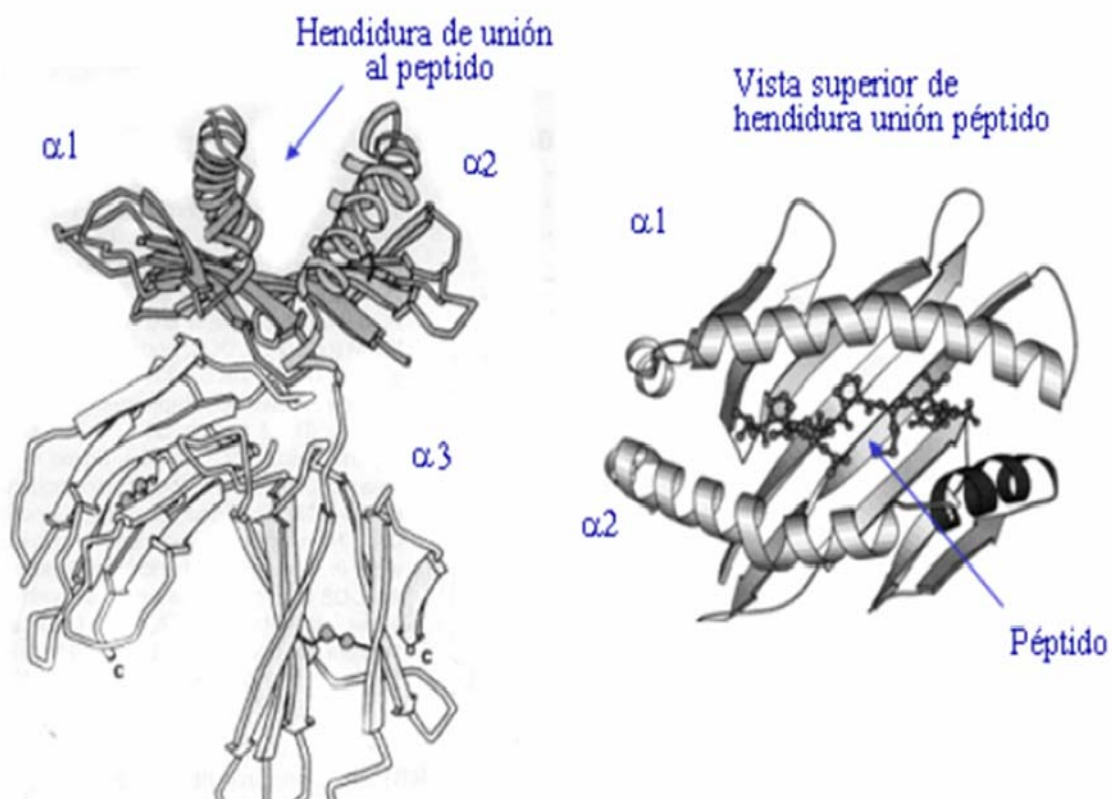


Figura 4. Estructura de HLA clase I. Énfasis en los tres dominios extracitoplasmáticos y el sitio de unión al péptido.

Ref. Solana

La cadena pesada o cadena alfa, por el contrario, es altamente variable entre individuos de la misma especie, siendo la responsable del polimorfismo antigénico de las

moléculas de histocompatibilidad clase I. Se distinguen tres zonas bien definidas, una zona extracelular de mayor tamaño en la que se encuentran los determinantes antigénicos de la molécula, una pequeña región transmembranal, hidrofóbica, y finalmente una región intracitoplasmática de unos 35 aminoácidos. La zona extracelular se halla organizada en tres dominios de aproximadamente unos 90 residuos cada uno, denominados α -1, α -2 y α -3 mantenidos por la existencia de puentes intracatenarios. Los residuos glucocídicos se encuentran unidos a la asparagina en la posición 86 del dominio α -1. Los dominios α -1 y α -2 constituyen regiones de contenido variable en aminoácidos, es decir son las zonas donde radica la variabilidad de la molécula. Por el contrario el dominio α -3 es constante, pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y muestra una notable homología con la región constante de las inmunoglobulinas y con la beta-2-microglobulina (*Fremont, 1998*).

Estructura de las moléculas HLA clase II.

Las moléculas de clase II son glicoproteínas que se encuentran en la superficie celular. Los genes se extienden por aproximadamente 800 kb de DNA y contienen un gen cada 40 kb en promedio. Están formadas por dos cadenas, ambas con un dominio transmembranal, denominadas cadena α o pesada y cadena β o ligera, asociadas entre sí mediante interacciones de naturaleza no covalente. Tanto la cadena α como la cadena β están codificadas en el MHC. La cadena α tiene un peso molecular aproximado de 33kD y la cadena β de 29 kD. Ambas tienen una organización semejante, están constituidas por dos dominios extracelulares, conocidas como α -1 y α -2 en la cadena pesada y β -1 y β -2 en la cadena ligera, cada uno de estos dominios consta de entre 90 y 96 aminoácidos. El dominio α -1 es abierto mientras que los dominios α -2, β -1 y β -2 se pliegan mediante un puente disulfuro. Los dominios α -2 y β -2 pertenecen a las inmunoglobulinas, mientras que los α -1 y α -1 tienen homología con los dominios α -1 y α -2 de los antígenos clase I (*Fremont 1998*). Un tercer dominio corresponde a la región de cada cadena que atraviesa la membrana celular, contiene unos 30 aminoácidos y es de naturaleza hidrofóbica. Finalmente, el cuarto dominio, corresponde a la parte citoplasmática de la molécula, es de naturaleza hidrofílica y contiene de 10 a 16 aminoácidos (*Fremont 1998*).

En la región de Clase II se localizan los genes que codifican las moléculas HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Están compuestas por una cadena α y otra β . Las moléculas HLA-DR y HLA-DQ se identificaron por serología y los antígenos HLA-DP fueron inicialmente definidos por estudios celulares, mediante estimulación secundaria de linfocitos previamente sensibilizados (PLT). El empleo de técnicas de biología molecular ha permitido el aislamiento y secuenciación de los genes de esta región, de manera que hoy se conoce con precisión que la región de Clase II posee un elevado número de genes.

Los genes de la familia DR comprenden un gen DRA que codifica la cadena DR- α y posee escaso polimorfismo y al menos cuatro genes funcionales DRB (DRB1, 3, 4, 5) que codifican cadenas DR- β muy polimórficas. Se han descrito pseudogenes DRB (DRB 2, 6, 8 y 9) que no expresan y cuya función se desconoce. La cadena proteica DR- α puede combinarse con las diferentes cadenas beta codificadas por los genes DRB dando origen a las moléculas de clase II portadoras de las especificidades HLA-DR (*Jones, 1997; Monaco, 1993; Trowsdale 1993*).

Tanto las familias DQ como DP contienen dos pares de genes α y dos β , próximos entre sí, todos son polimórficos con excepción de P- α cuya diversidad es muy limitada. Sólo uno de estos pares, DQA1 y DQB1 y DPA1 y DPB1, codifican las cadenas α y β de las moléculas de clase II HLA-DQ y HLA-DP, respectivamente. Los otros 2 pares de genes DQA2, DQB2 y DQB3 (pseudogenes) y DPA2 y DPB2 poseen un limitado polimorfismo y no se expresan.

Existe otra subregión que contiene un gen α , denominado DNA, y un gen β , DOB, que codifican un nuevo tipo de moléculas clase II. También existe una pareja de genes, HLA-DM, no polimórficos, que se encuentran implicados en el proceso de procesamiento y presentación de antígeno. Cada uno de estos genes esta estructurado en secuencias de intrones y exones relacionados con los dominios estructurales de la proteína codificada por ellos (*Jones, 1997; Monaco, 1993*).

Distribución tisular de las moléculas clase I y II.

Las moléculas de clase I se encuentran presentes en la mayoría de las células nucleares del organismo. Su expresión es mínima o incluso nula, en el endotelio, glándulas de Brunner duodenales, trofoblasto veloso, neuronas del sistema nervioso central y en los espermatozoides. La expresión de las moléculas de clase II se encuentra fundamentalmente restringida a macrófagos, monocitos, linfocitos B y linfocitos T activados, así como en células NK. Su expresión es alta en células que actúan como presentadoras de antígenos, como las células dendríticas del bazo, epidérmicas de Langerhans o células endoteliales, además en progenitores hematopoyéticos, células leucémicas y células de diferentes tipos de neoplasias (*Colonna, 1993; Neumann, 1995*).

La distribución diferencial de las moléculas de histocompatibilidad de clase I y II está directamente relacionada con la función de cada tipo de moléculas y los niveles relativos de las moléculas HLA en diferentes órganos y tejidos es muy variado. Como se ha mencionado previamente, los genes y moléculas No Clásicas Clase I son: HLA-G, HLA-E y HLA-F, que presentan una gran homología con las moléculas clásicas de MHC de clase I (HLA-A, -B y -C). Estos genes son menos polimórficos que los HLA-A,-B o -C y tienen funciones en cuanto a la protección del feto de su destrucción por células inmunológicas maternas e intervienen en la eliminación de células tumorales.

HLA-E: Su estructura tridimensional es muy similar a la de las moléculas clásicas HLA-A, B y C presentando sitios de unión conservados para la β -2-microglobulina y al CD8. Esta molécula, cuando presenta el péptido adecuado, se une a los receptores CD94/NKG2A que inhiben la actividad citotóxica de las NK y ciertos linfocitos T. Se expresa a nivel tisular en baja cantidad y es retenido en el retículo endoplásmico a menos que reciba un péptido de la región N-terminal de otra molécula clase I cuando se encarga de la instrucción de los receptores de la célula NK. Este gen presenta una secuencia parecida a la molécula Qa1 murina, que une péptidos hidrofílicos de la secuencia leader de las moléculas MHC clásicas. Se expresa en pequeñas cantidades en la superficie de la célula, y su expresión está regulada por la presencia de las otras moléculas de histocompatibilidad

presentadas en la superficie celular y es TAP dependiente (*Braud, 1997; Braud,1998; Ulbrecht, 1992*).

HLA- F: Este gen es muy similar en estructura y secuencia a los genes de las moléculas clásicas. Se transcribe en una gran variedad de células y tejidos presentando un polimorfismo limitado. Se sabe que esta molécula se expresa principalmente en amígdalas, bazo y timo. La localización de la proteína es intracelular. Además, está descrito que los tetrameros de HLA-F se unen a los receptores ILTR2 (LIR1) y ILTR4 (LIR2) que son receptores inhibidores de leucocitos (*Jones,1997*).

HLA-G: La molécula HLA-G se caracteriza por un limitado polimorfismo y una distribución celular y tisular restringida al trofoblasto fetal y células del epitelio tímico (*Loke, 1991*). Esta molécula puede presentarse en siete isoformas distintas, codificadas por splicing alternativo, cuatro de ellas son proteínas unidas a membrana (HLA-G1,-G2, -G3 y -G4), mientras que las otras tres isoformas son proteínas solubles (HLA-G5, -G6 y -G7). Inhibe la lisis mediada por células NK y ciertas células T ya que es reconocida por ciertos receptores inhibidores, tales como KIR2DL4, ILT-2 y ILT-4. Es capaz de inhibir la actividad de las células NK de los leucocitos de la decidua sobre los del trofoblasto durante el primer trimestre de gestación por lo que tiene función importante en la tolerancia materno-fetal y participa en la vigilancia del sistema inmune frente a tumores y se ha descubierto un aumento en el nivel de la expresión de esta molécula en la superficie de las células infectadas por el HIV.

Además de los loci antes mencionados, la región clase I tiene al menos 12 pseudo-genes o fragmentos de genes que se relacionan en forma importante con los genes de la cadena pesada de la clase I: HLA-17, -X,-30, -L/92, -J/59, -80, -21, -K/70, -16, -H/54, -90 y -75 (*Geraghty, 1993; Le Bouteiller, 1994*). Además, se ha encontrado un gen relacionado a la clase I a una distancia considerable telomérica del HMC (>4 Mb telomérico al HLA-A) llamado el locus HFE. Una mutación en este gen ha sido implicado en el desarrollo de la hemocromatosis hereditaria (*Feder, 1996*).

Dentro de los HLA Clase I No Clásicos se encuentran los genes MICA y MICB, se encuentran localizados a 46.4 y 141.2 Kb, respectivamente, centromericamente a HLA-B y a aproximadamente 2Mb telomericos a HLA-DRB1, su principal asociación es con enfermedades autoinmunes. Como el resto de los genes HLA, su nomenclatura se basa en los haplotipos de polimorfismos de nucleótidos únicos no-sinónimos (nsSNPs) (*Field, 2008*).

Genes TAP y LMP

El procesamiento de los antígenos para generar los péptidos que serán presentados por las moléculas clase I es un proceso altamente regulado (*Lehner 1998*). Algunas de las proteínas involucradas son codificadas por un grupo de genes que se encuentran localizados dentro de la región clase II. Los genes TAP (TAP1 y TAP2) son miembros de la superfamilia de transportadores ABC (ATP-binding cassette) y encuentran involucradas en el transporte de una amplia cantidad de moléculas a través de las membranas, incluidos oligopéptidos, proteínas y iones (*Higgins, 1990*). Los productos de los dos genes TAP forman un complejo en el retículo endoplásmico (RE) que transloca péptidos del citoplasma hacia la luz del RE (*Momburg 1994*). Ya dentro, los péptidos pueden participar en el ensamblaje de las moléculas clase I, existiendo una asociación entre las moléculas clase I y los TAP's, esto mostrado porque ambos pueden ser co-inmunoprecipitados (*Ortmann, 1994; Ortmann, 1997*). Además, las células que presentan anomalías o deficiencias en TAP1 o TAP2 tienen una reducción en el nivel de expresión de moléculas clase I en la superficie celular además de que son incapaces de presentar los antígenos intracelulares a linfocitos T citotóxicos (*Kelly, 1992*).

Los genes LMP, LMP2 y LMP7 se encuentran localizados muy cerca de los genes TAP y codifican componentes del complejo de proteosoma (*Goldberg 1995*). Las siete diferentes subunidades-beta de este complejo forman una estructura similar a un anillo. Una treonina libre en la localización N-terminal de cada unidad madura provee parte del sitio activo de cada subunidad (*Glynnne, 1993*). La expresión de LMP2 y LMP7 así como la de TAP y las moléculas clase I pueden ser inducidas por interferon-gamma.

RING3

RING3 es el único gen de la región clase II del HMC que codifica una proteína sin una función inmunológica obvia. El producto de este locus presenta homología con el gen *Drosophila*, hembra estéril homeótica, *fsh* (Beck 1992).

TAPASINA

Esta molécula es miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas y es necesaria para la asociación correcta entre TAP y las moléculas del HMC dentro del retículo endoplásmico (Ortmann, 1997). Tapasina contiene un dominio inmunoglobulina, que se encuentra adyacente a la membrana del retículo endoplásmico y es codificada por un exón diferente (Herberg, 1998). El resto de la molécula tiene pequeñas semejanzas con las secuencias de las Ig y los intrones se encuentran en posiciones atípicas, lo que hace pensar que la secuencia de tapasina tiene una filogenia diferente. El locus de tapasina es centromérico a HLA-DP, entre los genes HSET y HKE1.5, cerca de 500kb de loci de TAP .

REGULACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES DEL MHC

En la parte 5' no traducida de los genes se encuentran las áreas reguladoras (llamadas elementos cis) constituidas por el promotor (área estrictamente necesaria) y los facilitadores e inhibidores que modulan la expresión basal de los genes. El promotor suele estar situado a una distancia de unas 300 bases desde el inicio de la transcripción, mientras que los facilitadores o inhibidores se encuentran a distancias variables. Sobre estas áreas cis se fijan unas proteínas llamadas factores de transcripción (elementos trans) que son necesarios para que se active la polimerasa II, enzima que inicia la transcripción. En muchos casos, la inducción de la expresión de los genes se debe a modificaciones post-transtraduccionales de estas proteínas como son la fosforilación o la glicosilación. Hasta ahora no se conoce el mecanismo exacto de la expresión de los genes de clase I y II aunque se han descrito algunos de sus elementos cis y trans (Thorsby, 1999).

Los genes de clase I y β -2-microglobulina tienen regiones cis muy parecidas y su expresión está coordinada. Se han detectado tres regiones cis en el promotor a las que se unen factores de transcripción y que se llaman aumentadores A y B y entre ellos el IRE (elemento de respuesta al interferón). Además, existen dos inhibidores en dos regiones a unas -700 y -400 bases. Sobre las áreas cis se unen factores de transcripción que no son específicos del promotor de clase I, sino que regulan muchos genes. En la región I del aumentador A se une RXR β que es un elemento de la familia de los receptores de la hormona tiroidea y del ácido retinoico y que se une a AP-1 (Proteína Activadora 1) que es un complejo de los oncogenes jun y fos originando un heterodímero que aumenta su afinidad por el DNA (*Thorsby, 1999*).

En la región II del facilitador A se une el NF-kB (Nuclear Factor-kB). En la región IRF se unen proteínas que se inducen por efecto del interferón y que se fosforilan por una tirosina quinasa. Por último, en el aumentador B parece que se unen proteínas del grupo AP-1 que responde a la inducción con AMP cíclico.

En el promotor de todos los genes de clase II y de todas la especies descritas, existen tres áreas con secuencias que tienen una gran homología entre los genes y que se denomina X, Y y W separadas entre sí por unas 20 bases. Estas áreas son esenciales para la transcripción (elementos cis) y sobre ellas se unen una serie de factores de transcripción. La caja Y contiene una secuencia CCAAT sobre la que se une el NFY (Nuclear Factor Y) compuesto por dos proteínas A y B, ambas se requieren para una unión eficiente al DNA. Sobre la caja W se une un factor no caracterizado hasta ahora y sobre la caja X, dependiendo del extremo 5'(X1) se han descrito proteínas RF-X y NF-X y sobre el extremo 3'(X2) se unen hXBP y el complejo AP-1 (fos-jun) aunque estas interacciones con el DNA no están muy claras. La distancia crítica que separa estas cajas sugiere que los factores de transcripción que se unen a ellas interaccionan dando lugar a que se inicie la transcripción. Sin embargo, no sabemos que es lo que hace que se induzca clase II por efecto del interferón - gamma o porque en algunos casos la inducción de clase II sea constitutiva (*Thorsby, 1999*).

RELACION ENTRE LOS GENES HLA Y LAS NEOPLASIAS MALIGNAS

La asociación de una neoplasia con el polimorfismo genético del HLA fue descrita por primera vez en la década de los 80's, desde ese entonces hasta la fecha se han descrito múltiples asociaciones con un incremento en la incidencia de enfermedades en individuos que poseen ciertos polimorfismos del HLA. Algunas de estas asociaciones han sido considerablemente fuertes, como los son las asociaciones de la enfermedad celiaca y los alelos DQA1*0501 y DQB1*0201 (*Tighe, 1993*). Es de suma importancia mencionar que las asociaciones mas importantes no se encuentran relacionadas a neoplasias sino mas bien a otro tipo de condiciones como enfermedades autoinmunes y alergias, conociéndose a la fecha mas de 400 enfermedades asociadas a polimorfismos en el HLA, en el cuadro 5 se muestran solo algunas de ellas (*Bateman, 1999*).

La expresión de HLA en las neoplasias puede encontrarse disminuida, dicho acontecimiento en la expresión de HLA Clase I (por ejemplo) ocurre en el proceso de transformación neoplásica en diferentes tumores, dentro de los que se incluyen el melanona, cáncer mamario, de cérvix y pulmón, entre otros. En la literatura mundial se encuentra cada vez con mayor frecuencia reportes de que ciertos polimorfismos del HLA se encuentran asociados no solo con la mayor incidencia de la enfermedad sino que también han sido descritos como factores pronóstico. Como ejemplo tenemos que los individuos que desarrollan cáncer de colon y que poseen el alelo HLA-DQB1*0301 presentan una menor incidencia de enfermedad avanzada al momento del diagnóstico, lo que puede sugerir que esta molécula de HLA altera de alguna manera el curso de la enfermedad (*Fossum, 1994*).

La participación exacta de HLA en el desarrollo de las neoplasias no se encuentra claramente definido, es de hacer notar que las asociaciones pueden no ser muy importantes (como en el caso de linfoma T asociado a enfermedad celiaca) pero continúan siendo asociaciones significativas. En el cuadro se muestran algunos ejemplos y como es posible observar el riesgo no es mas grande que 8 veces.

Disease	Associated HLA locus/allele	Relative risk
Hodgkin's disease†	DPB1*0301	2.0
	DPB1*0401	0.9
	DPB1*0901	—
Cutaneous T-cell lymphoma	DR5	3.9
	DQB1*03	2.7
Burkitt's lymphoma	A1, B12, DR7	3.4 (DR7)
Childhood common ALL‡	DPB1*0201 and/or DPB1*0501	2.8
EATL§	DQA1*0501, DQB1*0201	44.2
Cervical intraepithelial neoplasia	DQB1*03	2.6
	DQB1*0602	2.2
Cervical squamous cell carcinoma	DQB1*0301	8.7
	DQB1*0303	4.5
	DQB1*0602	3.4
Kaposi's sarcoma	DR5	4.8
Colorectal carcinoma	DQB1*0301	—
Cutaneous basal cell carcinoma	DR1	2.1–3.0

†HLA-DPBA*0401 is associated with a protective effect for Hodgkin's disease in Orientals, while DPB1*0901 is associated with a shorter duration of disease remission in Japanese patients.

‡Acute lymphoblastic leukaemia.

§Enteropathy-associated T-cell lymphoma.

||HLA-DQB1*0301 may be associated with less advanced tumours.

Cuadro 5. HLA asociados a neoplasias.

Ref. Bateman, 1999

En las enfermedades asociadas a HLA, ciertos alelos parecen ser requisito para que se presente la condición. Sin embargo, no todos los individuos que presentan cierto alelo asociado van a presentar la enfermedad, lo que lleva a pensar que se requieren otros factores que en combinación con el HLA harán que se presente la enfermedad o en este caso la neoplasia maligna (*Thorsby, 1995*). Por ejemplo, es claro el papel que juega el virus del papiloma humano (VPH) en el desarrollo de cáncer cervicouterino, sin embargo no todas las mujeres infectadas con un virus de alto riesgo desarrollaran el tumor, lo que indica que son necesarios otros factores para el desarrollo de la misma, uno de ellos puede ser la habilidad para incrementar la respuesta inmune contra el VPH por la capacidad de presentación de péptidos antigénicos virales al linfocito T por las moléculas de HLA. La presencia de los alelos HLA-DQB1*0301, *0303 y *0602 se encuentran asociados a persistencia de la infección por VPH y posterior desarrollo del cáncer cervicouterino (*de Araujo, 2009; Gregoire, 1994; Wank, 1993*), de manera similar la presencia del HLA-B*07 se asocia con un pobre pronóstico y mayor riesgo de presentar enfermedad metastásica. El hecho de que cierto polimorfismo se encuentre asociado a una condición en particular no importando que población se esté estudiando implica que ese alelo HLA en particular es importante para la patogénesis de la enfermedad, mientras que si diferentes alelos del HLA en diferentes poblaciones son asociados, no necesariamente significa que el HLA no se encuentra asociado en la patogénesis sino que hace pensar en que son necesarios otros co-factores para la presentación de la enfermedad (por ejemplo las infecciones) (*Duggan-Keen, 1996; Ellis, 1995*).

En cáncer pulmonar, la expresión tumoral de HLA-DR medido como porcentaje de células positivas muestra una correlación directa con la supervivencia de los pacientes en forma general no siendo influenciado por el estadio clínico, esto ha sido observado tanto para carcinoma de células escamosas como para células pequeñas, lo cual muestra que la respuesta inmune juega un papel importante en la evolución de estos tumores (*Nakamura, 2002*).

En cáncer mamario existen pocos estudios sobre la asociación existente entre los antígenos HLA y la susceptibilidad o protección en el desarrollo de la neoplasia. La primera evaluación de la asociación HLA clase II fue realizada por Chaudhuri et al en un grupo de 173 pacientes con cáncer mamario y 215 controles de origen caucásico, mostrando estar presente el alelo DRB3*0201/*0202 en el 55% de los casos y en el 40.9% de los controles ($p=0.0072$) como factor de riesgo mientras que concluyen que los alelos DQB*03032 y DRB1*11 representan factores de resistencia a la enfermedad (*Chaudhuri, 2000*). Este es un ejemplo de los resultados obtenidos, sin embargo existen datos contradictorios como los que muestra Chen et al. En su reporte de casos y controles realizado en Taiwan sobre genes HLA Clase II y su posible asociación con cáncer mamario. Se determinaron los polimorfismos de los genes HLA-DQA1 y -DQB1 en 101 pacientes con cáncer y 115 controles. Sus hallazgos no muestran significancia estadística en cuanto a la incremento en el riesgo o protección, al menos en este grupo poblacional (*Chen, 2007*).

Como hemos mencionado previamente, los genes que codifican los HLA son los loci mas polimórficos dentro del genoma humano y son estos los que codifican secuencias específicas de las hendiduras y dobleces de las moléculas de HLA, alterando la conformación de las hendiduras de unión lo que conlleva a un cambio en la eficiencia de la unión de los péptidos antigénicos y la presentación a los linfocitos T. Por tanto, los diferentes alelos del HLA pueden alterar la tasa de respuesta inmune de un individuo tanto a los antígenos propios como de microorganismos o de tumores (*Bateman, 1999; Castro, 2009; Chaudhuri, 2000; Gudmundsdottir, 2000; Shih, 2009*).

El desarrollo tumoral tiene un escenario multifactorial, en el caso particular de cáncer mamario, como hemos mencionado previamente, mas del 50% de las pacientes con la neoplasia no presentan los factores de riesgo para el desarrollo de la misma. Hasta el momento, en la literatura no se encuentran reportes en población mestiza mexicana sobre los diferentes alelos del HLA tanto Clase I clásicos como Clase II y su posible asociación con la presentación de cáncer mamario, de ahí la importancia de investigar si existe algún tipo de asociación alelo específico de los HLA en un grupo de mujeres de nuestra población.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Existe asociación entre la presencia de los diferentes alelos de los genes del complejo HLA y Cáncer Mamario en las mujeres mestizas mexicanas?

JUSTIFICACION.

La frecuencia de cáncer mamario en México es alta, por lo que es considerado como un problema de salud, aunque se presenta en cualquier grupo de edad, tiene como característica una edad menor de presentación a la que ocurre en otros países. Como se ha mencionado anteriormente, entre el 50 y el 80% (*DeVita, 2001; Harris, 2000*) de las pacientes no presentan los factores de riesgo clásicos para la enfermedad. No existen reportes de la frecuencia de los alelos de genes HLA en población mestiza mexicana con cáncer mamario.

HIPÓTESIS

Nula = No habrá diferencia en la distribución de los alelos de los loci de los HLA en pacientes con carcinoma mamario y testigos.

Alternativa = Se encontrará una diferencia en la distribución de los alelos de los loci de HLA en pacientes con carcinoma mamario y testigos.

OBJETIVOS

Determinar la posible asociación entre los diferentes HLA-A, HLA-B, HLA-Cw, HLA-DRB1, HLA-DQA1 Y HLA-DQB1 en pacientes mexicanas mestizas con cáncer mamario y un grupo de mujeres sin la enfermedad.

DISEÑO DE ESTUDIO

Diseño: Estudio de Casos y Controles.

Población a estudiar:

- a) Pacientes con diagnóstico confirmado por biopsia de CARCINOMA MAMARIO que acuden por primera vez al Instituto Nacional de Cancerología de México.
- b) Individuos sin evidencia de enfermedad mamaria que acudan a un Centro de Salud de la localidad para evaluación mamaria.
- c) Que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- 1.- Pacientes con diagnóstico confirmado de Cáncer de la Glándula Mamaria, tipo histológico canalicular o lobulillar.
- 2.- Pacientes mayores de 18 años.
- 3.- Cualquier Estadio Clínico.
- 4.- Que sean Mexicanos de por lo menos 2 generaciones nacidas en México.
- 5.- Firma de consentimiento informado.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- 1.- Pacientes con diagnóstico de cáncer y embarazo.
- 2.- Imposibilidad para obtención de información acerca de la familia.
- 3.- Asociación con enfermedades de origen autoinmune o asociadas a HLA.
- 4.- Que no deseen participar en el estudio.
- 5.- Pacientes sin diagnóstico de neoplasia maligna que durante la evaluación inicial se detecte anomalía mamaria que requiera una evaluación mayor.
- 6.- Que esté tomando Terapia de Reemplazo Hormonal Estrogénico.
- 7.- Historia de Enfermedad proliferativa benigna de la mama.

DEFINICION DE CASO Y CONTROL

Caso:

Se define como caso una paciente que sea mestiza mexicana, que por lo menos dos generaciones previas hayan nacido en México, a la cual se le haya diagnosticado cáncer mamario confirmado por histopatología, que acuda al servicio de Tumores Mamarios del Instituto Nacional de Cancerología de México (**Anexo 1**).

Controles:

Se define a un control como aquella mujer que sea mestiza mexicana, que por lo menos dos generaciones previas hayan nacido en México, proveniente de población abierta, sin historia familiar de ningún tipo de cáncer, haciendo énfasis en Cáncer mamario, Colon, Ovario, Próstata. Sin historia de enfermedades autoinmunes o asociadas a HLA. Que haya sido sometida a exploración mamaria y/o estudios radiológicos que descarten patología a este nivel según la edad de la paciente. Que acuda a evaluación por alguna otra razón a un centro de Salud de la Localidad.

Se aplicó una historia clínica orientada a la determinación de los antecedentes personales y familiares de interés, en caso de que una respuesta no pudiera ser obtenida o fue positiva, la paciente se excluyó del estudio (**Anexo 2**), tanto la realización del interrogatorio como la exploración física y los exámenes radiológicos se realizaron por un médico y/o el investigador principal.

La determinación de ausencia de patología mamaria se realizó de acuerdo con la edad de la paciente siguiendo las guías de la American Cancer Society del presente año para la detección temprana del cáncer mamario (*American Cancer Society, 2003*):

a) En Mujeres menores de 40 años se realizó examen clínico exclusivamente, en caso de requerir una mayor evaluación se descartó como control y se excluyó del estudio.

b) En Mujeres mayores de 40 años se realizó examen clínico así como estudio de mastografía y ultrasonido mamario como medio de determinación de patología mamaria.

* En caso de obtenerse un resultado anormal o que requiera mayor evaluación se descartó como control.

* En caso de demostrarse patología mamaria maligna se consideró como paciente caso.

MATERIALES Y METODOS

TIPIFICACION DE HLA

Se realizó extracción del DNA genómico a partir de las células mononucleares obtenidas de sangre periférica y se extrajeron mediante técnicas estandarizadas (*Davis, 1980; Miller, 1988*).

Para la tipificación de alelos HLA se utilizó el kit LABType ® SSO Typing Test (One Lamda, Inc. Canoga Park CA, USA). Que tiene como principio la utilización de la tecnología Luminex® para el método de tipificación de dot blot reverso. Inicialmente, el DNA a estudiar se amplifica mediante técnica de PCR utilizando sondas grupo específico. El producto de la PCR se acopla a biotina y se detecta con estreptavidina conjugada R-Phycoeritina (SAPE). El producto de la PCR es desnaturalizado lo cual permite re-hibridar con sondas conjugadas específicas de DNA complementario adheridas a microesferas fluorescentes. Un analizador de flujo, el LABScan® 100, identifica las intensidad de la fluorescencia de la phycoeritrina en cada una de las microesferas. La asignación del tipo de HLA se basa en el patrón de la reacción comparada con patrones asociados a secuencias de genes de HLA ya conocidos.

En resumen, el protocolo de la técnica (en el **Anexo 3** se encuentra la versión amplia de la técnica según el folleto del proveedor) :

A. Inicio

- 1.- Encender el analizador LABScan® 100. Encender el termociclador e iniciar el programa de incubación a 60°C
- 2.- Preparar el baño de hielo.
- 3.- Descongelar y vortex D-mix y DNA.
- 4.- Desempacar todos los reactivos y dejarlos a temperatura ambiente.
- 5.- Mezclar todo el volumen del amortiguador de hibridación y la mezcla Bead en un tubo limpio. Proteger de la luz.

B. Amplificación

- 1.- Descongelar todos los reactivos de amplificación y colocarlos en hielo.
- 2.- Colocar aliquotas de 2 μ L de DNA genómico en cada uno de los 96 pozos de la charola de PCR.
- 3.- Mezclar 432 μ L de Primer Mix, 1491 μ L de D-mix y 22 μ L de Taq Polimerasa. Vortex en forma adecuada.
- 4.- Colocar aliquotas de 18 μ L de la mezcla de amplificación del paso 3 a cada uno de los 96 pozos que contienen el DNA.
- 5.- Sellar la placa de PCR.
- 6.- Colocar la placa en un horno de PCR utilizando el programada LABType® SSO.
- 7.- Retirar la placa de PCR del horno y verificar el DNA amplificado en un gel de agarosa el 2.5% (utilizar 5 μ L por pozo).

C. Desnaturalización / Neutralización

- 1.- En una placa de 96 pozos para PCR, colocar 2.5 μ L de Amortiguador de Desnaturalización por pozo.
- 2.- Agregar 5 μ L por pozo de DNA amplificado. Identificar cada uno de los pozos.
- 3.- Mezclar adecuadamente hasta que la mezcla obtenga un color rosa brillante.
- 4.- Incubar a temperatura ambiente (20-25°C) por espacio de 10 minutos.
- 5.- Agregar 5 μ L de Amortiguador de Neutralización por cada pozo.
- 6.- Mezclar adecuadamente hasta que la mezcla cambie de color a transparente o amarillo claro.
- 7.- Colocar la placa en un baño de hielo.

D. Hibridación / Lavado

- 1.- Colocar aliquotas de 38 μ L de la mezcla de hibridación (punto A.4) por cada pozo de DNA neutralizado.
- 2.- Sellar la placa y vortex velocidad baja.

- 3.- Incubar la placa a 60°C en el termociclador por 15 minutos.
- 4.- Agregar 100µL de Amortiguador de lavado a cada pozo. Sellar nuevamente la placa y centrifugar a 1000g por 5 minutos.
- 5.- Eliminar el sobrenadante dejando 10µL o menos.
- 6.- Repetir los pasos D.4 y D.5 dos veces mas hasta completar 3 lavados.
- 7.- Durante el último paso de centrifugación, preparar 1X SAPE (57.5µL de stock y 5693µL de Buffer SAPE) dejar a temperatura ambiente.

E. Marcado

- 1.- Después de eliminar el sobrenadante del tercer lavado (D.6), agregar 50µL de SAPE por cada pozo.
- 2.- Sellar adecuadamente la placa y vortex a baja velocidad.
- 3.- Incubar a 60°C en un termociclador por 5 minutos.
- 4.- Agregar 100µL de Amortiguador de Lavado a cada pozo. Sellar nuevamente y centrifugar a 1000g por 5 minutos.
- 5.- Eliminar el sobrenadante. Agregar Amortiguador de Lavado hasta completar 80µL.
- 6.- Mezclar con pipeta y transferir todas las muestras a una microplaca para la obtención de los datos.

Estos procedimientos se realizaron en colaboración con los laboratorios del Instituto Nacional de Cancerología de México y el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición “ Salvador Zubirán “ y la Cruz Roja Americana, bajo la supervisión del comité tutorial.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó estadística descriptiva. Las frecuencias de alelos y haplotipos se estimaron utilizando el programa Arlequin versión 2.000 (*Excoffier, 2005*). Se determinó el desequilibrio de enlace de dos Loci (LD) utilizando el programa Popgen versión 1.31 (*Yeh, 1999*). El cálculo de Razón de Momios (OR) se realizó utilizando la fórmula de Woolf modificada por Haldane (*Haldane, 1955*) $OR = [(a + 0.5) (d + 0.5) / (b + 0.5) (c + 0.5)]$ donde a y b son el número de pacientes y controles positivos para un alelo, respectivamente, mientras que c y d representan el número de pacientes y controles negativos para el alelo, respectivamente.

El valor de P corregida fue calculada utilizando el método de Bonferroni (*Dewey, 1998*), la P corregida = $1 - (1-p)n$, donde n= número de comparaciones.

La asociación entre el gen de HLA y el cáncer de mama fue evaluado mediante una tabla de 2X2 de acuerdo con el método descrito por Svejgaard y Ryder (*Svejgaard, 1994*).

La significancia estadística se tomó cuando el valor de $p < 0.05$.

CALCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

En la literatura no existen datos que reflejen la frecuencia de asociación de los alelos de HLA que se plantea estudiar.

Si se tomó como referencia al estudio de Chaudhuri et al en un grupo de 173 pacientes con cáncer mamario y 215 controles de origen caucásico, mostrando asociación del alelo DRB3*0201/*0202 en el 55% de los casos y en el 40.9% de los individuos sanos (*Chaudhuri, 2000*) y definiendo una razón de momios de importancia de 2.5 se calcula el tamaño de muestra tomando como referencia el texto de Estudios de Casos y Controles de Schlesselman (*Schlesselman, 1982*) con una prevalencia en el grupo de controles de 40%

con un nivel de significancia del 95% ($\alpha = 0.05$) y un poder del 90% ($\beta = 10\%$) se obtiene un total de sujetos de 102 para el grupo de casos y si se toma una relación de dos controles por caso se incluirán 204 controles para una muestra total de 306 individuos, tal como lo muestra en el cuadro que se encuentra en el **apéndice A**.

ASPECTOS ETICOS

El proyecto fue sometido y aprobado por los Comité de Investigación y Etica del Instituto Nacional de Cancerología de México. Todos los participantes lo hicieron de manera voluntaria y dieron su aceptación de participación al firmar carta de consentimiento por escrito (**Anexo 4**).

ASPECTOS FINANCIEROS

El trabajo fue apoyado por el Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Cancerología de México y de la Cruz Roja Americana.

ACTIVIDADES REALIZADAS POR EL ALUMNO

1. Captación de pacientes con diagnóstico de Carcinoma Mamario en la consulta del Departamento de Tumores Mamarios del Instituto Nacional de Cancerología de México y controles sanos.
2. Recolección de datos demográficos y clínicos de pacientes y controles.
3. Toma de las muestras sanguíneas.
4. Extracción del DNA de las muestras sanguíneas.
5. Procesamiento del DNA para la determinación de los diferentes HLA.
6. Análisis de los resultados clínicos y genéticos.
7. Realización del análisis estadístico.
8. Escritura del trabajo y envío a publicación.

RESULTADOS

La relación final de casos y controles fue de 1:1, lo cual fue modificado del punto inicial solo por cuestiones financieras.

Se recolectaron las muestras sanguíneas de 100 pacientes que cumplían los criterios de inclusión y exclusión con diagnóstico confirmado de cáncer mamario, de igual manera se obtuvieron 99 muestras de controles sanos.

La edad de las pacientes con cáncer mamario oscila entre los 27 y 82 años (promedio de 50.4 ± 12.8 años), la distribución de la misma fue normal (**Figura 5**). En los individuos sanos al evaluar estadísticamente las variables demográficas no se muestran diferencias significativas.

Sesenta y dos casos no presentaban historia familiar de cáncer mamario y en 27 casos se presentaba al menos un familiar de primer grado con este tipo de neoplasia, edad promedio de menarca fue de 12.8 años. El 53% de las mujeres no utilizaban ningún método de planificación familiar mientras que el uso de hormonales orales u otro tipo de terapia hormonal solo se presentaba en 29 pacientes. La historia de tabaquismo como factor de riesgo estaba presente en solo 16% de las pacientes.

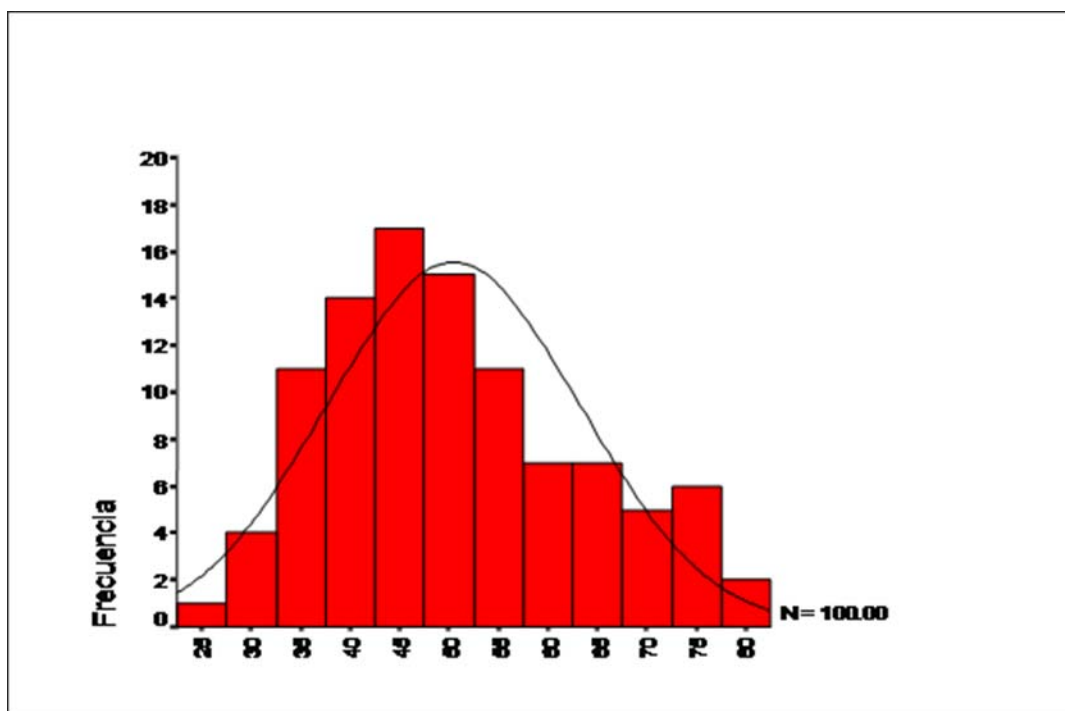


Figura. 5 Curva de Distribución de las Edades en el Grupo de Casos

Los estadios clínicos localmente avanzados y avanzados fueron los mas frecuentes (64%) en comparación con los estadios tempranos, tal como se muestra en la **Cuadro 6**. Es de hacer notar que en el 15% de los casos no es posible la determinación del estadio clínico ya que las pacientes fueron atendidas previamente en algún otro hospital.

ESTADIO CLINICO	Número de Casos	Porcentaje
I	8	8.0%
IIa	13	13.0%
IIb	23	23.0%
IIIa	19	19%
IIIb	13	13.0%
IV	9	9.0%
No Clasificable	15	15.0%

Cuadro 6. Distribución de Estadios Clínicos

La distribución por tipo histológico, como era de esperarse por la frecuencia de las neoplasias, se obtuvieron 94 casos de carcinoma ductal infiltrante y solo 6 carcinoma lobulillar infiltrante. En cuanto al grado de diferenciación encontramos que el carcinoma poco diferenciado es el mas frecuente en este grupo de pacientes con 56% de los casos mientras que el moderadamente y el bien diferenciado se presentaron en 38% y 6% de los casos respectivamente.

El tamaño tumoral fue posible determinarlo en 89 casos siendo en promedio de 5.2cms (SD \pm 3.49) con un rango de 1 a 17 cms., así mismo la distribución del estado ganglionar clínico fue posible determinarlo en 94 pacientes, siendo el mas frecuente el Estado ganglionar N1 con 46 casos y el segundo mas frecuente fue el N0 con 23 pacientes, como se muestra en la **Figura 6**.

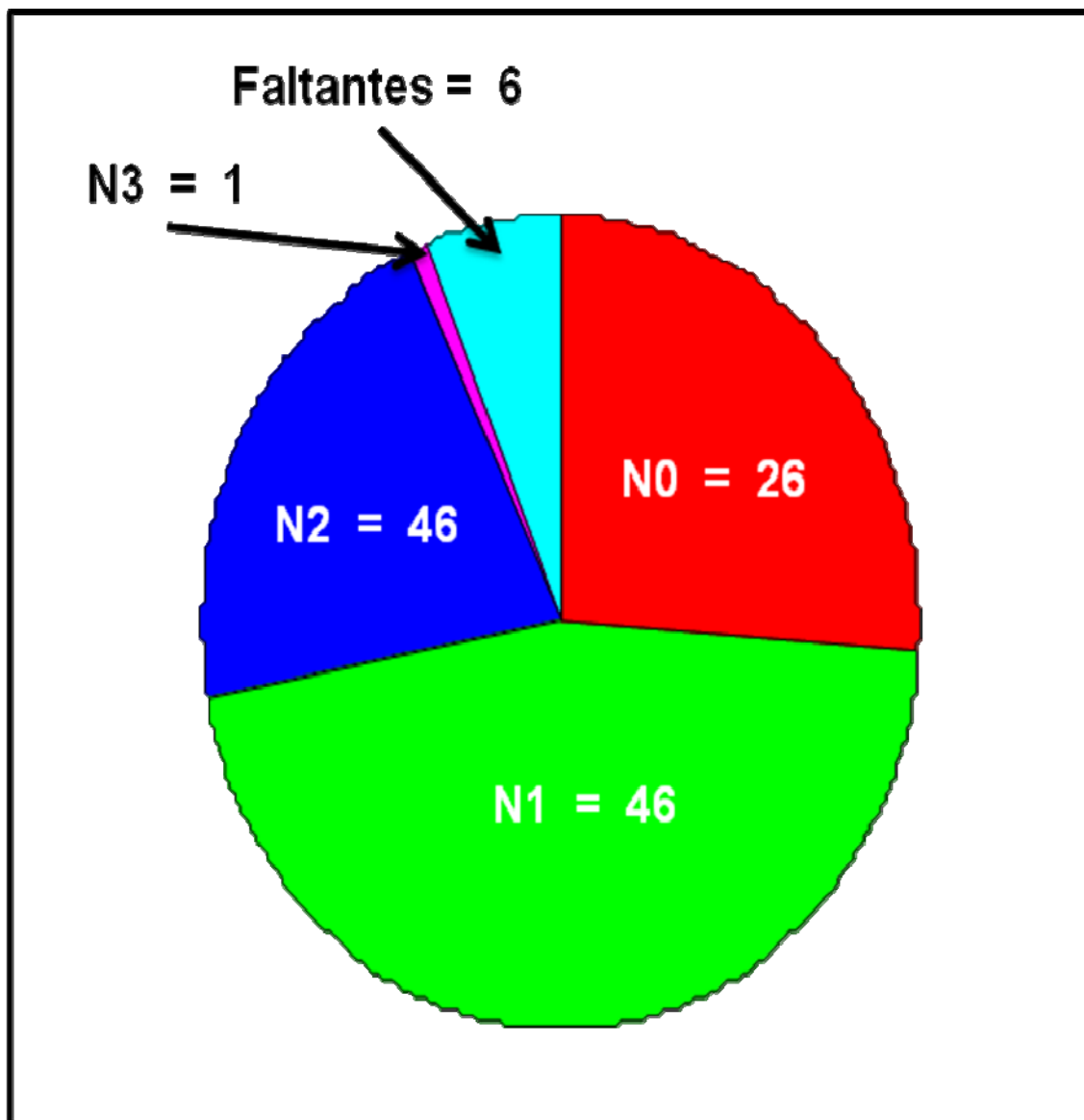


Figura 6. Distribución del Estado Ganglionar

La distribución de los receptores hormonales se presentó de la siguiente manera:

- Receptores Estrogénicos Positivo en 54 casos
- Receptores Estrogénico Negativo en 45 casos
- Receptores Progestacionales Positivo en 29 casos
- Receptores Progestacionales Negativo en 50 casos

Es un caso no fue posible la realización de la determinación de los receptores hormonales.

La distribución de los grados de diferenciación con respecto a la Escala de Scarff-Bloom-Richardson observamos que los tumores de alto grado se presentaron en 67% de las pacientes, el resto de la distribución según esta escala se muestra en el **Cuadro 7**.

	Frecuencia	Porcentaje
3	6	6.0
4	7	7.0
5	7	7.0
6	12	12.0
7	26	26.0
8	21	21.0
9	20	20.0
No Evaluado	0	0.0
Total	99	99.0
Faltantes	1	1.0
Total	100	100.0

Cuadro 7. Distribución de Casos según la Escala de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) de Diferenciación Tumoral.

En el momento de la realización del presente estudio 61 pacientes se encontraban sin evidencia de actividad tumoral mientras que 39 casos habían presentado recurrencia de la enfermedad (datos no mostrados ya que no es el objetivo del presente trabajo).

En la **Cuadro 8** se muestran los diferentes alelos de los HLA clase I y Clase II estudiados en el grupo de pacientes así como las frecuencias génicas de los mismos, en la **Cuadro 9** se muestran los diferentes alelos de los HLA clase I y Clase II estudiados en el grupo testigo, así como las frecuencias génicas de los mismos.

En la **Cuadro 10** se muestran los alelos con frecuencias génicas mas altas de HLA-A que fueron evaluados pudiéndose observar que no existe diferencia entre ambos grupos desde el punto de vista estadístico, aunque notamos una tendencia para riesgo en uno de ellos (*0206) como una para protección en otro (*6801) cabe mencionar que cuatro alelos fueron los mas frecuentes en ambos grupos el HLA- A*0201, *2402, *0206 y el *3101. Se muestra además las tipificaciones de alta resolución del HLA – B con mayor frecuencia génica comparados, si bien solo uno mostró diferencia estadísticamente significativa para factor de riesgo al encontrarse con una frecuencia tres veces mayor en el grupo de los casos en comparación con los controles, el HLA – B*1501 con un OR de 3.714 y $p=0.031$ ($P_c = 0.30$), podemos decir que ambos grupos han sido obtenidos de la misma población mestiza mexicana.

El HLA- Cw es un gen poco estudiado en este tipo de neoplasias, bien podemos decir que al menos en este grupo de mujeres obtenidas de una población étnicamente semejante no es un marcador ni para riesgo o para protección para la enfermedad ya que no encontramos diferencias entre los dos grupos.

En la **Cuadro 11** podemos observar la distribución de HLA- DR , donde podemos identificar dos alelos que inicialmente parecieran ser un factor asociado de riesgo para presentar la enfermedad, como el DRB1*1301 que se expresa en 7 casos y solo en un control, observándose una elevación en el riesgo de hasta 7 veces, es importante mencionar que el intervalo de confianza es sumamente amplio lo cual puede ser un reflejo de la frecuencia génica baja del mismo ($f.g. = 0.040$) y el DRB1* 1602 que se comporta de la misma manera al estar presente solo en los casos (7 casos) con un OR de 16.701 (IC 95% 0.947- 294.670) con valores de $P_c > 0.05$, lo que los hace no ser estadísticamente significativos y solo pueden estar relacionados al tamaño muestral y como mencionamos

previamente a la frecuencia génica de los mismos en este grupo muy particular de población, siendo además importante mencionar que el HLA-DRB1*1602 es un gen muy frecuente en población mexicana (comunicación personal de la Dra. Clara Gorodezky).

En lo que respecta HLA- DQ donde encontramos un alelo asociado a enfermedad, el HLA-DQ*0302 con un OR 2.201 (IC 95% 1.419-3.415) (Pc= 0.0007) y un alelo asociado a protección para presentar la enfermedad, el HLA-DQ*0301 que presenta una f.g. de 0.231 en el grupo testigo mientras que tan solo en 4 casos (fg= 0.022), presentando un OR = 0.078 (IC 95% 0.027-0.223) (Pc= 0.0008)

Cuadro 8.- Frecuencias (g.f) de HLA-A,-B,Cw,DRB1 y -DQB1 en los Casos. N=174.

-A	N	g.f	-B	n	g.f	-Cw	n	g.f	-DRB1	n	g.f	-DQB1	n	g.f
0201	39	0.224	1501	13	0.074	0401	34	0.195	0802	27	0.155	0300	54	0.310
2402	25	0.143	3501	13	0.074	0702	29	0.167	0407	22	0.126	0302	30	0.172
0206	20	0.114	4002	11	0.063	0102	16	0.092	1406	14	0.080	0402	29	0.167
3101	16	0.091	5101	9	0.051	0701	13	0.075	0404	12	0.069	0200	18	0.103
6801	8	0.045	5201	9	0.051	0602	11	0.063	0301	12	0.069	0501	10	0.057
1101	8	0.045	3905	9	0.051	0303	9	0.052	0701	11	0.063	0602	6	0.034
6803	7	0.040	3512	8	0.046	0304	8	0.046	1301	7	0.040	0603	5	0.029
0101	7	0.040	0801	8	0.046	1203	7	0.040	1602	7	0.040	0601	5	0.029
0301	5	0.028	3517	7	0.040	1502	7	0.040	1501	6	0.034	0600	4	0.023
2601	5	0.028	3906	6	0.034	0801	6	0.034	0102	6	0.034	0303	4	0.023
3201	5	0.028	4801	6	0.034	0305	6	0.034	1402	5	0.029	0202	2	0.011
2902	5	0.028	0702	5	0.029	1509	5	0.029	0403	4	0.023	0503	2	0.011
3001	4	0.023	3801	5	0.029	1202	4	0.023	0410	4	0.023	0502	1	0.006
6802	3	0.017	4403	4	0.023	0802	4	0.023	1502	4	0.023	0201	1	0.006
2425	2	0.011	5001	4	0.023	1601	4	0.023	0402	3	0.017	0604	1	0.006
2501	2	0.011	1402	4	0.023	0202	3	0.017	1302	3	0.017			
3301	2	0.011	3514	4	0.023	1604	2	0.011	1101	3	0.017			
3010	1	0.005	4402	3	0.017	0803	2	0.011	0411	3	0.017			
0302	1	0.005	1530	3	0.017	0509	1	0.005	0401	2	0.011			
2301	1	0.005	1302	3	0.017	1801	1	0.005	0101	2	0.011			
6805	1	0.005	3508	3	0.017	1701	1	0.005	1104	2	0.011			
2201	1	0.005	4006	2	0.011	0501	1	0.005	1305	2	0.011			
7401	1	0.005	3908	2	0.011				0405	2	0.011			
3131	1	0.005	1515	2	0.011				1503	1	0.005			
6901	1	0.005	4101	2	0.011				1601	1	0.005			
3002	1	0.005	1801	2	0.011				1448	1	0.005			
0205	1	0.005	4501	2	0.011				1404	1	0.005			
2403	1	0.005	3503	2	0.011				1202	1	0.005			
			2705	2	0.011				0302	1	0.005			
			3905	2	0.011				0103	1	0.005			
			4008	1	0.005				1001	1	0.005			
			Othe	18	0.114				1401	1	0.005			
			r											

Cuadro 9.-Frecuencias (g.f) de HLA-A,-B,-Cw,-DRB1 y -DQB1 en los Controles. N=186

-A	N	g.f	-B	n	g.f	-Cw	n	g.f	-DRB1	n	g.f	-DBQ1	n	g.f
0201	41	0.220	3905	19	0.102	0702	40	0.215	0407	33	0.177	0302	51	0.274
2402	31	0.166	3512	14	0.075	0401	36	0.194	0802	25	0.134	0301	43	0.231
6801	19	0.102	4002	13	0.069	0304	16	0.086	0404	15	0.081	0402	28	0.151
3101	13	0.069	5101	11	0.059	0102	15	0.081	1406	15	0.081	Dqbx	21	0.113
AX	11	0.059	3501	11	0.059	Cwx	13	0.070	Drx	13	0.070	0501	12	0.065
0206	10	0.053	3906	10	0.053	0701	9	0.048	0701	12	0.065	0202	10	0.054
6803	8	0.03	BX	10	0.053	0602	8	0.043	1602	11	0.059	0201	6	0.032
3002	6	0.032	3514	6	0.032	0801	7	0.038	1501	7	0.038	0602	5	0.027
0301	6	0.032	4005	6	0.032	0802	7	0.038	1104	7	0.038	0603	3	0.016
3301	5	0.026	0702	6	0.032	0303	5	0.027	0301	6	0.032	0502	2	0.011
1101	4	0.021	4801	5	0.026	0501	4	0.022	0102	6	0.032	0303	2	0.011
0101	4	0.021	1402	5	0.026	1502	4	0.022	1402	5	0.027	0604	1	0.005
6802	4	0.021	5201	4	0.021	0305	3	0.016	0403	4	0.022	0601	1	0.005
2301	3	0.016	3543	4	0.021	1203	3	0.016	0101	3	0.016	0304	1	0.005
2601	3	0.016	0801	4	0.021	0202	3	0.016	0401	3	0.016			
2902	3	0.016	1501	4	0.021	0306	3	0.016	1001	3	0.016			
3201	3	0.016	3517	3	0.016	1601	2	0.010	0804	2	0.010			
6805	2	0.010	1515	3	0.016	1402	2	0.010	0411	2	0.010			
3001	2	0.010	1801	3	0.016	1509	2	0.010	0801	2	0.010			
0204	1	0.005	3902	3	0.016	0704	2	0.010	1407	1	0.005			
0224	1	0.005	3508	2	0.010	0401	1	0.005	1201	1	0.005			
0205	1	0.005	4901	2	0.010				1302	1	0.005			
6601	1	0.005	1401	2	0.010				1304	1	0.005			
0102	1	0.005	1516	2	0.010				1502	1	0.005			
2425	1	0.005	5301	2	0.010				0405	1	0.005			
2301	1	0.005	3701	2	0.010				1102	1	0.005			
/05														
			4402	2	0.010				0809	1	0.005			
2402	1	0.005	4501	2	0.010				1305	1	0.005			
/25														
			1302	2	0.010				1301	1	0.005			
			1517	2	0.010									
			3502	2	0.010									
			Other	20	0.107									

Cuadro 10.- Evaluación del riesgo entre los diferentes loci de HLA Clase I

Locus	CASOS N=174		CONTROLES N=186		P	OR	C195%
	N	g.f	N	g.f			
HLA-A							
0201	39	0.224	41	0.220	0.96	1.022	0.621-1.68
2402	25	0.143	31	0.166	0.648	0.839	0.473-1.48
0206	20	0.114	10	0.053	0.056	2.286	1.038-5.033*
3101	16	0.091	13	0.069	0.565	1.348	0.628-2.890
6801	8	0.045	19	0.102	0.068	0.424	0.180-0.995
HLA-B							
1501	13	0.075	4	0.021	0.031	3.714	1.187-11.619+
3501	13	0.075	11	0.059	0.704	1.285	0.560-2.949
4002	11	0.063	13	0.069	0.966	0.898	0.391-2.062
5101	9	0.052	11	0.059	0.939	0.868	0.351-2.148
5201	9	0.052	4	0.021	0.21	2.482	0.750-8.211
HLA-Cw							
0401	34	0.195	36	0.194	0.929	1.012	0.6-1.706
0702	29	0.167	40	0.215	0.302	0.73	0.430-1.241
0102	16	0.092	15	0.081	0.846	1.154	0.553-2.412
0701	13	0.075	9	0.048	0.411	1.588	0.661-3.814
0602	11	0.063	8	0.043	0.535	1.502	0.589-3.825

* Pc=0.45.

+Pc=0.30.

Cuadro 11.- Evaluación del Riesgo entre los diferentes loci de HLA Clase II

Locus	CASOS N=174		CONTROLES N=186		P	OR	C195%
	N	g.f	N	g.f			
HLA-DRB1							
0802	27	0.155	25	0.134	0.682	1.183	0.657-2.130
0407	22	0.126	33	0.177	0.231	0.671	0.374-1.204
1406	14	0.080	15	0.081	0.851	0.998	0.467-2.132
1301	7	0.040	1	0.005	0.06	7.754	0.944-63.689
1602	7	0.040	0	0	0.025	16.701	0.947-294.670*
HLA-DQB1							
0302	79	0.454	51	0.274	0.0001	2.201	1.419-3.415**
0402	29	0.167	28	0.151	0.784	1.129	0.641-1988
0202	18	0.103	10	0.054	0.118	2.031	0.910-4.531
0301	4	0.022	43	0.231	0.00001	0.078	0.027-0.223***
0201	2	0.011	0	0	0.524	5.406	0.258-113.402
0303	1	0.005	2	0.011	0.954	0.532	0.048-5.918
	* Pc=0.24.	**Pc=0.0007	***Pc=00008				

DISCUSION

El cáncer de mama ha tenido un incremento en su incidencia en años recientes, es el segundo tumor, después del cáncer pulmonar, de causa de muerte por cáncer en mujeres y es la causa número uno de muerte por cáncer en mujeres de 15 a 54 años en el mundo entero (*Ghaderi, 2001*). En México es un tumor frecuente por lo que el estudio de los factores que predisponen a su presentación es de suma importancia para la identificación de grupos de riesgo, lo cual se traduce en una evaluación mas precisa del riesgo para cada una de las mujeres. La mayor parte de los casos se presenta en forma esporádica, esto es, en pacientes sin historia familiar de cáncer mamario o de ovario (*McPherson, 2000*).

El origen de las neoplasias malignas es multifactorial, sin embargo hay ciertos factores que pueden incrementar no tan solo el riesgo de que la enfermedad aparezca sino que mas aún que el tumor continúe su crecimiento y se produzca la enfermedad a distancia o metástasis (*DeVita, 2001*). La vigilancia inmunológica es un mecanismo importante durante el proceso de la génesis tumoral, lo cual hace que si ciertos individuos heredan ciertos alelos específicos de los genes HLA esto los haga mas susceptibles o resistentes a la presentación de tumores (*Baccar, 2006; Chaudhuri, 2000*). Dentro de los factores que pueden permitir que la célula tumoral pueda sobrevivir se encuentra la capacidad que la célula maligna adquiere para no ser detectada por el sistema inmunológico del hospedero. Uno de estos mecanismo es la desregulación de los antígenos HLA clásicos lo que hace que el linfocito T citotóxico y el NK (Natural Killer) no pueda identificar a esa célula como anormal (*Kleinberg, 2006*).

Se han realizado múltiples estudios tratando de encontrar las asociaciones entre la presencia de algún gen del HLA y el desarrollo de neoplasias, sin embargo, el gran polimorfismo del complejo HLA hace que los resultados sean poco consistentes y en algunos casos contradictorios, debido a las diferencias en la presentación de los diferentes genes en las distintas poblaciones (*Lavado, 2005*).

El número de estudios realizados para tratar de determinar la asociación y el impacto que representa en el riesgo de presentar cáncer de mama y los diferentes HLA, especialmente los de la clase II son reducidos y algunos de estos estudios no tienen el suficiente poder ya que el número de casos estudiados es reducido (*Baccar, 2006*). Hasta el momento no existe en México un trabajo que trate de relacionar la presencia de algún gen del sistema HLA y el cáncer mamario, de ahí la importancia de nuestros resultados sobre el posible papel que juega el complejo HLA en esta neoplasia en particular.

Uno de los primeros trabajos al respecto es el Casoli et al en 1994 en él informó una correlación entre una menor frecuencia de HLA-B*07 y HLA-DR*04 y la susceptibilidad a cáncer de mama (*Casoli, 1994*), similar a lo que informó Lavado et al en el cual se compararon 132 mujeres con cáncer de mama y 382 controles sanos en Málaga, España. Tipificaron de HLA-A, -B, -Cw, -DR y -DQ y no encontró diferencias en la distribución de los diferentes genes entre los grupos de comparación. El antígeno que se halló incrementado en las enfermas fue el HLA-B*07 (P=0.0019; CI 95% 1.337-3.409; RR=2.135). Sugiriendo que en esa zona geográfica puede encontrarse un agente en el ambiente (viral o bacteriano) que pudiera asociarse a cáncer mamario (*Lavado, 2005*), lo cual es similar a lo publicado previamente por Casoli et al (*Casoli, 1994*). Al comparar con nuestro estudio donde el HLA-B*07 tiene una frecuencia génica baja 0.029 en el grupo de los casos y 0.032 en el grupo de los controles, haciéndolo estadísticamente no significativo, mientras que otro de los HLA clase I el HLA-B*1501, se encuentra con mucho mayor frecuencia en el grupo de los casos (13 casos lo que representa una fg 0.075) haciéndolo estadísticamente significativo (p=0.031) OR= 3.71 (IC 1.187- 11.619), sin embargo al momento de hacer la corrección de Bonferroni esta significancia se pierde (pc=0.30), tal vez por el tamaño de la muestra o porque realmente la asociación no existe, no pudiendo ser concluyentes en este respecto.

En cuanto a la presencia del HLA-DR*04 tampoco hubo asociación, si bien el HLA-DR*0407 presentó una fg de 0.080 en el grupo de casos y fg de 0.117 en los controles, ésta diferencia no fue estadísticamente significativa.

En el alelo DRB1 en que pudimos encontrar diferencia fue el HLA-DRB1*1602 que no fue identificado en ningún sujeto control mientras que se presentó en 7 casos ($fg=0.040$), sin embargo la significancia en cuanto a incremento en el riesgo no fue posible encontrarla desde el punto de vista estadístico, aunque a primera vista pareciera ser un factor de riesgo, el valor se pierde al realizar una prueba de corrección y al comparar con otros autores como Chaudhuri et al los hallazgos son similares, aunque contrario a lo reportado por este autor el BQB1*0302 en nuestra serie este alelo se mantiene desde el punto de vista estadístico ($Pc=0.0007$) como un factor de riesgo.

En el año 2001, Ghaderi et al analizaron 36 pacientes iraníes con cáncer mamario y 36 mujeres sanas de la misma comunidad. Al realizar al análisis de los HLA clase I no se lograron encontrar diferencias entre los grupos estudiados. Se reportó, por otra parte, una asociación significativa entre el alelo HLA-DRB1*12 y la presencia de la enfermedad ($8/36$ en el grupo de pacientes vs $1/36$ en el grupo de control, $RR=2$, $P<0.027$) ($p<0.03$). Otro de los hallazgos reportados por este autor fue HLA-DRB1*11 que fue mas frecuente entre el grupo de control pero de igualmente la frecuencia en el grupo de estudio es alta. Lo mismo se encontró los alelos HLA-DRB1*7 y HLA-DRB1*04, sin embargo estas diferencias no lograron obtener poder estadístico. Lo que hace a este estudio ser el primero en reportar una asociación entre HLA-DRB1*12 y la susceptibilidad a cáncer de mama (*Ghaderi, 2001*) cuando buscamos este último alelo en particular en nuestra grupo poblacional fue identificado solo en un individuo de cada uno de los grupos estudiados, lo que no hace posible obtener conclusiones en cuanto a su valor como protector o de riesgo, lo mismo sucede con los otros dos alelos mencionados.

Gopalkrishnan et al en un grupo de mujeres hindúes evaluaron la expresión génica de baja o intermedia resolución de los HLA-A, -B y -C. Mostrándose dos alelos como candidatos a ser marcadores de asociados en la modulación del riesgo para cáncer de mama en mujeres de india oriental, los alelos HLA-B*40 y -B*08, el primero de ellos como factor para desarrollo temprano de la enfermedad presentándose en 16% de los casos versus 9.0% de los controles, ($OR - 2.2$; 95% C 1.15 - 4.34; $P = 0.02$) mientras que el segundo como protector (*Gopalkrishnan, 2006*), en nuestra serie ninguno de los dos alelos candidatos

mencionados por este autor fue posible identificar como candidato a tener algún impacto ni en el riesgo o protección. El HLA-B*1501 que fue el alelo mas frecuente en el grupo de nuestros pacientes con 13 y en 4 controles muestran resultados similares a los de Gopalkrishnan, no siendo estadísticamente significativos.

Desde el punto de vista de haplotipos específicos, encontramos en la literatura a Baccar et al que informó un análisis molecular detallado de los alelos HLA-DRB1 y HLA – DQB1 así como los haplotipos HLA DRB1-DQB1 en pacientes con cáncer mamario y controles pareados étnicamente en Tunes. Se evaluaron 70 enfermas entre 27 y 67 años de edad y 70 voluntarios sanos. Para los loci DRB1 se encontraron 11 alelos en el grupo de pacientes y 12 en el grupo de control. Para el DQB1 solo cinco para cada grupo, sin encontrar ninguna correlación significativa con la presencia de cáncer para ninguno de los dos loci. Al momento de analizar los diferentes haplotipos se encontró una asociación negativa estadísticamente significativa entre el haplotipo HLA-DRB1*07-DQB1*02 y la presentación de la enfermedad [9/140(6.42%) de haplotipos en pacientes vs 22/140(15.71%) en el grupo de control]($P=0.013$; $OR=0.37$; $CI_{95\%}:0.15-0.88$). Mostrando una relación en el papel de estas moléculas clase II del HLA en la respuesta anti-tumoral o mostrando un desequilibrio entre estos marcadores y los genes de protección o susceptibilidad a neoplasias (*Baccar, 2006*) en nuestra serie no fue posible identificar ningún haplotipo dominante, si bien nuestro tamaño de muestra es cerca de 30% mas grande, posiblemente esto se encuentre en relación a un sesgo en el proceso de selección o por el tipo de población en que fue hecho el estudio.

La pérdida de la expresión o la expresión anormal de los HLA de clase I han sido ampliamente estudiados en los tumores sólidos, de hecho, a estas alteraciones se les considerado uno de los mecanismos por los cuales la célula tumoral evade la respuesta inmune (*Ghaderi, 2001*). Las asociaciones positivas de los alelos específicos de HLA clase II en cualquier tipo de tumor maligno refleja el papel específico de estas moléculas en la promoción de inflamación crónica. La expresión de HLA sugiere que la evasión del sistema inmune de ciertas poblaciones celulares sean las responsables de promover la sobrevivencia de la neoplasia, lo que hace que sea necesario continuar con la evaluación de

estos marcadores en las diferentes poblaciones e incluir mayores números de pacientes para poder confirmar las diferentes asociaciones y riesgos entre alelos y haplotipos y determinar si existen otros que puedan ser catalogados como factores de riesgo para el desarrollo de la neoplasia, y en un momento determinado que algún alelo, alelos o haplotipos se encuentren consistentemente expresados en algún grupo de individuos el poder utilizar la tipificación de los HLA clase II como factores pronóstico y de confirmarse la existencia de alelos de HLA clase II que sean protectores para cualquier tipo de cáncer, incluyendo el de mama, fortalece el concepto de que la vigilancia inmunológica es de suma importancia en el complejo proceso de la génesis tumoral.

El objetivo primordial de este trabajo ha sido el identificar en un grupo de mujeres mexicanas como se distribuyen los diferentes alelos del complejo HLA tanto en pacientes con cáncer como en individuos sanos, esto es solo el primer paso en el estudio de las diferentes asociaciones que se pueden encontrar, como son asociación directa con la expresión de receptores hormonales o Her-2, la asociación con el tamaño del tumor y el estadio clínico o en la búsqueda de infiltrado inflamatorio en el tejido tumoral o el valor que puedan tener los diferentes alelos en la respuesta al tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

American Cancer Society. Cancer Prevention and Early Detection. Cancer Facts and Figures 2003. pp 26. Atlanta, GA, USA. American Cancer Society. www.cancer.org.

Baccar Harrath A, Yacoubi Loueslati B, Troudi W, Hmida S, Sedkaoui S, Dridi A, Jridi A, Ben Ayed F, Ben Rhomdhane K, Ben Ammar Elgaaied A. HLA class II polymorphism: protective or risk factors to breast cancer in Tunisia? *Pathol Oncol Res.* 2006;12:79-81.

Bateman AC, Howell WM. Human leukocyte antigens and cancer: is it in our genes? *J Pathol.* 1999;188(3):231-6

Beck S, Hanson I, Kelly A, Pappin DJ, Trowsdale J. A homologue of the Drosophila female sterile homeotic (fsh) gene in the class II region of the human MHC. *DNA Seq.* 1992;2(4):203-10.

Beral V, Hoffman DA, Lonstein JE, Morin MM. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual fat from 52 epidemiological studies including 56,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 2002;358:1389-99.

Bradley CJ, Given CW, Roberts C. Race socioeconomic status, and the breast cancer treatment and survival. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:490-496

Braud VM, Allan DSJ, Wilson D, McMichael AJ. TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Curr Biol* 1997; 8: 1-10

Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature.* 1998;391(6669):795-9.

Brinton LA, Benichou J, Gammon MA, Brogan DR, Coates R, Schoenberg JB. Ethnicity and variation in breast cancer incidence. *Int. J. Cancer* 1997; 73:349-55.

Brinton LA, Schairer C, Hoover RN, Fraumeni JF Jr. Menstrual Factors and risk of breast cancer. *Cancer Invest* 1988;6:245

Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunol today* 1993; 14: 349-352.

Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunol today* 1997; 18: ceterfold.

Capote NL. Epidemiología del cáncer de la glándula mamaria. In: Hernández MGA, editor. *Avances en mastología.* 2nd ed. Caracas, Venezuela: 1996:170-81.

Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG,

Earp HS, Millikan RC. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006;295(21):2492-502.

Casoli C, Zanelli P, Adorni A, Starcich BR, Neri T. Serological and molecular study on the HLA phenotype of female breast cancer patients. *Eur J Cancer*. 1994;30A:1207-8.

Castro FA, Haimila K, Sareneva I, Schmitt M, Lorenzo J, Kunkel N, Kumar R, Försti A, Kjellberg L, Hallmans G, Lehtinen M, Hemminki K, Pawlita M. Association of HLA-DRB1, interleukin-6 and cyclin D1 polymorphisms with cervical cancer in the Swedish population--a candidate gene approach. *Int J Cancer*. 2009;125(8):1851-8.

Chaudhuri S, Cariappa A, Tang M, Bell D, Haber DA, Isselbacher KJ, Finkelstein D, Forcione D, Pillai S. Genetic susceptibility to breast cancer: HLA DQB*03032 and HLA DRB1*11 may represent protective alleles. *PNAS* 2000; 97:11451-54.

Chen PC, Tsai EM, Er TK, Chang SJ, Chen BH. HLA-DQA1 and -DQB1 allele typing in southern Taiwanese women with breast cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(5):611-4.

Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2001; 344:276.

Colditz GA, Rosner B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study. *Am J Epidemiology* 2000;152:950.

Collins EJ, Garboczi DN, Wiley DC. Three-dimensional structure of a peptide extending from one end of a class I MHC binding site. *Nature* 1994; 371: 626-629.

Colonna M, Brooks EG, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science*. 1993;260(5111):1121-4.

Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haemat* 1958; 20: 156-166

Dausset J, Brecy H. Identical nature of the leukocyte antigens detectable in monozygotic twins by means of immune iso-leucoagglutinins. *Nature* 1958; 180: 1430.

Davis RW, Thomas M, Cameron J, St John TP, Scherer S, Padgett RA. Rapid DNA isolations for enzymatic and hybridization analysis. *Methods Enzymol* 1980; 65: 404-411.

de Araujo Souza PS, Sichero L, Maciag PC. HPV variants and HLA polymorphisms: the role of variability on the risk of cervical cancer. *Future Oncol*. 2009;5(3):359-70.

Dessen A, Lawrence CM, Cupo S, Zaller DM, Wiley DC. X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity*. 1997; 7: 473-481.

DeVita VT, Hellman A, Rosenberg SA, eds *Cancer: principles and practice of oncology*. 6th edition Philadelphia: Lippincott-Williams and Wilkins. 2001.

Dewey ME, Bonferroni CE. In: Armitage P, Colton T, editors. *Encyclopaedia of biostatistics*. Wiley, Chichester; 1998 p. 420-1.

Duggan-Keen MF, Keating PJ, Stevens FR, Sinnott P, Snijders PJ, Walboomers JM, Davidson S, Hunter RD, Dyer PA, Stern PL. Immunogenetic factors in HPV-associated cervical cancer: influence on disease progression. *Eur J Immunogenet*. 1996;23(4):275-84.

Eliassen AH, Missmer SA, Toworoger SS, Spielman D, Barbieri RL. Endogenous steroid hormone concentrations and risk of breast cancer among premenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:1406-1415.

Ellis JR, Keating PJ, Baird J, Hounsell EF, Renouf DV, Rowe M, Hopkins D, Duggan-Keen MF, Bartholomew JS, Young LS. The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nat Med*. 1995;1(5):464-70.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet*. 1996;13(4):399-408.

Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *Globocan Cancer Statics 2002*. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.

Field SF, Nejentsev S, Walker NM, Howson JM, Godfrey LM, Jolley JD, Hardy MP, Todd JA. Sequencing-based genotyping and association analysis of the MICA and MICB genes in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2008;57(6):1753-6.

Fossum B, Breivik J, Meling GI, Gedde-Dahl T 3rd, Hansen T, Knutsen I, Rognum TO, Thorsby E, Gaudernack G. A K-ras 13Gly-->Asp mutation is recognized by HLA-DQ7 restricted T cells in a patient with colorectal cancer. Modifying effect of DQ7 on established cancers harbouring this mutation? *Int J Cancer*. 1994;58(4):506-11.

Fremont DH, Monnaie D, Nelson CA, Hendrickson WA, Unanue ER. Crystal structure of I-ak in complex with a dominant epitope of lysozyme. *Immunity* 1998; 8: 305- 317.

Gammon MD, Ron E, Melton LJ, Mallkasian GD, Frazier AL. Breast cancer and hormone replacement therapy; collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* 1997;350:1047.

Garber JE, Offit K. Hereditary Cancer Predisposition Syndromes *J Clin Oncol* 2005; 23:276-292.

Garboczi DN, Madden DR, Wiley DC. Five viral peptide-HLA-A2 co-crystals. Simultaneous space group determination and X-ray data collection. *J Mol Biol* 1994; 239:581-587

Gareth D, Evans R, Howell A. Breast assessment models cancer risk. *Breast Cancer Research* 2007, 9:213

Geraghty DE. Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes. *Curr Opin Immunol*. 1993; 5: 3-7

Ghaderi A, Talei A, Gharesi-Fard B, Farjadian SH, Amirzargar A, Vasei M. HLA-DBR1 alleles and the susceptibility of Iranian patients with breast cancer. *Pathol Oncol Res*. 2001;7:39-41.

Ghaderi M, Wallin KL, Wilkund F, Zake LN, Hallmans G, Lenner P, Dillner J, Sanjeevi CB. Risk of invasive cervical cancer associated with polymorphic HLA DR/DQ haplotypes. *Int J Cancer* 2002; 100:698-701.

Glynne R, Kerr LA, Mockridge I, Beck S, Kelly A, Trowsdale J. The major histocompatibility complex-encoded proteasome component LMP7: alternative first exons and post-translational processing. *Eur J Immunol*. 1993;23(4):860-6.

Goldberg AL. Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel. *Science* 1995; 268: 522- 523

Gopalkrishnan L, Patil S, Chhaya S, Badwe R, Joshi N. HLA alleles in pre-menopausal breast cancer patients from western India. *Indian J Med Res*. 2006; 124:305-12.

Gorer , PA. The detection of a hereditary antigenic difference in the blood of mice by means of human group A serum. *J Genet* 1936: 32, 17-31.

Gosh P, Amaya M, Mellins E, Wiley DC. The structure of intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 1995; 378: 457-462.

Gregoire L, Lawrence WD, Kukuruga D, Eisenbrey AB, Lancaster WD. Association between HLA-DQB1 alleles and risk for cervical cancer in African-American women. *Int J Cancer*. 1994;57(4):504-7.

Grey HM, Kubo RT, Colon SM, Poulik MD, Cresswell P, Springer T, Turner M, Strominger JL. The small subunit of HLA-A antigens is beta 2-microglobulin. *J Exp Med*. 1973;138(6):1608-12

Gruen JR, Weissman SM. Evolving views of the MHC. *Blood*. 1997; 90: 4252- 4265.

Gudmundsdóttir I, Gunnlaugur Jónasson J, Sigurdsson H, Olafsdóttir K, Tryggvadóttir L, Ogmundsdóttir HM. Altered expression of HLA class I antigens in breast cancer: association with prognosis. *Int J Cancer*. 2000, 20;89:500-5.

Haldane JBS. The estimation and significance of the logarithm of the ratio of frequencies. *Ann Hum Genet* 1955; 20: 309-14.

Harris JR. *Diseases of the Breast*. 2nd edition Philadelphia: Lippincott-Williams and Wilkins. 2000.

Herberg JA, Sgouros J, Jones T, Copeman J, Humphray SJ, Sheer D, Cresswell P, Beck S, Trowsdale J. Genomic analysis of the Tapasin gene, located close to the TAP loci in the MHC. *Eur J Immunol*. 1998;28(2):459-67.

Higgins CF, Hyde SC, Mimmack MM, Gileadi U, Gill DR, Gallagher MP. Binding protein-dependent transport systems. *J Bioenerg Biomembr*. 1990;22(4):571-92.

Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, Lush MJ, Povey S, Talbot CC Jr, Wright MW, Wain HM, Trowsdale J, Ziegler A, Beck S. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet*. 2004;5(12):889-99.

Hunt KK, Robb GL. *Breast Cancer*. Springer Science. Second Ed. 2008

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008;58(2):71-96.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009;59: 225 - 249.

Janer M, Geraghty DE. The human major histocompatibility complex: 42,221 bp of genomic sequence, high-density sequence-tagged site amp, evolution, and polymorphism for HLA class I. *Genomics* 1998; 51: 35-44

Jones EY. MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol.*, 1997; 9:75-79.

Kaaks R, Berrino F, Key T, Rinaldi S, Dossus L, Biessy C, Secreto G, Amiano P, Bingham S, Boeing H, Bueno de Mesquita HB, Chang-Claude J, Clavel-Chapelon F, Fournier A, van Gils CH, Gonzalez CA, Gurrea AB, Critselis E, Khaw KT, Krogh V, Lahmann PH, Nagel G, Olsen A, Onland-Moret NC, Overvad K, Palli D, Panico S, Peeters P, Quirós JR, Roddam A, Thiebaut A, Tjønneland A, Chirlaque MD, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Tumino R, Vineis P, Norat T, Ferrari P, Slimani N, Riboli E. Serum sex steroids in premenopausal women and breast cancer risk within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97(10):755-65.

Kelly A, Powis SH, Kerr LA, Mockridge I, Elliott T, Bastin J, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, Trowsdale J, Townsend A. Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature*. 1992; 355(6361):641-4.

Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam A, Dorgan JF, Longcope C, Stanczyk FZ, Stephenson HE Jr, Falk RT, Miller R, Schatzkin A, Allen DS, Fentiman IS, Key TJ, Wang DY, Dowsett M, Thomas HV, Hankinson SE, Toniolo P, Akhmedkhanov A, Koenig K, Shore RE, Zeleniuch-Jacquotte A, Berrino F, Muti P, Micheli A, Krogh V, Sieri S, Pala V, Venturelli E, Secreto G, Barrett-Connor E, Laughlin GA, Kabuto M, Akiba S, Stevens RG, Neriishi K, Land CE, Cauley JA, Kuller LH, Cummings SR, Helzlsouer KJ, Alberg AJ, Bush TL, Comstock GW, Gordon GB, Miller SR, Longcope C; Endogenous Hormones Breast Cancer Collaborative Group. Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(16):1218-26.

Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:606-16.

Klein J. Of HLA, types and selection: an assay on evolution of MHC and parasites. *Human Immunol* 1991; 30:247-58.

Kleinberg L, Flørenes VA, Skrede M, Dong HP, Nielsen S, McMaster MT, Nesland JM, Shih IeM, Davidson B. Expression of HLA-G in malignant mesothelioma and clinically aggressive breast carcinoma. *Virchows Arch.* 2006; 449:31-9.

Lavado R, Benavides M, Villar E, Ales I, Alonso A, Caballero A. The HLA-B7 allele confers susceptibility to breast cancer in Spanish women. *Immunol Lett.* 2005; 101:223-5.

Le Bouteiller P. HLA class I chromosomal region genes and products: facts and questions. *Crit Rev Immunol* 1994; 14:89 – 129.

Lee E, Ma H, McKean-Cowdin R, Van Den Berg D, Bernstein L, Henderson BE, Ursin G. Effect of reproductive factors and oral contraceptives on breast cancer risk in BRCA1/2 mutation carriers and noncarriers: results from a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(11):3170-8.

Lehner PJ, Trowsdale J. Antigen processing: coming out gracefully. *Curr Biol.* 1998; 8: R605- R608.

Li CI, Malone KE, Daling JR, Potter JD, Bernstein L. Timing of menarche and first-full-term birth in relation to breast cancer risk. *Am J Epidemiology* 2008;167:230-39.

Lichtenstein P, Holo NV, Verkasalo PK. Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark and Finland. *N Engl J Med* 2000;343:78-85.

Lippman ME, Krueger KA, Eckert S, Sashegyi A, Walls EL, Jamal S, Cauley JA, Cummings SR. Indicators of lifetime estrogen exposure: effect on breast cancer incidence and interaction with raloxifene therapy in the multiple outcomes of raloxifene evaluation study participants. *J Clin Oncol.* 2001; 19(12):3111-6.

Loke YW, King A. Recent development in the human maternal-fetal immune interactions. *Curr Opin Immunol* 1991; 3: 762- 766.

Maenaka K, Jones EY. MHC superfamily structure and the immune system. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 1999; 9:745-753.

Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J. An update to HLA Nomenclature, 2010. *Tissue Antigens* 2010; 75: 291–455

Martin RM, Middleton N, Gunnell D, Owen CG, Smith GD. Breast-feeding and cancer: the Boyd Orr cohort and a systematic review with meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(19):1446-57.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ.* 2000;321(7261):624-8.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215-20.

Missmer SA, Confer JM, Travis RC, Kabuto M, Mayne TJ. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet* 2002; 360:187-195.

Missmer SA, Eliassen AH, Barbieri RL, Hankinson SE. Endogenous estrogen, androgen and progesterone concentrations and breast cancer risk among postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1856-65.

Momburg F, Roelse J, Hammerling GJ, Neefjes JJ. Peptide size selection by the major histocompatibility complex-encoded peptide transporter *J Exp Med* 1994;179: 1613-1623.

Monaco JJ. Structure and function of genes in the MHC class II region. *Curr.Opin.Immunol.* 1993; 5:17-20.

Nakamura H, Saji H, Ogata A, Hosaka M, Hagiwara M, Kawasaki N, Konaka C, Kato H. Immunologic parameters as significant prognostic factors in lung cancer. *Lung Cancer* 2002; 37:161-9.

Narod, SA. Screening for BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Mexico: the public health perspective. *Salud pública Méx.* 2009, vol.51, suppl.2, pp. s191-s196.

Natarajan K, Li H, Mariuzza RA, Margulies DH. MHC class I molecules, structure and function. *Rev Immunogenet.* 1999; 1:32-46.

National Cancer Institute. Página Web

<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/prevention/breast/HealthProfessional/page3>

Última modificación: 23 de Diciembre de 2009

Neumann B, Luz A, Pfeffer K, Holzmann B. Defective Peyer's patch organogenesis in mice lacking the 55-kd receptor for tumor necrosis factor. *J exp Med* 1996; 184:259-264.

Nusbaum R, Vogel KJ, Ready K. Susceptibility to Breast Cancer Hereditary Syndromes and Low penetrance genes. *Breast Disease* 2007;27:21-50.

Ortmann B, Androlewicz MJ, Cresswell P. MHC class I/beta 2m associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature* 1994;369: 864 – 867.

Ortmann B, Copeman J, Lehner PJ, Sadasivan B, Herberg JA, Grandea AG, Riddell SR, Tampé R, Spies T, Trowsdale J, Cresswell P. A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science*. 1997;277(5330):1306-9

Palmer JR, Wise LA, Horton NJ, Adams-Campbell LL, Rosenberg L. Dual effect of parity on breast cancer risk in African-American women. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(6):478-83.

Parkin DM, Muir CS, Whealan Y, Gao T, Ferlay J, Powell J. Cancer incidence in five continents. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer Scientific Publication No. 120, 1992.

Parsa P, Parsa B. Effects of reproductive factors on risk of breast cancer: a literature review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2009;10(4):545-50.

Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, Edwards BK, Berry DA. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med*. 2007; 356(16):1670-4.

Registro Histopatológico de las Neoplasias en México. 2000.

Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. México Dirección General de Epidemiología. Secretaria de Salud 2003.

Registro hospitalario de Cáncer Compendio de Cáncer 2000-2004. *Cancerologia* 2007;3:199-285.

Reeves GK, Pirie K, Green J, Bull D, Beral V; Million Women Study Collaborators. Reproductive factors and specific histological types of breast cancer: prospective study and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2009;100(3):538-44.

Rodriguez-Cuevas S, Macías CG, Franceschi D, Labastida S. Breast carcinoma presents a decade earlier in mexican women than in women in the United States or European countries. *Cancer* 2001; 91:863-8.

Rosner B, Colditz GA, Willett WC. Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiology* 1994;139:819.

Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol.* 1991; 219: 277-319.

Schlesselman JJ. *Case-Control Studies*. Oxford University Press 1982. Apéndice A.

SEER Cancer Statistics Review 1973-1995. Bethesda, MD: National Cancer Institute.

Shih IeM, Davidson B. Pathogenesis of ovarian cancer: clues from selected overexpressed genes. *Future Oncol.* 2009;5(10):1641-57.

Shiina T, Tamiya G, Oka A, Yamagata T, Yamagata N, Kikkawa E, Goto K, Mizuki N, Watanabe K, Fukuzumi Y, Taguchi S, Sugawara C, Ono A, Chen L, Yamazaki M, Tashiro H, Ando A, Ikemura T, Kimura M, Inoko H. Nucleotide sequencing analysis of the 146-kilobase segment around the *IkBL* and *MICA* genes at the centromeric end of the HLA class I region. *Genomics.* 1998; 47(3):372-82.

Smigal C, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, Howe HL, Thun M. Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006. *CA Cancer J Clin.* 2006;56(3):168-83.

Smith KJ, Pyrdol J, Gauthier L, Wiley DC, Wucherpfennig KW. Crystal structure of HLA-DR2 (DRA*0101, DRB1*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein. *J Exp Med* 1998; 188:215-221.

Solana R, Fernández R, González R, José García M, Peña J. Moléculas de Histocompatibilidad en www.uco.es/grupos/...molecular/.../etexto05.htm

Svejgaard A, Ryder LP. HLA and disease associations: Detecting the strongest association. *Tissue Antigens* 1994; 43 : 18-27.

Thorsby E. HLA-associated disease susceptibility which genes are primary involved?. *Immunologist* 1995; 3 : 51-58

Thorsby E. MHC structure and function. *Transplant.Proc.* 1999; 31:713-738.

Thorsby E. A short history of HLA. *Tissue Antigens.* 2009;74(2):101-16.

Tighe MR, Hall MA, Ashkenazi A, Siegler E, Lanchbury JS, Ciclitira PJ. Celiac disease among Ashkenazi Jews from Israel. A study of the HLA class II alleles and their associations with disease susceptibility. *Hum Immunol.* 1993;38(4):270-6.

Torres D, Rashid MU, Gil F, Umana A, Ramelli G, Robledo JF, Tawil M, Torregrosa L, Briceno I, Hamann U. High proportion of BRCA1/2 founder mutations in Hispanic breast/ovarian cancer families from Colombia. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;103(2):225-32.

- Torres-Mejía G, Angeles-Llerenas A. Reproductive factors and breast cancer: principal findings in Latin America and the world. *Salud Publica Mex.* 2009;51 Suppl 2:s165-71.
- Townsend A, Trowsdale J. The transporters associated with antigen processing. *Semin Cell Biol.* 1993; 4: 53- 61
- Trowsdale J. Genomic structure and function in the MHC. *Trends Genet.*,1993; 9:117-122.
- Turner D. The human leucocyte antigen (HLA) system. *Vox Sang.* 2004 Jul;87 Suppl1:87-90.
- Ulbrecht M, Kellermann J, Johnson JP, Weiss EH. Impaired intracellular transport and cell surface expression of nonpolymorphic HLA-E: evidence for inefficient peptide binding. *J Exp Med* 1992; 176: 1083-1090.
- Vogel VG. Epidemiology, genetics, and risk evaluation of postmenopausal women at risk of breast cancer. *Menopause.* 2008;15(4 Suppl):782-9.
- Wank R, Meulen JT, Luande J, Eberhardt HC, Pawlita M. Cervical intraepithelial neoplasia, cervical carcinoma, and risk for patients with HLA-DQB1*0602,*301,*0303 alleles. *Lancet.* 1993;341(8854):1215.
- Yeh FC, Yang R, Boyle T. Popgene. Version 1.31. 1999. University of Alberta, Canada.
- Zheng T, Holford TR, Mayne ST, Owens PH, Zhang B. Lactation and breast cancer risk: a case-control study in Connecticut. *Br J Cancer* 2001;84:1472-6.

ANEXO 1

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS DE PROTOCOLO DE INVESTIGACION ASOCIACION GENICA DE LOS ALELOS DE LOS LOCI HLA-B, HLA-DRB1, HLA-DQA Y HLA-DQB EN PACIENTES MEXICANAS MESTIZAS CON CANCER DE MAMA. UN ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES.

Nombre _____
Registro _____ IC _____
Edad _____

CARACTERISTICAS CLINICAS.

Historia Familiar _____ 0: Negativo 1: Positivo.
Número de Familiares Primer grado _____
Número de Familiares Segundo grado _____
Tabaquismo _____ 0: Negativo 1: Positivo.
Menarquia _____
PF _____
0: Ninguno 1: DIU 2: Hormonales 3: Barrera 4: SPC
THR _____ 0: Negativo 1: Positivo Tiempo en Meses _____
G _____ P _____ C _____ A _____ EPP _____

ETAPIFICACION.

Estadio Clínico _____
1: IIa 2: IIb 3: IIIa 4: IIIb 5: IV
Tamaño tumoral _____
Ganglios axilares _____
0: N0 1: N1 2: N2 3: N3

CARACTERISTICAS PATOLOGICAS.

Tipo _____
1: Ductal 2: Lobulillar 3: Sarcoma 4: Otro
Grado Histológico _____
1: Bien diferenciado 2: Mod. diferenciado 3: Poco diferenciado

SBR _____

Receptor Estrogénico _____
0: Ausente 1: Leve 2: Mod. 3: Importante

Receptor Progesterona _____
0: Ausente 1: Leve 2: Mod. 3: Importante

ANEXO 2

CUESTIONARIO DE HISTORIA DE NEOPLASIAS EN LA FAMILIA Y OTROS PADECIMIENTOS.

Nombre _____
Registro _____ Telefono _____ Edad _____

Historia Familiar de Cáncer

Abuelo Paterno _____ 0: Negativo 1: Positivo. Cáncer de mama, Cáncer de Colon, Cáncer de Ovario, Cáncer de Próstata, Otro cáncer _____

Abuelo Materno _____ 0: Negativo 1: Positivo. Cáncer de mama, Cáncer de Colon, Cáncer de Ovario, Cáncer de Próstata, Otro cáncer _____

Abuela Paterna _____ 0: Negativo 1: Positivo. Cáncer de mama, Cáncer de Colon, Cáncer de Ovario, Cáncer de Próstata, Otro cáncer _____

Abuelo Materna _____ 0: Negativo 1: Positivo. Cáncer de mama, Cáncer de Colon, Cáncer de Ovario, Cáncer de Próstata, Otro cáncer _____

Madre _____ 0: Negativo 1: Positivo. Cáncer de mama, Cáncer de Colon, Cáncer de Ovario, Cáncer de Próstata, Otro cáncer _____

Padre _____ 0: Negativo 1: Positivo. Cáncer de mama, Cáncer de Colon, Cáncer de Ovario, Cáncer de Próstata, Otro cáncer _____

Hermanos _____ 0: Negativo 1: Positivo. Cáncer de mama, Cáncer de Colon, Cáncer de Ovario, Cáncer de Próstata, Otro cáncer _____

Hermanas _____ 0: Negativo 1: Positivo. Cáncer de mama, Cáncer de Colon, Cáncer de Ovario, Cáncer de Próstata, Otro cáncer _____

Número de Familiares Primer grado _____

Número de Familiares Segundo grado _____

Enfermedades Auto-inmunes _____ 0: Negativo 1: Positivo. Cual? _____

Otros padecimientos _____ 0: Negativo 1: Positivo. Cual? _____

Historia de patología mamaria _____ 0: Negativo 1: Positivo. Cual? _____

THR _____ 0: Negativo 1: Positivo Tiempo en Meses _____

Tabaquismo _____ 0: Negativo 1: Positivo.

Menarquia _____

PF _____

0: Ninguno 1: DIU 2: Hormonales 3: Barrera 4: SPC

G _____ P _____ C _____ A _____ EPP _____

Menopausia _____

Examen Mamario _____ 0: Negativo 1: Anormal Que patología? _____

Mastografía _____ 0: Negativo 1: Positivo. Resultado? _____

US Mamario _____ 0: Negativo 1: Positivo. Resultado? _____

ANEXO 3

LIGA AL ARCHIVO DONDE SE DESCRIBA CON DETALLE EL METODO DE TIPIFICACIÓN DE HLA SEGÚN EL FABRICANTE

PRODUCT INSERT

LABType® SSO Typing Tests



Catalog #s:

See LABType® SSO Typing Tests Reference Table for catalog IDs covered by this product insert.



For In Vitro Diagnostic Use.

Table of Contents

Intended Use.....	1	Directions for Use.....	4
Summary and Explanation.....	1	A. Bead Handling and Storage.....	4
Principles.....	1	B. Amplification.....	4
Reagents.....	1	C. Test Set-Up.....	5
Instrument Requirements.....	3	D. Test Procedure.....	6
Specimen Collection and Preparation.....	3	Results.....	8
Procedure 3		Limitations of the Procedure.....	8
A. Materials Provided.....	3	Expected Values.....	9
B. Materials Required, but Not Provided.....	3	Specific Performance Characteristics.....	9
C. Materials Recommended, but Not Provided.....	4	Bibliography.....	9
D. Step-by-step procedure.....	4	Licensing, Patents, and Trademarks.....	10
		European Authorized Representative.....	10
		Summary of Protocol for 96-Sample Assay.....	11



INTENDED USE

DNA typing of HLA Class I or Class II alleles.

SUMMARY AND EXPLANATION

Historically, the established method for the determination of HLA antigens has been the lymphocytotoxicity test.¹ However, with the advent of PCR technologies, DNA based tissue typing techniques have become routine in the laboratory. For most DNA-based methodologies, the PCR process is used only as an amplification step to acquire the needed target DNA. The HLA typing process then requires a post-amplification step to discriminate between the different alleles (e.g., RFLP, SSOP, reverse dot blot). LABType® SSO uses sequence-specific oligonucleotide probes (SSO) bound to fluorescently coded microspheres to identify alleles encoded by the sample DNA. The introduction of a step to amplify the target DNA by polymerase chain reaction (PCR), coupled with hybridization and detection in a single reaction mixture, makes this method suitable for both small and large-scale testing. In contrast to the lymphocytotoxicity reaction scale (1 = negative to 8 = positive), LABType® test results are either positive or negative. This abolishes the need for complicated interpretation of results. In addition, single nucleotide changes can be discriminatory in PCR-SSO, while cross-reacting groups (CREGs) provide major challenges to serological typing.

PRINCIPLES

LABType® applies Luminex® technology to the reverse SSO DNA typing method. First, target DNA is PCR-amplified using a group-specific primer. The PCR product is biotinylated, which allows it to be detected using R-Phycoerythrin-conjugated Streptavidin (SAPE).

The PCR product is denatured and allowed to rehybridize to complementary DNA probes conjugated to fluorescently coded microspheres. A flow analyzer, the LABScan™ 100, identifies the fluorescent intensity of PE (phycoerythrin) on each microsphere. The assignment of the HLA typing is based on the reaction pattern compared to patterns associated with published HLA gene sequences.

REAGENTS

A. Identification

The LABType® SSO DNA typing system provides sequence-specific oligonucleotide probes immobilized on microspheres for identification of HLA alleles in amplified genomic DNA samples through a controlled DNA-DNA hybridization reaction, followed by flow analysis using the LABScan™ 100 flow analyzer. The system components consist of:

- Pre-optimized and tested mixture of microspheres with probes covalently attached

- Hybridization reaction buffers to facilitate the binding of target DNA to the probe
- Wash Buffer to wash off unbound DNA
- SAPE buffer for diluting Stock SAPE solution
- DNA amplification reagents (pre-optimized HLA loci-specific primer mix)
- D-mix (specially formulated amplification).

The microsphere mixture consists of a set of fluorescently labeled microspheres that bear unique sequence-specific oligonucleotide probes for HLA alleles. Each microsphere mixture includes negative and positive control microspheres for subtraction of non-specific background signals and normalization of raw data to adjust for possible variation in sample quantity and reaction efficiency. The microsphere mixtures are pre-optimized for particular PCR products obtained by DNA amplification using the specified HLA locus-specific primer mixes. The HLA locus-specific primer mixes are pre-optimized for amplification of specific HLA genes from 40 ng of purified genomic DNA in 20 µl volume when used in conjunction with D-mix, the prescribed amount of recombinant Taq polymerase, and the PCR reaction profile detailed below. For each lot, see provided worksheet for the specific HLA alleles that can be identified by each probe using the procedures described below. For lot specific probe sites, refer to the *Bead Probe Information* document.



B. Warning or Caution

1. For In Vitro Diagnostic Use.
2. **Warning:** Ethidium bromide, which is used for gel staining and which is not included with this product, is a known carcinogen. Handle with appropriate caution. Can be harmful if absorbed through skin. Avoid splashing in eyes or on skin or clothing. Keep tightly sealed. Wash thoroughly after handling. Flush spill area with water spray.
3. **Warning:** Denaturation Buffer and Neutralization Buffer are corrosive and may cause burns. In case of contact, immediately flush eyes or skin with a copious amount of water for at least 15 minutes while also removing contaminated clothing and shoes (see MSDS).
4. **Caution:** LABType® SSO Bead Mixture is light sensitive and must be protected from light.
5. **Caution:** Use LABType® SSO Bead Mixture within three months after it is thawed.
6. Refer to the Material Safety Data Sheet for detailed information.

C. Instructions for Use

See "Directions for Use."



D. Storage Instructions

All of the LABType® reagents and buffers can be safely stored frozen at -80° to -20°C in the product box. Avoid unnecessary handling. It is recommended that you keep the entire package intact and frozen upon receipt until ready to use. However, once the bead mixtures are thawed for use, they should be stored at 2° to 8°C and should never be refrozen.

A brief summary of the required storage and handling conditions necessary to ensure optimal stability for the LABType® reagents follow below.

LABType® Buffers:

All of the LABType® buffers, **with the exception of the SAPE buffer**, have an allowable temperature range of -80° to 25° C and can be refrozen. The SAPE Buffer may not be refrozen. The SAPE buffer must be stored at -80° to 8° C. Once thawed, the SAPE Buffer must be stored refrigerated at 2° to 8° C.

LABType® SSO Bead Mixtures:

The LABType® Bead Mixtures are most stable frozen. We recommend initial storage of the beads at -80° to -20° C until ready to use. Once the beads have been thawed for use, they should be kept at 2° to 8° C for up to 3 months.

Important: *To prolong the shelf life of the beads, do not refreeze and thaw the beads again.*

LABType® Primer Sets and D-mix:

LABType® Primer Sets and D-mix are most stable frozen at -80° to -20° C. Both reagents may undergo repeated freeze-thaw cycles. Thus, we recommend storage -80° to -20° C at all times.

E. Purification or Treatment Required for Use

See DIRECTIONS FOR USE.

F. Instability Indications

1. Beads that exhibit discoloration, or aggregation that cannot be removed by vortexing, should be considered unusable.
2. If salts have precipitated out of any of the product reagents during shipping or storage, re-dissolve by extended vortexing at room temperature (20° to 25°C).

3. D-mix aliquots, upon thawing at room temperature (20° to 25°C), should be pink to light purple in color. Any D-mix aliquot without the specified coloration should be considered unusable.

INSTRUMENT REQUIREMENTS

- LABScan™ 100 flow analyzer
- Luminex® XY Platform (optional accessory for automated 96-sample reading on the LABScan™ 100 flow analyzer from Luminex Corporation)
- Centrifuge
 - Rotor for 1.5 ml microfuge tube (14,000 to 18,000 g)
 - Swing bucket rotor for 96-well microplate (1000 - 1300 g)
- Vortex mixer with adjustable speed
- 96-Well GeneAmp® PCR System 9600, 9700 or Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Set ramp speed to 9600 for 96-Well GeneAmp® PCR System 9700. Set ramp speed to 9600 Emulation Mode for Veriti™ 96-Well Thermal Cycler.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- A. DNA can be purified from human leukocytes by any preferred method.
- B. The DNA sample to be used for PCR should be re-suspended in sterile water or in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 – 9.0 at an optimal concentration of 20 ng/μl with the A260/A280 ratio of 1.65 - 1.80.
- C. Samples should not be re-suspended in solutions containing chelating agents, such as EDTA, above 0.5 mM in concentration.
- D. DNA samples may be used immediately after isolation or stored at -20°C or below for extended periods of time (over one year) with no adverse effects on results.
- E. DNA samples should be shipped at 4°C or below to preserve their integrity during transport.

PROCEDURE

A. Materials Provided

Note: The volumes provided are slightly more than the amount required for testing. This is to account for inadvertent losses that may result from pipetting. Do not mix components from different lots of products.

100 Tests per Package		40 Tests per Package	
2.25 ml Denaturation Buffer - 1 vial	4.95 ml SAPE Buffer - 1 vial	100 μl Denaturation Buffer - 2 vials of 50 μl each	1980 μl SAPE Buffer - 2 vials of 990 each
2.5 ml Neutralization Buffer - 1 vial	1.38 ml Primer Set D-Mix - 2 vials of 690 μl each	200 μl Neutralization Buffer - 2 vials of 100 μl each	552 μl Primer Set D-Mix - 2 vials of 276 μl each
3.4 ml Hybridization Buffer - 1 vial	400 μl Locus-Specific Primer Set - 1 vial	1360 μl Hybridization Buffer - 2 vials of 680 μl each	160 μl Locus-Specific Primer Mix - 2 vials of 80 μl each
55 ml Wash Buffer - 1 vial	400 μl LABType® SSO or HD Bead Mixture - 1 bottle	20 ml Wash buffer - 2 vials of 10 ml each	160 μl LABType® SSO or HD Bead Mixture - 2 vials of 80 μl each

20 Tests per Package	
50 μl Denaturation Buffer - 1 vial	990 μl SAPE Buffer - 1 vial
100 μl Neutralization Buffer - 1 vial	276 μl Primer Set D-Mix - 1 vial
680 μl Hybridization Buffer - 1 vial	80 μl Locus-Specific Primer Set - 1 vial
10 ml Wash Buffer - 1 vial	80 μl LABType® SSO or HD Bead Mixture - 1 vial

B. Materials Required, but Not Provided

- Deionized water
- 70% ethanol
- 20% chlorine bleach (or equivalent)
- R-Phycoerythrin-Conjugated Streptavidin--SAPE) (OLI Cat. #LT-SAPE)
- Sheath fluid (OLI Cat.#LXSF20 or LSXF20X5)
- Recombinant Taq polymerase (Amplitaq Polymerase, Roche Molecular Biochemicals, Part # 20759562018)

- 15 - 50 ml disposable tubes
- 96-well, thin-walled PCR tray, or tubes, and holder that can withstand 1000 – 1300 g in a centrifuge
Caution: PCR plate must have tight contact with heating block.
- Tray seal (OLI Cat. #SSPSEA300)
Note: PCR trays (25) and tray seals (180) sufficient for 2400 samples can be ordered from One Lambda (OLI Cat. #PCRTRAC)
- Electrophoresis apparatus/power supply—150V minimum capacity (Micro SSP™ Gel System, OLI Cat. #MGS108)
- UV transilluminator (example: Fotodyne FOTO/UV@21)
- Photographic or image documentation system
- 1x TBE buffer (89mM Tris-borate; 2 mM disodium EDTA, pH 8.0) with 0.5 µg/ml ethidium bromide or 5XTBE Buffer with ethidium bromide (OLI Cat. # 5XTBE100)
- Electrophoresis grade agarose (e.g., FMC Seakem® LE)
- PCR Pad
- Crushed ice

C. Materials Recommended, but Not Provided

- 1.5 ml microfuge tube
- Pipette tips (Rainin -GPS 10G, 250, 1000)
- 96-well, 250 µl V-bottom, white polystyrene microplate with a non-treated surface
- Aluminum foil

D. Step-by-step procedure.

See "Directions for Use" below.

DIRECTIONS FOR USE

Caution: Special care must be taken in the aliquoting process. Failure to follow the steps described below may result in reagent loss.

A. Bead Handling and Storage

1. Use of the recommended plastic ware (tubes, trays, and tips) can minimize loss of beads due to non-specific adhesion. (See "Material Required, but Not Provided.")
2. LABType® SSO beads can settle and aggregate if left in a tube. Beads must be evenly distributed before dispensing. Always mix beads vigorously by pipetting several times or by vortexing in horizontal position for 10 to 30 seconds, or as much as necessary, to obtain fully homogeneous mixture.
3. LABType® SSO beads are packaged in an aluminum foil bag. Do not remove beads from foil bag until ready to use.
4. LABType® SSO beads contain internal fluorescent dye, as well as HLA allele-specific probes, attached to their surfaces. To avoid photobleaching of the beads, protect beads from light during usage and storage. Store beads at -20°C in the tightly capped tube provided until ready to use. Cover beads with aluminum foil or equivalent during assay.

Cautions:

- *Once beads are thawed, store beads at 2° to 8°C and use within 3 months. Do not refreeze beads.*
- *Open bags containing Amplification Primer Mixture and D-Mix only in pre-amplification area. Store these items at -80° to -20° C in the pre-amplification area.*

B. Amplification (Set up in pre-amplification area.)

1. Enter the "LABType® PCR Program," into your thermal cycler as shown in Table 2. Confirm all parameters.
2. Turn on the thermal cycler to warm up heated lid.
3. Thaw DNA, Amplification Primers, and D-Mix. Keep on ice until use.
4. Adjust the concentration of genomic DNA to 20 ng/µl using sterile water.
5. Vortex D-mix and Amplification Primer for 15 seconds; centrifuge for 3-5 seconds.
6. Using Table 1 below, mix indicated volume of D-mix and Primers. Vortex for 15 seconds, and place on ice. For accurate pipetting of Taq polymerase, it is recommended that you prepare master mix for at least 10 reactions.
7. Add Taq polymerase immediately before use.

Table 1: Amplification Mixture

# of Reactions	D-mix (µl)	Amplification Primer (µl)	Taq Polymerase (µl)
1	13.8	4	0.2
10	138.0	40	2.0
50	690.0	200	10.0
96	1491.0	432	21.6 (22)

8. Pipette 2 µl of DNA (at 20 ng/µl) into the bottom of a tube (for final volume of 20 µl per PCR reaction). Store the tubes or tray partially covered to prevent evaporation and contamination.
9. Add an appropriate amount of Taq polymerase (e.g., 0.2µl per 20 µl reaction) to the Amplification Mixture prepared in Step B.6.
10. Vortex for a few seconds, and centrifuge for 3-5 seconds.
11. Aliquot 18 µl of Amplification Mixture into each well containing DNA.

Caution: To prevent cross-contamination, be sure not to touch the pre-aliquoted DNA at the bottom.

12. Cap or seal. If you are using a tray seal, make sure it is pressed tightly against the rim of each well. Place a PCR Pad appropriate for your thermal cycler on the tray before closing the lid. Close and tighten the lid of the thermal cycler.
13. Run "LABType® SSO PCR Program," shown in Table 2.
14. For GeneAmp PCR System 9700, set "ramp speed" to the 9600 program. For other systems, consult the manufacturer's documentation to adjust ramp speed to closely simulate the GeneAmp 9600 program. Use of a significantly different ramp speed will affect amplification efficiency.

Table 2: LABType® SSO PCR Program

Step	Temperature and Incubation Time	# of Cycles
Step 1:	96°C 03:00	1
Step 2:	96°C 00:20	5
	60°C 00:20	
	72°C 00:20	
Step 3:	96°C 00:10	30
	60°C 00:15	
	72°C 00:20	
Step 4:	72°C 10:00	1
Step 5:	4°C forever	1

15. Amplified DNA is now ready to be tested using the Test Procedure in section D. However, it is recommended to first use 2 - 5 µl of amplified DNA for analysis by gel electrophoresis. Confirmation of an amplification product (band) prior to hybridization assay ensures generation of optimal signals.
16. Store covered DNA tray at -80° to -20° C for up to one month.

C. Test Set-Up

1. Turn on the LABScan™ 100 and XY Platform and follow the start-up procedure described in Section D of the Directions for Use. The LABScan™ 100 requires at least 30 minutes to warm up.
2. Turn on thermal cycler and run program to 60°C HOLD, or equivalent, for at least 1.5 hours (or hold forever). Have a PCR Pad appropriate for your thermal cycler ready for use. Be sure to wait until the heated lid of the thermal cycler reaches the appropriate temperature before use. Use the appropriate 96-well PCR tray holder to ensure the proper incubation temperature.
3. Remove all reagents (except brown 100X SAPE bottle) from storage to room temperature. Aliquot necessary volumes of reagents into clean containers. (Use the tables below for reference). Be sure to prepare 1X SAPE during the third wash step. Remove the 100X SAPE bottle from storage only when needed, and return immediately to 2° to 8° C. Return any unused portions of the Bead Mixture and the SAPE Buffer to 2° to 8° C. (Do not refreeze Bead Mixture after thawing.)

Table 3: Reagent Preparation

Reagent	Amount per Test	Preparation Method and Suggestions
Bead Mixture	4 µl	<ul style="list-style-type: none"> • Aliquot appropriate volume, plus extra volume*, for the required number of tests into a clean tube at room temperature. • Protect from light. Use the entire contents of the Bead Mixture tube for 96 samples. • Vortex immediately before use.

Reagent	Amount per Test	Preparation Method and Suggestions
Hybridization Buffer	34 μ l	<ul style="list-style-type: none"> • Aliquot for exactly the same number of tests as used for the Bead Mixture. • Add to pre-aliquoted Bead Mixture to prepare Hybridization Mixture. • Keep at room temperature (20° to 25° C) until use.
Wash Buffer	480 μ l	<ul style="list-style-type: none"> • Aliquot appropriate volume, plus extra volume*, for the required number of tests, and keep at room temperature (20° to 25° C). • Use the entire contents in a trough for 96 samples.
Denaturation Buffer	2.5 μ l	<ul style="list-style-type: none"> • Aliquot appropriate volume, plus extra volume*, for the number of tests. • Use the entire contents in a trough for 96 samples. Keep at room temperature (20° to 25° C).
Neutralization Buffer	5 μ l	<ul style="list-style-type: none"> • Aliquot appropriate volume, plus extra volume*, for the number of tests. • Use all 2.5 ml for 96 samples. Keep at room temperature (20° to 25° C).
SAPE Stock (100X)	0.5 μ l	<ul style="list-style-type: none"> • During the last centrifugation step, prepare 1X SAPE solution by making 1:100 dilution of SAPE Stock with SAPE Buffer for the appropriate number of tests, plus extra volume.* • Protect from light. • Prepare enough 1XSAPE solution for 96 samples (around 110 sample worth depending on observed pipetting error). • Keep SAPE Stock bottle at 2° to 8° C.
SAPE Buffer	49.5 μ l	

*Note: The extra volume required depends on pipetting technique and calibration status of equipment. Use a full volume of Bead Mixture in the (cont. p.6) tube provided (enough for approximately 110 tests) for 96 tests. Prepare 1X SAPE for 115 tests, and use entire volume of other reagents to prevent a shortage. We recommend calibration of all pipetting devices and testing of these devices by aliquoting water. For reagents provided in excess volume, such as Denaturation and Neutralization Buffer, you may use a trough for multichannel pipetting.

Table 4: Reagent Volumes

Number of Tests	Denaturation Buffer (μ l)	Neutralization Buffer (μ l)	Hybridization Buffer (μ l)	Wash Buffer (μ l) Tray Method	Bead Mixture (μ l)
1	2.5	5	34	480	4
10	25	50	340	4800	40
20	50	100	680	9600	80
50	125	250	1700	24000	200
96	240	480	3264	46080	384

Table 5: SAPE and SAPE Buffer Volumes

Number of Tests	SAPE Stock Volume (μ l)	SAPE Buffer Volume (μ l)
1	0.5	49.5
10	5.0	495.0
20	10.0	990.0
50	25.0	2475.0
96	48.0	4752.0

Note: Volume of reagents in Tables 4 and 5 are for the exact number tests. The actual number of aliquots differs depending on pipetting accuracy. For a full 96-sample assay, we recommend using the entire bead mixture, the entire volume of hybridization buffer, 57.5 μ l stock SAPE, and 5693 μ l of SAPE buffer, which is slightly more than the exact amount required for the test.

D. Test Procedure

TECHNICAL PRECAUTIONS

1. To assay a small number of samples (48 or fewer) you may use a 96-well tray, a tray that has been cut to the appropriate number of wells, or a 0.2 ml thin-wall PCR strip tube. Be sure to use a tube rack when using a cut-off tray or strip tube.
2. Mixing of samples in a 96-well tray involves sealing of the tray and low speed vortexing for a few seconds. Adjust the speed of the vortex mixer so that liquid inside the 96-well PCR tray is sufficiently agitated without excessive splashing. Note the speed setting, and use it for the 96-well tray method.
3. Sealing of the 96-well PCR tray should be done carefully and completely to prevent well-to-well sample contamination. Seal the tray by pressing the seal against each rim of the 96 wells. Do not re-use tray seals. Use a fresh seal for each step that requires application of a tray seal. A repeater pipet may be used where applicable; however, a repeater pipet is usually less accurate in volume delivery.
4. We recommend regular calibration and a manual volume check for each volume to be delivered. Do not use a repeater pipet for dispensing the Hybridization Mixture.

1. **Denaturation/Neutralization**

- a) Prepare a crushed ice bath.
- b) Place a clean 96-well plate in a tray holder.
- c) Transfer 5 µl of each amplified DNA sample into a well of a clean 96-well plate. Make sure sample location and ID are noted.
- d) Add 2.5 µl Denaturation Buffer. Mix thoroughly (preferably by pipetting up and down), and incubate at room temperature (20 - 25° C) for 10 minutes.
- e) Add 5 µl Neutralization Buffer with pipet, and mix thoroughly (preferably by pipetting up and down). Note the color change to clear or pale yellow.
- f) Place PCR plate with neutralized PCR product on the ice bath.
Caution: Avoid contamination of PCR product with water.

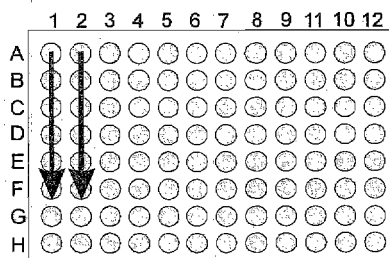
2. **Hybridization**

Note: Make sure that the thermal cycler has been turned on and the 60°C program has been started to warm the thermal block.

- a) Combine appropriate volumes of Bead Mixture and Hybridization Buffer to prepare Hybridization Mixture.
- b) Add 38 µl Hybridization Mixture to each well.
- c) Cover tray with tray seal and vortex thoroughly at low speed.
- d) Remove from tray holder and place PCR tray into the pre-warmed thermal cycler (60° C).
- e) Place PCR Pad on top of tray or caps on PCR tubes. Close and tighten lid. Incubate for 15 minutes.
- f) Place tray in tray holder and remove tray seal. Quickly add 100 µl Wash Buffer to each well. Cover tray with tray seal. Centrifuge tray for 5 minutes at 1000 -1300 g. Place tray in tray holder and remove wash buffer.
- g) Repeat step 2.f above two more times for a total of three wash steps. Remember to prepare 1X SAPE solution during third centrifugation.

3. **Labeling**

- a) Place tray in tray holder. Add 50 µl of 1X SAPE solution to each well. Place tray seal on tray and vortex thoroughly at low speed. Place tray in the pre-heated thermal cycler (60° C). Place PCR Pad on top of tray or caps on PCR tubes. Close and tighten lid. Incubate for 5 minutes.
- b) Remove tray. Place tray in tray holder. Remove seal and quickly add 100 µl Wash Buffer to each well.
- c) Cover tray with tray seal. Centrifuge tray for 5 minutes at 1000 – 1300 g. Place tray in tray holder and remove supernatant.
- d) Add 70 µl Wash Buffer to each well. Gently mix by pipetting. Transfer to reading plate using an 8- or 12-channel pipet. Avoid sample- to-sample contamination by using fresh pipet tips.
Note: Final volume should be at least 80 µl.
- e) Cover tray with tray seal and aluminum foil. Keep tray in the dark and at 4°C until placed in the LABScan™ 100 for reading.
- f) For the best results, read samples as soon as possible. Prolonged storage of samples (more than 4 hours) may result in loss of signal. Store samples overnight at 4°C in the dark with a tray seal, if they cannot be read immediately. Be sure to thoroughly mix the samples immediately before reading.



**Figure: The Luminex® XY Platform reads the sample in the following pattern:
A1 to H1, A2 to H2, A12 to H12.**

4. **Data Acquisition:** Described below is a general guide to data acquisition. Details on the use of the LABScan™ 100, may be found in the “Luminex® 100 User’s Manual” for the software version you are using.
- a) Turn on the system and set up the LABScan™ 100 for ample acquisition and calibration according to the Luminex® to the “Luminex User’s Manual” for the software version currently being used.
Note: For LABType® HD, Luminex® software version 2.2 or later must be used.

- b) Choose a template according to the product catalog ID and lot number.
- c) Acquisition templates are available from One Lambda on a CD or are downloadable via the One Lambda website.
 - 1) To create your own acquisition template, follow the instructions in the Acquisition chapter of the "Luminex User's Manual." Start Up
- c) Create a file name for the samples to be run.
- d) Make sure all the template settings are correct.
- e) Enter the sample IDs.

Caution: If the same sample is tested more than once, a different ID should be assigned.
- f) The plate is now ready to run.
- g) Load the plate onto the XY platform and fill the reservoir with sheath fluid.
- h) Click on the START button to initiate the session. After the samples have been run, the data output should be saved in a .csv file.

Note: For LABType® HD, capture and save the entire run file from the Luminex® flow analyzer for data analysis.
- i) Wash the machine 2 times with sheath fluid at the end of the session.

RESULTS

Data Calculation

- A. The mean fluorescence intensity (MFI) generated by the Luminex® Data Collector software, or equivalent, contains the FI for each bead (or probe bound to the bead) per sample. The percent positive value is calculated as:

$$\text{Percent Positive Value} = 100 \times \frac{\text{MFI (Probe n)} - \text{MFI (Probe Negative Control)}}{\text{MFI (Probe Positive Control)} - \text{MFI (Probe Negative Control)}}$$

The positive reaction is defined by the percent of positive values for the probe higher than the pre-set cut-off value for the probe. The negative reaction is defined as the percent of positive values lower than the cut-off value.

- B. Compare calculated percent positive values to the pre-determined cut-off values for each test probe. Assign a positive attribute to probes that have a percent positive above the cut-off and a negative attribute to those below the cut-off. The MFI of the positive control should be within 1200 - 7000 MFI. (The MFI value may fall outside of this range (see Expected Values, Section C) and varies for each positive control probe and lot.) The MFI of each probe is normalized against the positive control MFI and is expressed as a percentage of the positive control MFI. The pre-set cut-off value for each probe was established using a 100- to 200-sample DNA panel.
- C. Determine HLA allele (or allele groups) of the sample by matching the pattern of positive and negative bead IDs with the information in the LABType® SSO worksheet.
- D. For LABType™ High Definition assays, it is necessary to use HLA Fusion™ software for data analysis.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The LABType® SSO system combines an HLA locus-specific DNA amplification process and DNA-DNA hybridization process. The procedure, as well as the equipment calibration described in this product, must be strictly followed.

DNA amplification is a dynamic process that requires highly controlled conditions to obtain PCR products that are specific to a target segment of HLA gene(s). The procedure provided for the DNA amplification process must be strictly followed. In particular, since sample DNA quantity and quality can significantly affect the amplification reaction, a standardized DNA extraction procedure and spectrophotometric measurement of DNA quantity and quality, followed by gel electrophoretic analysis, are strongly recommended. In addition, to avoid contamination of initial materials with PCR products, all materials generated after DNA amplification (post-PCR materials, including reaction mixes; all disposable plastics; and equipment, such as pipetting devices and gel electrophoresis devices) must be physically separated from materials used before DNA amplification (pre-PCR materials including all disposable plastics, pipetting devices, sample DNAs, all other reagents used to set up amplification reactions). Frequent wipe tests to detect PCR product during the pre-PCR steps are strongly recommended.

The DNA-DNA hybridization-based assay using LABType® SSO is a very temperature-sensitive process. The temperature used for the assay must be checked frequently (calibrated). Strict adherence to the temperatures and incubation times described in this procedure is critical for obtaining optimal results. LABType® SSO microspheres are light sensitive and must be protected from light as much as possible. Avoid freezing and thawing to ensure maximum shelf life. To minimize a loss of microspheres during the assay, follow the protocol described here and use only recommended pipette tips and tubes.

The microsphere mixture provided contains a carefully optimized quantity of microspheres sets bearing HLA allele specific probes. Any alteration of the mixture would significantly affect the accuracy of the assay and would void the results.

When compared to SSP, SSO has more ambiguities because the probes used in SSO can interrogate sample DNA at only one region per test, and SSP can interrogate sample DNA at two regions per test. This is a basic limitation of the SSO method, which is well understood by the HLA professional. As mentioned previously, a list of Resolution Limitations is provided for each lot of the LABType® SSO Typing Tests to aid in interpretation of the reaction pattern and assignment of HLA typing.

All instruments (e.g., thermal cycler, pipetting devices, LABScan™ 100 and heat block) must be calibrated according to the manufacturers' recommendations.

For lot-specific information, refer to the *Bead Probe Information* document.

Because of the complexity of the HLA allelic definitions, a certified HLA technician or specialist should review and interpret the data, and assign the HLA typing.

EXPECTED VALUES

A. Sample Amplification

1. The HLA locus-specific primer mix provided is expected to yield adequate quantity of amplified DNA. Failure to detect an amplification product by ethidium bromide stained agarose gel electrophoresis voids test results.
2. DNA amplification is subject to contamination by previously amplified DNA. Detection of contamination (by performing a control amplification using water or pre-established DNA wipe test for detection of contaminating amplification products) can void test results.

B. LABScan™ 100 Analyzer

1. The LABScan™ 100 is an advanced flow analyzer that requires daily maintenance and calibration. Refer to the Luminex® 100 User Manual for all necessary maintenance operation. Daily maintenance includes routine start-up and shut-down procedures. For best performance, calibrate the instrument as part of the start-up routine. Calibrate the instrument whenever the **d Cal Temp** temperature shown on the system monitor panel is more than $\pm 3^\circ \text{C}$.
2. The instrument must pass a calibration test before LABType® SSO samples are analyzed.

C. Data Acquisition and Analysis

In order to obtain valid data, two parameters—count and fluorescence intensity—must be monitored for each data acquisition. Count represents the total number of beads that has been analyzed, and the count should be above 100. A significant reduction in the count suggests bead loss during sample acquisition or assay and can void test results. Mean Fluorescence Intensity (MFI) represents a PE signal detected within the counted beads. FI varies based on reaction outcome. The MFI for the positive control probe is expected to be 1200 to 7000, depending on the bead pool and lot. (The MFI value may fall outside of this range without affecting typing.) However, significant reduction or elevation in MFI for the positive control probe, accompanied by unassignable reaction patterns, may suggest inadequate sample quantity and/or quality, poor assay efficiency, or instrument failure and can void test results.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

In normal samples and using assay and data acquisition conditions that are within the specifications described in this product insert (e.g., starting genomic DNA concentration of 20 ng/μl and purity, OD260/280 of 1.65 to 1.80, hybridization incubation temperature and washing conditions, and the LABScan™ 100 analyzer performance status), positive and negative reactions are determined by comparing the relative Mean Fluorescence Intensity (MFI) of a sample to its corresponding cut-off value. The cut-off value has been experimentally determined for a given lot of LABType® SSO product, and the cut-off is used to distinguish between positive and negative signals, based on the HLA genotype of a sample. The results are expected to reflect the presence or absence of certain HLA allele(s), providing a clean-cut typing assignment.

Device performance studies were done using the QIAamp DNA Blood Maxi Kit sold by Qiagen Corporation.

BIBLIOGRAPHY

1. Terasaki, PI, Bernoco, F, Park MS, Ozturk G, Iwaki Y. Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C, and -D antigens. *American Journal of Clinical Pathology* 69:103-120, 1978.
2. Slater RD, Parham P. Mutually exclusive public epitopes of HLA-A, B, C Molecules. *Human Immunology* 26: 85-89, 1989.
3. The Luminex® 100 User's Manual, Luminex Corporation, PN 89-00002-00-005 Rev. B.
4. Ng J, Hurley CK, Baxter-Lowe LA, et al. Large-scale oligonucleotide typing for HLA-DRB1/3/4 and HLA-DQB1 is highly accurate, specific, and reliable. *Tissue Antigens*. 1993; 42: 473-479.

5. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert E, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasasaki T, Schreuder GMT, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI. Nomenclature for factors of the HLA system, 1998. *Tissue Antigens*, 53, 407-446, 1999. *Human Immunology*, 60, 361-395, 1999. *European Journal of Immunogenetics*, 26, 81-116, 1999.
6. Colinas RJ, Bellisario R et al. Multiplexed genotyping of beta-globin variants from PCR-amplified newborn blood spot DNA by hybridization with allele-specific oligodeoxynucleotides coupled to an array of fluorescent microspheres. *Clinical Chemistry* 46: 996-998, 2000.

LICENSING, PATENTS, AND TRADEMARKS USED IN THIS DOCUMENT

PATENTS USED IN THIS DOCUMENT



Notice to purchaser of licensed product: The purchase price of this product includes limited, non-transferable rights under U.S. Patents 4,683,202, 4,683,195 and 4,965,188 and their foreign counterparts, owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-LaRoche Ltd ("Roche"), to use only this amount of the product to practice the Polymerase Chain Reaction ("PCR") Process described in said patents solely for the HLA Typing applications of the purchaser solely for organ, bone marrow, or tissue transplantation, and explicitly excludes analysis of forensic evidence or parentage determination. The right to use this product to perform and to offer commercial services for HLA Typing for organ or tissue transplantation using PCR, including reporting the results of the purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is also hereby granted. Further information on purchasing licenses to practice PCR may be obtained by contacting, in the United States, the Director of Licensing at Roche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, and outside the United States, the PCR Licensing Manager, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr.124, and CH-4070 Basel, Switzerland.

The LABType® typing reagents are manufactured and distributed by One Lambda, Inc., 21001 Kittridge Street, Canoga Park, CA 91303, U.S.A. Recombinant Taq polymerase is manufactured by F. Hoffmann-LaRoche.

™Amplitaq is a trademark of Roche Molecular Biochemicals.

™LABScan is a trademark of One Lambda, Inc.

@LABType is a registered trademark of One Lambda, Inc.

@Luminex is a registered trademark of Luminex Corporation.

@Pipetman is a registered trademark of Rainin Instrument Co., Inc.

@Fotodyne FOTO/UV21 is a registered trademark of FOTODYNE Incorporated.

@FMC SeaKem is a registered trademark of FMC Corporation.

EC REP EUROPEAN AUTHORIZED REPRESENTATIVE

MDSS GmbH, Schiffgraben 41, D-30175, Hannover, Germany



Summary of Protocol for 96-Sample Assay

A. Pre Set-Up

1. Turn on LABScan™ 100 analyzer, and begin the start-up procedure. Turn on the thermal cycler, and start 60°C incubation program.
2. Prepare crushed ice bath (add small amount of water to allow PCR tray to stand straight on ice)
3. Thaw and vortex D-Mix and DNA.
4. Remove all reagents (except 100x SAPE bottle) from storage temperature and use at room temperature.
5. Thoroughly mix entire volume of Hybridization buffer and entire Bead Mixture in a clean tube; protect from light.

B. Amplification

1. Thaw all amplification reagents, and place on ice.
2. Aliquot 2 µl genomic DNA to each of 96 wells in a PCR tray.
3. Mix 432 µl of Primer Mix, 1491 µl of D-Mix, and 22 µl of Taq polymerase. Vortex well and give a quick spin.
4. Aliquot 18 µl of Amplification Mix from Step 3 into all 96 wells containing DNA.
5. Cap or seal the PCR tray.
6. Run the tray in a PCR oven using the LABType® SSO PCR program.
7. Remove the PCR tray from the PCR oven, and check the amplified DNA on a 2.5% agarose gel (use 5 µl per well).

C. Denaturation/Neutralization

1. In a clean, thin-walled 96-well PCR tray, aliquot 2.5 µl Denaturation Buffer per well.
2. Add 5 µl per well of amplified DNA. Note the sample locations in the 96 wells.
3. Mix thoroughly until the mixture changes to a bright pink color.
4. Incubate at room temperature (20° to 25° C) for 10 minutes.
5. Add 5 µl per well of Neutralization Buffer.
6. Mix thoroughly until the mixture turns clear or pale yellow.
7. Place tray carefully on the ice bath.

D. Hybridization/Washing

1. Aliquot 38 µl Hybridization Mixture (from A.4.above) per well into all neutralized DNA.
2. Place a seal on the tray and vortex thoroughly at low speed.
3. Incubate the tray in a 96-well block in a 60°C thermal cycler (use PCR Pad) for 15 minutes.
4. Take out the tray. Add 100 µl of Wash Buffer to each well. Place a new seal on the tray, and spin at 1000 g for 5 minutes.
5. Remove supernatant, leaving approximately 10 µl or less.
6. Repeat Steps D.4 and D.5 two more times for total of 3 washes.
7. During the last centrifugation step, prepare 1X SAPE (57.5 µl Stock and 5693 µl SAPE Buffer) and leave covered at room temperature.

E. Labeling

1. After removal of supernatant from the third wash (D.6 above), add 50 µl 1X SAPE per well.
2. Place a seal carefully on the tray and vortex thoroughly at low speed.
3. Incubate at 60°C in thermal cycler as above for 5 minutes.
4. Take out the tray, and add 100 µl Wash Buffer to each well. Place a new seal on the tray and spin at 1000 g for 5 minutes.
5. Remove supernatant. Add Wash Buffer to make the final volume 80 µl.
6. Mix by pinetting and transfer all samples to a 96-well microplate for data acquisition.

REVISION HISTORY

Revision	Date	Revision Description
10D	2004/11	Catalog #s, <i>RSSO2PB1, LRSSO2PB1, RSO2PB1F, LRSSO2PB1F</i>
11	2005/04	See highlights. Licensing language for PCR updated for licensed version. Remove software details from 'Data Acquisition' section. Volume changes to Materials Provided. Update Luminex from ™ to ®. Move all catalog IDs to Reference Table. Add note indicating user should refer to Reference Table.
11A	2005/06	Delete expired R-Phycoerythrin patents.
12	2007/08	Update "Materials Recommended, but Not Provided".
13	2007/09	Remove references to licensed product.
14	2008/03	Add new product, LABType® HD.
15	2008/10	Add additional information on LABType® HD.
16	2009/02	Instrument Requirements section: Add Veriti 96-Well Thermal Cycler; Separated "Thermal Cycler" into two words.
17	2009/04	Update "Materials Provided" Section A. Add Labtype. 20 tests packaging information.

ANEXO 4

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA DE MEXICO. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

ASOCIACION GENICA DE LOS ALELOS DE LOS LOCI HLA-B, HLA-DRB1, HLA-DQA Y HLA-DQB EN PACIENTES MEXICANAS MESTIZAS CON CANCER DE MAMA. UN ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES.

1. Estoy enterado y de acuerdo en participar de manera voluntaria en un estudio clínico cuyo objetivo es investigar si existen factores a nivel genético para el desarrollo de la enfermedad que padezco, mi participación sólo consiste en permitir la obtención de una muestra de mi sangre.
2. Me ha sido explicado el proceso del estudio por parte del Dr. David Cantú y he entendido cual es la finalidad de mi participación en éste estudio de Investigación.
3. Para llevar a cabo el estudio es necesario tomar una muestra de sangre de aproximadamente 4ml con el objeto de extraer el DNA a partir de las células sanguíneas periféricas.
4. Los resultados serán comunicados a la brevedad posible y serán totalmente confidenciales.
5. El material genético obtenido no será sometido a ningún tipo de manipulación, tráfico, venta y/o donación. La información obtenida solamente será con fines de investigación.
6. Este tipo de estudio no conlleva ningún tipo de riesgo a mi persona y sólo consiste en la molestia de la toma de muestra sanguínea.
7. Este tipo de estudio no conlleva ningún cambio en la terapéutica indicada para el Estadio Clínico de mi enfermedad.
8. La decisión es voluntaria y mi no participación en el estudio no afectará el tratamiento y atención clínica en el Instituto.
9. El costo del estudio genético será cubierto por fines de investigación.
10. El estudio se realizará en el Instituto Nacional de Cáncerología de México con participación del el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.
11. En caso de alguna duda o pregunta se podrá contactar al Dr. David Cantú en el Instituto Nacional de Cancerología de México en el teléfono 56-28-04-00 ext. 312.

Fecha _____

Nombre y firma del paciente.

Testigo.

Testigo.

Firma del Investigador.

APENDICE A

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA DE MEXICO.
 TABLA DE CALCULO DE TAMAÑO DE MUESTRA.

ASOCIACION GENICA DE LOS ALELOS DE LOS LOCI HLA-B, HLA-DRB1,
 HLA-DQA Y HLA-DQB EN PACIENTES MEXICANAS MESTIZAS CON
 CANCER DE MAMA. UN ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES.

		PREVALENCIA EN EL GRUPO CONTROL		
		0.4	0.45	0.5
OR	2	132	133	136
		176	177	182
		197	198	203
		251	252	258
	2.5	76	77	80
		102	103	107
		114	116	120
		145	147	152
	3	54	55	58
		71	73	77
		80	82	86
		102	104	109
$\alpha = 0.05$		$\beta = 0.2$		
0.05		0.1		
0.01		0.2		
0.01		0.1		